

La voie des MAP kinases

Introduction

La voie des MAP kinases (on devrait dire *les* voies des MAP kinases) est une des principales voies de prolifération cellulaire, l'une des mieux connues, celle dont les altérations oncogéniques ont suscité le plus de travaux, celle que l'on cherche le plus à cibler sur le plan pharmacologique. Elle est située en aval de nombreux récepteurs, en particulier les récepteurs de la famille de l'EGFR, et aboutit à l'activation de facteurs de transcription, les MAP (*Mitogen-activated proteins*), qui gouvernent la transcription de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose. À côté de la voie classique, la mieux connue, que nous présenterons de façon détaillée, existent des voies en tous points parallèles qui sont activées par d'autres stimulus, aboutissent à l'activation d'autres facteurs de transcription et sont plus impliquées dans la réponse au stress, l'inflammation et le développement que dans la prolifération cellulaire.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les tyrosines phosphates du récepteur activé pouvaient être reconnues par de nombreuses protéines adaptatrices dotées d'un domaine de reconnaissance SH2 ou PTB. Nous partirons ici de certaines de ces protéines qui vont associer l'activation du récepteur à une protéine d'échange GTP-GDP, qui à son tour active une petite protéine G dont le rôle est capital, la protéine RAS (*Rat sarcoma*). Cette activation de RAS permettra la mise en œuvre d'une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de facteurs de transcription.

1 . Définition

La cascade des kinases activées par les mitogènes (MAPK) est un module hautement conservé qui intervient dans diverses fonctions cellulaires, y compris la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. La voie couvre de nombreuses protéines, y compris les MAPK initialement nommées ERK (kinases régulées par le signal extracellulaire), qui transmettent le signal en phosphorylant une protéine voisine, agissant comme un interrupteur "on" ou "off".

2 . Fonction et régulation

La fonction de la voie de signalisation MAPK La voie de signalisation MAPK est essentielle dans la régulation de nombreux processus cellulaires incluant l'inflammation, la réponse au stress cellulaire, la différenciation cellulaire, la division cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la motilité et l'apoptose. Le rôle de la voie MAPK dans le cancer, les troubles immunitaires et les maladies neurodégénératives a été bien reconnu.

Les processus de la voie de signalisation MAPK Les mammifères expriment au moins quatre groupes de MAPKs régulés de manière distincte : les kinases extracellulaires signal-relatives (ERK)-1/2, les kinases Jun amino-terminales (JNK1/2/3), les protéines p38 (p38alpha/beta/gamma/delta) et ERK5 qui sont activées par des MAPKK spécifiques : MEK1/2 pour ERK1/2, MKK3/6 pour le p38, MKK4/7 (JNKK1/2) pour les JNKs, et MEK5 pour ERK5.

Mais chaque MAPKK peut être activée par plus d'un MAPKKK, augmentant la complexité et la diversité de la signalisation MAPK. Chaque MAPKKK confère vraisemblablement une réponse à des stimuli distincts. Comme illustré dans l'image suivante, l'activation classique de la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) commence à la membrane cellulaire où de petites GTPases et diverses protéines kinases phosphorylent les MAPKKKs. Ensuite, les MAPKKKs phosphorylent directement et activent les MAPKKs. Une fois phosphorylées, les MAPKs activées phosphorylent de nombreux substrats cytoplasmiques et modulent finalement les facteurs de transcription qui entraînent l'expression de gènes spécifiques au contexte.

Bien que les cascades de signalisation MAPK soient représentées comme des groupes simples, linéaires et unidirectionnels de protéines kinases, la voie est en réalité très complexe. Un grand degré de communication croisée existe au sein des cascades MAPK et d'autres réseaux de signalisation. Par exemple, les interactions entre les médiateurs des réseaux MAPK, PI3K, la voie NFκB et la voie JAK-STAT sont bien documentées.

