

Pathologies humaines associées à des dysfonctionnements de la voie de signalisation NF- κ B

par Gilles Courtois et Alain Israël

Unité de Biologie Moléculaire de l'Expression Génique, URA 2582 CNRS, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Correspondance : aisrael@pasteur.fr

Reçu le 5 janvier 2004

RÉSUMÉ

Un élément central de la voie NF- κ B est représenté par le complexe de kinases IKK, responsable de la dégradation des inhibiteurs I κ B qui retiennent les dimères NF- κ B dans le cytoplasme. Ce rôle central a pour conséquence le nombre important de pathologies liées à des mutations dans des composants de ce complexe. Trois composants sont actuellement connus : deux protéine kinases, IKK α and IKK β , et une sous-unité régulatrice (NEMO/IKK γ). Nous décrivons ici quatre pathologies liées à des dysfonctionnements de cette voie. Deux sont liées à des mutations de NEMO correspondant à une perte de fonction totale ou par-

tielle (avec des phénotypes très différents), et une troisième est liée à une mutation dans le gène codant l'inhibiteur I κ B α , le rendant non dégradable. Finalement la quatrième pathologie (cylindromatose) était déjà connue comme étant liée à des mutations dans un gène suppresseur de tumeur, mais dont la fonction était inconnue. Nous avons montré que la protéine codée par ce gène, CYLD, est en fait une désubiquitinase. Ce résultat renforce l'hypothèse émise récemment selon laquelle des événements d'ubiquitination non liée à la dégradation par le protéasome, sont impliqués dans l'activation de NF- κ B.

SUMMARY Human pathologies associated with NF- κ B defects

NF- κ B is the generic name of a family of transcription factors which play a critical role in the immune, inflammatory and anti-apoptotic responses. Homo- or heterodimers between the five members of the family are retained in the cytoplasm by inhibitory molecules of the I κ B family, which mask their nuclear localization signal. Three of these inhibitory molecules have been described: I κ B α , I κ B β and I κ B ϵ . Following cellular stimulation, I κ B proteins become phosphorylated by the I κ B kinase (IKK) complex, ubiquitinated and finally degraded by the proteasome. NF- κ B is then released and translocated to the nucleus, where it activates its target genes by binding to specific sites in their regulatory regions. The IKK complex is constituted of at least three subunits: two kinases, IKK α and IKK β , and one regulatory subunit (NEMO/IKK γ), and it constitutes an integrator of

most if not all signals which activate NF- κ B. Although the mechanisms leading to the degradation of the I κ B proteins are relatively well understood, the precise molecular mechanisms which result in the activation of the high-molecular-weight kinase complex remain to be elucidated.

The central role of the IKK complex is consistent with its involvement in a series of human pathologies. We describe here four pathologies: two are due to mutations in the gene encoding the NEMO molecule, a third one in the gene encoding the I κ B α inhibitor, while the fourth one is due to mutations in a gene which had been described as a tumor suppressor. This gene encodes a protein which interacts with NEMO and exhibits deubiquitinase activity, therefore strengthening the recent hypothesis of the role of non-degradation-linked ubiquitination in NF- κ B activation.

INTRODUCTION

Les protéines NF- κ B sont des activateurs transcriptionnels de nombreux gènes impliqués dans les réponses immune, inflammatoire ou anti-apoptotique, et leur acti-

vité est principalement contrôlée par les protéines de la famille I κ B qui les retiennent dans le cytoplasme en l'absence de signaux extracellulaires spécifiques (revue : Ghosh *et al.*, 1998). Les membres de la famille rel/ NF- κ B sont des dimères (homo- ou hétéro-) formés parmi

cinq protéines : p50, p52, c-rel, p65 et relB. Les complexes transactivateurs rencontrés le plus souvent sont p50/p65 (qui correspond à l'activité NF- κ B décrite initialement) et p50/c-rel. Les sous-unités p50 et p52 sont synthétisées sous forme de précurseurs cytoplasmiques, p105 et p100. Ces précurseurs présentent aussi une activité de type I κ B et sont capables de retenir dans le cytoplasme les cinq membres de la famille (Rice *et al.*, 1992).