La voie de signalisation MAPK et le cancer La voie de signalisation MAPK est étroitement liée à la prolifération et à la différenciation cellulaires. Une activation continue des signaux MAPK est trouvée dans de nombreux tumeurs malignes. La prolifération cellulaire contribue largement à la tumorigenèse. Et la métastase et l'invasion tumorales sont des causes létales. Parmi les voies MAPK mammaliennes, la voie ERK est la mieux étudiée et est dérégulée dans environ un tiers des cancers humains. La voie ERK1/2 joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation, la métastase et l'invasion des cellules tumorales. Wen-Horng Wang, et al. ont découvert que la protéine x du virus de l'hépatite B inactivait le gène p53 par la voie p38/MAPK, induisant ainsi le cancer primaire du foie (CPL). Kim MS, et al. ont démontré que la p38 MAPK est une molécule de signalisation clé dans l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses du sein induites par Ras. Et de nombreuses études ont montré que la voie p38 MAPK exerce des fonctions régulatrices importantes dans les MMPs

(matrix metalloproteinases) produites par des stimuli extracellulaires. Les MMPs sont un type d'enzyme protéolytique étroitement associé à l'invasion et à la migration tumorales. De plus, la voie p38 MAPK favorise l'angiogénèse tumorale nécessaire au maintien de la croissance des cellules tumorales.

3 . Processus de l'activation de cascade de signalisation MAPK

La protéine GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) est une protéine adaptatrice dotée de domaines SH2 et SH3. Son domaine SH2 reconnaît des tyrosines phosphates du RTK activé (voir chapitre 1). Cela permet le recrutement à la membrane d'un facteur d'échange GTP-GDP, nommé SOS1 (Son of sevenless homolog 1), dont le rôle est de fixer sur la protéine RAS un GTP à la place du GDP ; c'est le rôle d'une famille de protéines que l'on appelle des GEF (Guanine nucleotide exchange factor). Si la voie EGFR-GRB2-SOS1-RAS est la mieux connue, il en existe de multiples variantes : d'autres protéines adaptatrices sont capables de coupler le RTK activé à la protéine RAS, en particulier, dans le cas des FGF (Fibroblastic growth factor), une protéine FRS (FGF receptor substrate) qui est phosphorylée par le récepteur, et dont les phosphotyrosines sont ensuite reconnues par la protéine GRB2. Par ailleurs, d'autres protéines d'échange GTP-GDP existent, susceptibles elles aussi d'activer la protéine RAS ; elles sont recrutées par divers types de RTK ainsi que par d'autres types de récepteurs.

Il existe trois protéines RAS homologues, K-RAS (Kirsten RAS), H-RAS (Harvey RAS) et N-RAS (Neuroblastoma RAS), qui se distinguent par leur spécificité tissulaire.

Elles appartiennent à la famille des petites protéines G, qui fonctionnent selon le même mécanisme : un facteur d'échange GEF remplace le GDP, pour lequel elles ont une affinité importante, par du GTP. Ce remplacement induit un changement de conformation de la protéine G qui lui permet d'exercer une action en aval, par exemple, pour la protéine RAS, de se lier à une sérine/thréonine kinase RAF et de l'activer.

Les petites protéines G possèdent une activité GTPasique qui leur permet ensuite d'éliminer le phosphate en gamma du nucléotide et de revenir à leur forme première, liée au GDP. Cette activité GTPasique est stimulée par un facteur activateur GAP (GTPase-activating protein).

Il existe une grande variété de petites protéines G et des modulateurs de leur activité, GEF et GAP. Dans le cas des protéines RAS et en réponse à l'activation d'un RTK, le GEF est donc la protéine SOS1 et le GAP une protéine nommée RASGAP. Un autre GEF de RAS, nommé RASGRP (RAS guanyl nucleotide releasing protein), peut être activé par les seconds messagers, l'IP3 (Inositol triphosphate), via le Ca²⁺ qu'il mobilise,

et le DAG (Diacylglycérol), libérés du phosphatidylinositol par la phospholipase C gamma (PLC γ), cette dernière possédant un domaine SH2 permettant son activation par un RTK (voir chapitre 1). Signalons enfin que ce GEF peut être activé par une autre voie de signalisation, celle impliquant des récepteurs à sept domaines transmembranaires (GPCR, pour G protein-coupled receptor) couplés à des protéines G hétérotrimériques activant une phospholipase C bêta (PLC β) à l'origine elle aussi des seconds messagers que sont l'IP3 et le DAG .

Les protéines RAS sont ancrées dans la membrane plasmique des cellules par l'intermédiaire d'une liaison covalente, ajoutée de façon post-traductionnelle au niveau du réticulum endoplasmique, avec un groupement hydrophobe ramifié dit groupement prényl, qui peut compter quinze atomes de carbone (farnésyl) ou vingt atomes de carbone (géranylgeranyl). Ces deux groupements sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol. Cet ancrage se fait par l'intermédiaire d'une cystéine de la chaîne polypeptidique, au niveau d'un motif -CAAX .

Il se produit en outre, dans l'appareil de Golgi, une palmitoylation (liaison avec un acide gras linéaire saturé à seize atomes de carbone, l'acide palmitique) de certaines protéines RAS au niveau d'une cystéine située un peu en amont de celle recevant la prénylation.

On considère que c'est le recrutement à la membrane de SOS1, grâce à son affinité pour GRB2, qui permet la rencontre de la protéine d'échange avec son substrat, et donc l'activation de RAS. Cet ancrage membranaire est indispensable à la fonction des protéines RAS.

Lorsqu'il est lié au GTP, RAS subit une modification conformationnelle qui lui permet de reconnaître et de recruter à la membrane une sérine/thréonine kinase qui est une protéine RAF dans la voie des MAP kinases. Plusieurs autres sérine/thréonine kinases peuvent ainsi être activées par RAS, comme la PI3 kinase que nous retrouverons au chapitre 3, ainsi que d'autres enzymes comme la phospholipase C epsilon (PLC ϵ) ou d'autres petites protéines G comme RAL. Les protéines RAS sont ainsi un carrefour important au coeur de plusieurs voies de signalisation. L'activation des protéines en aval de RAS est un phénomène limité dans le temps, puisque l'activité GTPasique de RAS, aidée en cela par la protéine RASGAP, désactive rapidement RAS en le ramenant à la forme RAS-GDP inactive, incapable de reconnaître et d'attirer RAF à la membrane plasmique. La protéine RASGAP possède un domaine SH2 qui lui permet, comme GRB2, d'être recrutée à la membrane par un récepteur RTK afin d'y exercer son action. La figure 2-2 présente les étapes successives de la voie des MAP kinases.

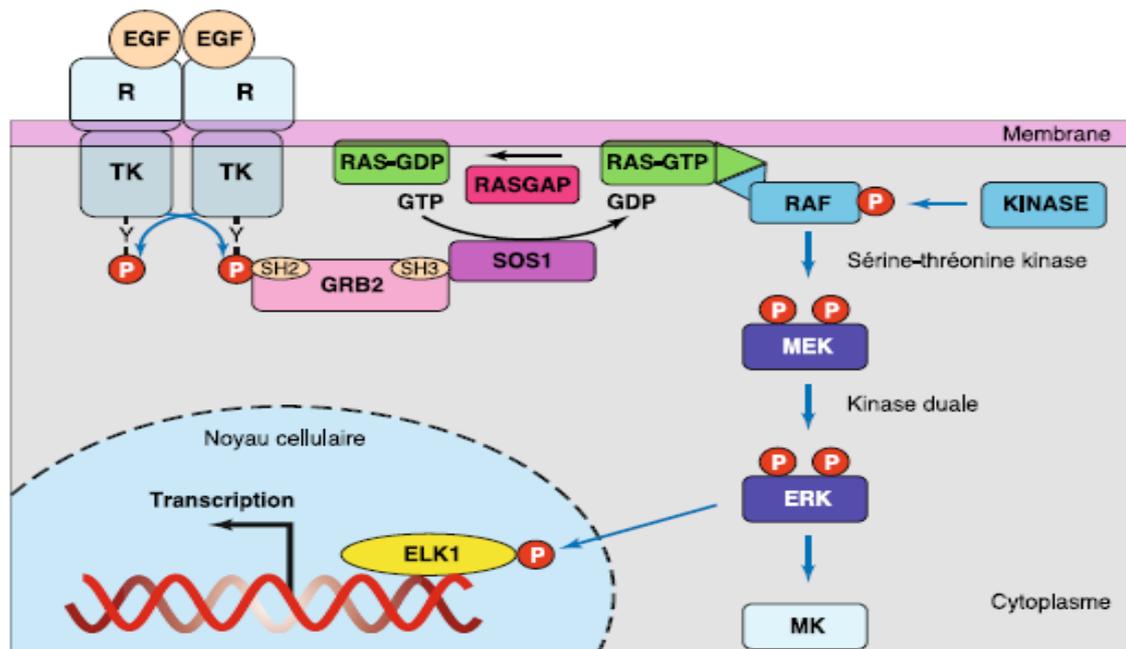


Fig. 1 – La voie des MAP kinases.