Une des questions fondamentales et toujours incomplètement résolue porte sur la dissection des voies de signalisation qui aboutissent à la translocation nucléaire des protéines NF- κ B. Il a été montré qu'à la suite de divers signaux d'activation de NF- κ B, l'inhibiteur I κ B α (il existe en fait deux autres inhibiteurs, I κ B β et I κ B ϵ) est phosphorylé, ubiquitiné puis dégradé par la voie des protéasomes, permettant ainsi le transport dans le noyau des complexes NF- κ B. Les sites de phosphorylation (deux sérines dans la région N-terminale) de la molécule I κ B α ont été localisés ; la mutation d'un au moins de ces sites empêche la dégradation de cette molécule à la suite de signaux aussi différents que le Phorbol Myristate Acetate (PMA), le Tumor Necrosis Factor (TNF) ou le Lipopolysaccharide (LPS) (Whiteside *et al.*, 1995). Ceci suggère donc que les voies de signalisation initialement différentes empruntées par ces effecteurs convergent probablement au niveau de la (ou des) protéine(s) kinase(s) responsable(s) de la phosphorylation de I κ B α .

En 1996 le groupe de T. Maniatis a caractérisé un complexe cytoplasmique multiprotéique de 700-900 kDa capable de phosphoryler l'inhibiteur I κ B α sur les sérines 32 et 36 en réponse à divers signaux extracellulaires. En 1997, les sous-unités catalytiques de ce complexe à activité kinase ont été clonées par trois groupes (revue : (Karin & Ben-Neriah, 2000)). Les deux protéine-kinases ainsi isolées, appelées IKK α et IKK β , appartiennent à une nouvelle famille : elles contiennent en effet un domaine « glissière à leucines », probablement impliqué dans leur homo- ou hétérodimérisation, ainsi qu'un domaine « hélice-boucle-hélice » (HLH) probablement impliqué dans leur interaction avec d'autres protéines du complexe. Ces kinases sont activées soit par phosphorylation par d'autres kinases, soit par changement de conformation qui induirait une autophosphorylation ; à l'heure actuelle, rien ne permet de trancher entre ces deux hypothèses. Une approche génétique basée sur la complémentation de lignées mutantes qui ne répondent pas aux signaux d'activation de NF- κ B nous a permis de cloner la troisième sous-unité, à activité structurale et régulatrice, du complexe IKK (Yamaoka *et al.*, 1998) : une lignée appelée 5R, dérivée de fibroblastes de Rat Rat-1 transformés par la protéine Tax de HTLV-I, avait été initialement sélectionnée sur la base de la perte de son phénotype transformé, et s'est révélée déficiente pour la plupart des signaux d'activation de NF- κ B. La complémentation de cette lignée par une banque d'ADNc a permis d'identifier une protéine de 48 kDa, que nous avons appelée NEMO (cette molécule a ensuite été clonée après purification du complexe IKK et appelée IKK γ (Rothwarf *et al.*, 1998)). Cette protéine est capable

de compléter non seulement la lignée 5R, mais une autre lignée dérivée de cellules pré-B murines, 1.3E2, réfractaire à l'activation de NF- κ B par le PMA, l'IL1, le TNF et le LPS. La complémentation de la lignée 5R par l'ADNc codant NEMO aboutit à une récupération du phénotype transformé, confirmant le rôle de NF- κ B dans l'activité transformante de la protéine Tax. Par la suite, nous avons montré que la protéine NEMO fait partie du complexe multiprotéique mentionné plus haut, et interagit avec IKK β . En son absence, le complexe existe mais sa taille est réduite (300-400 kDa) et il ne présente pas d'activité kinase, et ce, quel que soit le stimulus appliqué. La protéine NEMO est donc nécessaire à l'activation de NF- κ B par le LPS, le PMA, l'IL1, le TNF et par la protéine Tax.

Pathologies humaines associées à des déficits complets ou partiels de la voie NF- κ B

*La pathologie Incontinentia Pigmenti
est due à des mutations du gène codant NEMO
(collaboration avec le groupe d'A. Munnich)*