Selon la voie de signalisation la plus classique, l'activation d'un RTK permet le recrutement d'une protéine à domaine SH2 appelée GRB2 ; le domaine SH3 de GRB2 est reconnu par une protéine SOS1, qui est un facteur d'échange GDP-GTP pour les protéines RAS. RAS-GTP peut recruter à la membrane une protéine RAF, qui reçoit alors une ou plusieurs phosphorylations catalysées par d'autres kinases (PKA, PAK, SRC), ce qui active sa fonction de kinase. RAS-GTP est désactivé par son activité GTPasique propre, stimulée par la protéine RASGAP (*RAS GTPase-activating protein*). RAF phosphoryle et active une protéine MEK, qui phosphoryle et active une protéine ERK, qui phosphoryle et active un facteur de transcription comme ELK1 ou une kinase de la famille MK.

4 . Les substrats des MAP kinases

Les MAP kinases ont la propriété de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs de transcription, comme ELK1, ETS, FOS, JUN, MYC et SP1, qui induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération ; la plupart étaient connus comme proto-oncogènes. Les MAP kinases sont également capables de phosphoryler une famille d'une dizaine de kinases aux propriétés biologiques diverses, appelées MK (MAPK-activated protein kinases), comprenant des RSK (Ribosome S6 kinases), des MSK (Mitogen and stress-activated kinases) et des MNK (MAP kinase interacting proteins). Ces kinases exercent des effets divers dans la cellule, surtout au niveau de la prolifération et de l'adhésion cellulaires.

Les facteurs de transcription activés par les MAP kinases.

5 . MAPK et cancer

Le cancer est souvent exposé à une variété de conditions de stress telles que la privation d'oxygène et l'inflammation. De nombreuses voies MAPK sont impliquées dans la

signalisation du stress. Par conséquent, certaines kinases sont activées par le stress dans le cancer en réponse à l'inflammation, aux dommages à l'ADN et à l'apoptose. Les états hypoxiques sont répandus dans les tumeurs solides. Le signal hypoxique stimule l'activation de MKP-1. MKP-1 active ensuite les SAPK/JNKs, qui activent c-Jun. c-Jun actif favorise la transcription de multiples gènes en aval qui est importante pour la prolifération et la survie des cellules cancéreuses.

Les aberrations dans la signalisation MAPK influencent la plupart des processus de carcinogénèse et sont cruciales pour le développement et la progression du cancer. La plupart des lésions associées au cancer telles que la surexpression des récepteurs tyrosine kinases, les mutations activatrices dans les récepteurs tyrosine kinases, la production autocrine ou paracrine soutenue de ligands activateurs, les mutations Ras et les mutations B-Raf entraînent une activation constitutive de la signalisation ERK. L'activité et la phosphorylation de c-Jun par JNK ont été signalées comme jouant un rôle critique dans la tumorigénèse induite par Ras.

6 . Cibles pharmacologiques

Tous les étages de cette voie de signalisation ont été explorés sur le plan pharmacologique afin de découvrir des molécules susceptibles de l'inhiber et d'avoir ainsi des propriétés antiprolifératives utilisables dans le traitement des cancers.

Les protéines adaptatrices dotées de domaines SH2 pourraient théoriquement être inhibées par des composés mimant les interactions protéine-protéine. Cette approche intéressante se heurte au fait que les peptides, s'ils sont bien manipulables in vitro, entrent difficilement dans la cellule et se prêtent mal à un développement pharmacologique.

Les protéines RAS ont fait l'objet de recherches intenses, principalement orientées vers l'inhibition de leur insertion membranaire. Des molécules pourvues d'activités inhibitrices de la farnésyl transférase ou de la géranylgeranyl transférase ont été découvertes, développées et ont fait l'objet d'essais cliniques approfondis. Quatre classes d'inhibiteurs ont été développées : les analogues du farnésyl diphosphate, substrat de la farnésyl transférase, les peptidomimétiques de la boîte CAAX, les inhibiteurs bisubstrats et les produits naturels obtenus par criblage. Lors de l'expérimentation préclinique, plusieurs composés se sont révélés très actifs. Quatre composés sont entrés en développement clinique, dont le tipifarnib et le lonafarnib.

Malheureusement, ces molécules se sont révélées décevantes sur le plan de leur activité clinique et sur le plan de leur toxicité. Il semble que ce soit lié au fait qu'elles sont beaucoup plus actives sur d'autres petites protéines G comme les protéines RHO, impliquées dans

d'autres voies de signalisation, en particulier au niveau du cytosquelette, que sur les protéines RAS elles-mêmes. À l'heure actuelle, des essais sont poursuivis en association avec une chimiothérapie classique ou avec la radiothérapie, car ces molécules ont montré des propriétés radiosensibilisantes.

Il est à noter que les mutations activatrices de RAS découplent la voie des MAP kinases de l'activation du RTK, permettant ainsi aux cellules tumorales ayant cette altération oncogénique d'acquies une autosuffisance en facteurs de croissance qui constitue une des principales familles de mécanismes oncogéniques. Il a été montré que, de façon quasi absolue, les mutations activatrices de RAS s'accompagnent effectivement d'une inefficacité des anticorps anti-EGFR dans les cancers colorectaux .

Les protéines de la cascade des kinases ont fait également l'objet de recherches d'inhibiteurs. Un inhibiteur de RAF a été identifié par criblage de banques de molécules(chimiothèques) : ce composé, le sorafénib, s'est révélé être également un inhibiteur puissant des récepteurs du VEGF (KDR). Son activité est due à une inhibition de l'activité kinase de RAF par compétition avec son substrat, l'ATP.

Actuellement sur le marché pour le traitement des carcinomes rénaux et des hépatocarcinomes, le sorafénib apparaît être plus un inhibiteur de l'angiogenèse qu'un inhibiteur de la prolifération cellulaire au niveau de sa cible originale RAF. D'autres inhibiteurs de RAF sont à l'étude ; il est à noter qu'ils ne sont actifs qu'en cas de mutation de B-RAF, et seraient au contraire des activateurs de la voie des MAP kinases dans les tumeurs ne présentant pas de mutation activatrice de K-RAS ni de B-RAF. La question se pose de savoir s'il vaut mieux développer des inhibiteurs spécifiques de la kinase B-RAF mutée ou au contraire des inhibiteurs pan-RAF.

Plusieurs inhibiteurs de MEK sont à l'heure actuelle en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase I et II. Le fait qu'ERK1 et ERK2 sont les seuls substrats de MEK1 et MEK2 encourage ce développement, car il augure d'une bonne spécificité des inhibiteurs. Les composés à l'étude dérivent du CI-1040, très utilisé expérimentalement mais inutilisable en clinique, qui est un inhibiteur allostérique de l'activité kinase : il induit un changement de conformation empêchant l'accès du site catalytique par l'ATP.

L'inhibition des voies JNK et p38 a été développée dans le traitement de l'inflammation, et les molécules disponibles ne semblent pas avoir d'effets anticancéreux directs. Toutefois, dans la mesure où l'inflammation chronique est un facteur de stimulation de la progression tumorale, des inhibiteurs de ces kinases ont été testés en oncologie. Par ailleurs, ces composés peuvent interférer avec le rôle pro-angiogénique

des voies JNK et p38 et méritent certainement une grande attention.

Enfin, même si les divers facteurs de transcription qui représentent l'aboutissement de la voie des MAP kinases constituent autant de cibles potentielles, le développement pharmacologique d'inhibiteurs est encore préliminaire. Des peptidomimétiques ciblant les interactions protéine – protéine au niveau de MYC-MAX ou de JUN-FOS, par exemple, pourraient se révéler intéressants pour le traitement des cancers.