Peu après le clonage de la molécule NEMO, nous avons été en contact avec un consortium international de généticiens (incluant en particulier le groupe d'Arnold Munnich, à Necker) qui recherchaient le gène impliqué dans une génodermatose humaine appelée *Incontinentia Pigmenti*. Jusqu'à cette date, aucune pathologie humaine liée à la voie de signalisation NF- κ B n'avait été décrite. Cette maladie liée à l'X, létale chez le garçon très tôt au cours du développement, se caractérise chez la femme par une pathologie complexe au niveau de l'épiderme. Peu de temps après leur naissance, les filles développent une dermatose qui évolue en suivant quatre stades distincts. Dans un premier temps, au cours des deux premières semaines de la vie, apparaissent des lésions vésiculo-bulleuses, assez semblables à la varicelle. Puis, entre la deuxième et la sixième semaine, des lésions verruqueuses surviennent. Elles précèdent un stade d'hyperpigmentation cutanée, dû à une accumulation de mélanine. Finalement, les lésions disparaissent, laissant des plaques d'hypo-pigmentation associées à une absence de follicules pileux et de glandes sudoripares. L'ensemble de ce processus a pour conséquence l'élimination des cellules portant le chromosome X muté. Les patients IP présentent également des défauts dentaires, oculaires et nerveux. Une autre caractéristique majeure des patients IP est l'inactivation biaisée du chromosome X (sup. à 95 %) observée dans le compartiment leucocytaire et dans la peau peu après la naissance, ce qui indique une élimination précoce, dans ces compartiments, des cellules exprimant le gène muté.

La localisation du gène IP dans la région Xq28, où se situe NEMO, ainsi que la sensibilité à l'apoptose des rares cellules dérivées de patients suggéraient qu'un défaut d'activation de la voie NF- κ B pourrait être responsable de cette pathologie. L'analyse d'un échantillon important de malades a montré que toutes les familles

atteintes d'*Incontinentia Pigmenti* (IP) portaient des mutations dans le gène codant la protéine NEMO (Smahi *et al.*, 2000). De manière remarquable, 85 % des cas familiaux ou spontanés d'IP présentent un réarrangement identique du locus NEMO. Ce réarrangement fait intervenir des séquences répétées MER67B qui encadrent les exons 4 et 10. Le résultat final est la production d'un ARNm ne contenant que les trois premiers exons de NEMO et qui code pour une protéine tronquée inactive. Une telle fréquence de réarrangement présente un grand intérêt diagnostique. En effet, à l'aide d'un simple test PCR il est désormais possible de déceler pré-natalement la maladie chez plus de trois-quarts des familles touchées.

Déficits immunitaires dus à des mutations hypomorphes du gène NEMO
(collaboration avec le groupe de J. L. Casanova)

L'absence complète d'activité NF- κ B est en fait relativement peu informative en ce qui concerne le rôle joué par cette voie de signalisation chez l'Homme. En effet, outre la létalité chez les hommes, le phénotype observé chez les patients de sexe féminin semble plus être une conséquence de la Lyonisation (inactivation d'un chromosome X) et donc de l'interaction entre des cellules mutées et des cellules saines, que de l'inactivation de NF- κ B. Il serait fort utile de pouvoir identifier des patients masculins portant une inactivation partielle de la fonction de NEMO n'induisant pas de létalité prénatale : dans ces conditions l'existence d'un seul chromosome X permettrait d'observer directement l'effet de ces mutations. En collaboration avec le groupe de J. L. Casanova à l'hôpital Necker, nous avons pu identifier de tels patients : ceux-ci présentent un syndrome complexe formé de la combinaison d'une Dysplasie Ectodermique Anhydrotique (DEA) et d'une ImmunoDéfiance (ID) ; les patients sont nommés DEA-ID) (Döffinger *et al.*, 2001). Ce syndrome était connu de longue date, mais ses causes restaient inconnues. Le syndrome DEA est caractérisé par l'absence de glandes sudoripares et de follicules pileux, des dents absentes ou de forme conique et une chevelure clairsemée. Deux formes ont été caractérisées, l'une liée à l'X et due à des mutations dans une protéine de la famille du TNF appelée ectodysplasine A, l'autre due à des mutations dans le gène codant une protéine de la famille du récepteur au TNF appelée EDAR. Néanmoins les malades DEA-ID sont en général hospitalisés pour une immunodéfiance sévère, qui se traduit par une mortalité durant les premières années de la vie à la suite d'infections par des bactéries Gram+ et Gram- ainsi que par des mycobactéries. Une analyse du gène *NEMO* chez ces malades a permis de montrer que la majorité porte des mutations dans ce gène, qui sont en général des mutations faux-sens, ou des délétions de la région en doigt de zinc située en C-terminal de la molécule.

Des mutations dans le gène *NEMO* expliquent les symptômes DEA de ces patients. En effet EDAR se trouve être le récepteur pour l'ectodysplasine A, et

comme les autres membres des familles TNF/TNFR, ces deux molécules transmettent leur signal par la voie NF- κ B. Des mutations dans l'ectodysplasine A, dans EDAR et dans NEMO, qui appartiennent à la même voie de signalisation, provoquent donc l'apparition d'une série de symptômes communs. Ces résultats suggèrent un rôle jusqu'alors inconnu de NF- κ B dans la formation des dérivés de la peau (revue : Courtois *et al.*, 2001).

L'association entre NF- κ B et un déficit de l'immunité acquise est moins inattendue. En effet le rôle des récepteurs de la famille TLR dans cette immunité est maintenant largement démontré et admis, et ces récepteurs transmettent leur signal par l'intermédiaire de la voie NF- κ B. D'autres voies impliquées dans la lutte contre les agents pathogènes, IL1, IL18, TNF et CD40 (toutes dépendantes de NF- κ B), sont aussi très perturbées chez les malades DEA-ID.

Les deux pathologies ainsi caractérisées, IP et DEA-ID, bien que correspondant à des mutations dans le même gène, représentent des entités cliniques distinctes. Dans l'avenir, il sera important de déterminer si d'autres syndromes incluant une immunodéfiance et/ou une dysplasie ectodermique sont bien causés par un défaut de la voie d'activation NF- κ B.

Une forme autosomale dominante d'EDA associée à une immunodéfiance T est liée à une mutation qui empêche la phosphorylation de I κ B α
(collaboration avec le groupe de J. L. Casanova)

Plus récemment a été identifié un patient présentant les symptômes EDA et immunodéfiance présents chez les malades précédemment décrits, mais présentant en outre une immunodéfiance liée aux cellules T et caractérisée *in vitro* par une absence de réponse aux signaux d'activation du TCR et *in vivo* par l'absence de cellules T mémoires. L'analyse par immunoblot des différents composants de la cascade ne montre pas de différence notable entre les cellules du patient et des cellules normales témoins. L'activation du complexe IKK par le TNF est aussi normale. L'étude de la dégradation des inhibiteurs montre que celle-ci a lieu normalement pour I κ B β et I κ B ϵ , mais qu'elle est totalement bloquée pour I κ B α . Ceci suggère une mutation dans le gène codant I κ B α lui-même. La séquence de ce gène a effectivement démontré qu'une mutation affectait la sérine 32 (Ser>Ile), détruisant ainsi un des deux sites de phosphorylation nécessaires à la dégradation de cet inhibiteur (Courtois *et al.*, 2003).

Ces résultats indiquent que l'absence presque complète de l'activité du complexe IKK, ou l'absence de dégradation de l'inhibiteur I κ B α , bien qu'aboutissant toutes les deux à une inhibition presque totale de l'activité NF- κ B, n'ont pas exactement les mêmes conséquences physiologiques. Ceci peut s'expliquer en imaginant que les mutations de NEMO affectent de la même manière les complexes NF- κ B initialement associés aux trois inhibiteurs, tandis que les mutations de I κ B α bloquent totalement les complexes associés à cet inhibiteur

mais n'interfèrent pas avec l'activation des complexes associés avec les deux autres inhibiteurs.

Une partenaire d'interaction de NEMO est le produit d'un gène suppresseur de tumeur impliqué dans une pathologie touchant l'épiderme de la face, et qui est en fait une désubiquitineuse

(collaboration avec le groupe de David Wallach, Weizmann Institute, Israël)

Pour identifier des protéines interagissant avec la partie C-terminale de NEMO, nous avons entrepris un crible double-hybride dans la levure, qui nous a permis d'isoler le gène codant une protéine de 105 kD, précédemment caractérisée comme un gène suppresseur de tumeur. Des mutations dans le gène codant cette protéine nommé CYLD avaient été identifiées chez des patients atteints d'une pathologie nommée cylindromatose (Bignell *et al.*, 2000). Cette pathologie, autosomale dominante, se caractérise par des tumeurs bénignes des tissus dérivés de la peau, apparaissant de manière préférentielle sur la tête.

Néanmoins la fonction exacte de la protéine CYLD restait inconnue. Un nouveau crible double-hybride a permis de montrer que CYLD interagissait également avec la protéine TRAF2, une molécule adaptatrice impliquée dans l'activation de NF- κ B par les récepteurs de la famille du TNF. Il est important de noter que TRAF2 appartient à la famille des protéines à "ring finger" qui, pour nombre d'entre-elles, sont des ubiquitine-ligases, et que des travaux récents ont impliqué l'activité ubiquitine-ligase de TRAF6 dans l'activation de NF- κ B par l'IL1 (Deng *et al.*, 2000). De manière inattendue, cette activité induit la formation de chaînes de polyubiquitine liées par la lysine 63, qui n'induisent pas la dégradation de leurs substrats par le protéasome, mais semblent plutôt moduler des interactions protéine-protéine. De plus les substrats de TRAF2 et TRAF6 n'ont pas été identifiés; il a seulement été montré que ces molécules sont capables de s'autoubiquitiner.

Nous avons pu démontrer que CYLD est en fait une désubiquitineuse capable de détruire les chaînes de polyubiquitine justement liées par la lysine 63, et en particulier de désubiquitiner TRAF2 et TRAF6, mais aussi de manière plus inattendue NEMO (Kovalenko *et al.*, 2003). De plus cette molécule se comporte, dans des expériences de transfection, comme un régulateur négatif de la voie NF- κ B. Ces résultats sont compatibles avec une hypothèse proposée récemment, selon laquelle des ubiquitinations impliquant la lysine 63 seraient importantes pour l'activation de NF- κ B, et suggèrent que NEMO pourrait être une cible possible de ces événements.

Nous avons aussi constaté que les tronctions de la protéine CYLD retrouvées chez les patients atteints de cylindromatose abolissent l'activité désubiquitineuse, suggérant l'hypothèse que cette pathologie serait due à une activation anormale de la voie NF- κ B. Il reste néanmoins à expliquer comment cette activation induit des tumeurs dans une région spécifique restreinte du corps.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats indique que des mutations aboutissant soit à une inhibition soit à une augmentation de l'activité NF- κ B, induisent des pathologies très diverses qui ne sont pas toujours explicables par les connaissances dérivées d'études effectuées sur des cellules en culture ou chez des souris transgéniques. L'étude des pathologies humaines devrait donc permettre d'avancer encore dans la compréhension des mécanismes d'activation de cette voie de signalisation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bignell G. R., Warren W., Seal S., Takahashi M., Rapley E., Barfoot R., Green H., Brown C., Biggs P. J., Lakhani S. R. *et al.*, Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nature Genet.*, 2000, 25, 160-165.
- Courtois G., Smahi A. & Israël A., NEMO/IKK gamma: linking NF-kappa B to human disease. *Trends Mol. Med.*, 2001, 7, 427-430.
- Courtois G., Smahi A., Reichenbach J., Doffinger R., Cancrini C., Bonnet M., Puel A., Chable-Bessia C., Yamaoka S., Feinberg J. *et al.*, A hypermorphic I κ B α mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J. Clin. Invest.*, 2003, 112, 1108-1115.
- Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L. Y., Braun A., You J. X., Slaughter C., Pickart C. & Chen Z. J., Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 2000, 103, 351-361.
- Döffinger R., Smahi A., Bessia C., Geissmann F., Feinberg J., Durandy A., Bodemer C., Kenwrick S., Dupuis-Girod S., Blanche S. *et al.*, X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- κ B signaling. *Nature Genet.*, 2001, 27, 277-285.
- Ghosh S., May M. J. & Kopp E. B., NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Ann. Rev. Immunol.*, 1998, 16, 225-260.
- Karin M. & Ben-Neriah Y., Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Ann. Rev. Immunol.*, 2000, 18, 621-663.
- Kovalenko A., Chable-Bessia C., Cantarella G., Israël A., Wallach D. & Courtois G., The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappa B signalling by desubiquitination. *Nature*, 2003, 424, 801-805.
- Rice N. R., MacKichan M. L. & Israël A., The precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions. *Cell*, 1992, 71, 243-253.
- Rothwarf D. M., Zandi E., Natoli G. & Karin M., IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, 395, 297-300.
- Smahi A., Courtois G., Vabres P., Yamaoka S., Heuertz S., Munnich A., Israël A., Heiss N. S., Klauk S., Kioschis P. *et al.*, Genomic rearrangement in NEMO impairs NF- κ B activation and is a cause of Incontinentia Pigmenti. *Nature*, 2000, 405, 466-472.
- Whiteside S. T., Ernst M. K., LeBail O., Laurent-Winter C., Rice N. R. & Israël A., N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I κ B α in response to inducers of NF- κ B activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 5339-5345.
- Yamaoka S., Courtois G., Bessia C., Whiteside S. T., Weil R., Agou F., Kirk H. E., Kay R. J. & Israël A., Complement cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, 1998, 93, 1231-1240.