Pierre Chardin, un pionnier de la découverte des gènes et protéines de la superfamille Ras

Hélène Barelli¹, Jacques Camonis²,
Jean de Gunzburg³, Bruno Goud⁴,
Françoise Moreau-Gachelin⁵, Alfred Wittinghofer⁶,
Ahmed Zahraoui⁷

La découverte des gènes Ras

La découverte des gènes *Ras* remonte au début des années 1960 quand Jennifer Harvey (*London Hospital Research Laboratories*, Londres, Royaume-Uni), alors qu'elle tentait d'infecter des rats avec un virus leucémogène chez la souris, le virus de Moloney, observe que les rats infectés développent, en plus de l'érythroleucémie attendue, des tumeurs solides, sous forme de sarcomes anaplasiques, près du site d'inoculation. Des extraits filtrés dérivés de ces tumeurs reproduisaient cette pathologie de leucémie et sarcome quand ils étaient injectés à des souris et des rats. Le premier virus sarcomatogène de mammifères (Ha-MSV) venait d'être isolé [1]. En 1967, suivant une stratégie similaire, le virus sarcomatogène (Ki-MSV) était généré lors de l'infection de rats par le virus leucémogène de la souche Kirsten (Ki-MuLV) [2]. Mais quels éléments viraux étaient responsables de ces propriétés tumorigènes d'un virus leucémogène, lors de l'infection d'un rat ? Il fallut attendre 1981 et le séquençage des génomes des virus Ha-MSV et Ki-MSV [3] pour caractériser les séquences génomiques de rat capturées par ces virus. Ces séquences responsables de l'activité sarcomatogène de Ha-MSV et Ki-MSV furent appelées Ras (pour *rat sarcoma*). Elles étaient conservées évolutivement et, notoirement, il apparut qu'il existait des homologues cellulaires chez l'homme. Ces deux premiers gènes Ras (*v-H-Ras* et *v-K-Ras*) transduits par des rétrovirus

murins codaient une protéine de 21 kDa (p21). Une protéine p21 responsable de l'activité oncogénique des virus Ha-MSV et Ki-MSV avait par ailleurs été identifiée dès

1979, dans des cellules infectées par des mutants thermosensibles de ces deux virus [4].

À cette époque, une question centrale posée dans la recherche sur le cancer était celle de l'étiologie des tumeurs humaines qui n'étaient pas provoquées par des virus. Un pas décisif fut franchi par l'observation qu'un ADN exogène extrait de carcinomes de vessie et transfecté dans des cellules de souris NIH-3T3 provoquait leur transformation morphologique. Elle permit l'identification par quatre équipes indépendantes (R. Weinberg, *Massachusetts Institute of Technology* [MIT] ; M. Wigler, *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York ; G. Cooper, *Harvard Medical School*, Boston ; M. Barbacid, *National Institutes of Health* [NIH], Bethesda) du premier oncogène humain, qui se révéla être un variant activé du gène humain *c-H-RAS* [5-8]. La différence

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles-Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France.

²Directeur de recherche émérite CNRS, Paris, France.

³Da Volterra, 172 rue de Charonne, 75011 Paris, France.

⁴Institut Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

⁵Directeur de recherche honoraire Inserm, Paris, France.

⁶Emeritus Group Structural Biology, Max-Planck-Institut für molekulare physiologie, Otto-Hahn-Strasse 11, 44227 Dortmund, Allemagne.

⁷Centre de Psychiatrie et Neurosciences, 102 rue de la Santé, 75014 Paris, France. bruno.goud@curie.fr

entre séquence du gène oncogénique et séquence du gène normal correspondant était subtile : le potentiel oncogénique de Ras était simplement dû à une mutation ponctuelle dans le codon 12 du gène, changeant un acide aminé glycine en valine dans la séquence de la protéine p21.

L'utilisation extensive de cette stratégie de transfection d'ADN dans les cellules NIH-3T3 pour rechercher des gènes dotés d'un potentiel oncogénique dans des tumeurs d'origines différentes (poumon, côlon, pancréas, vessie, sein, ovaire, lymphomes, leucémies myéloïdes) mit ensuite en lumière le fait que beaucoup des gènes transformants étaient des homologues de *c-H-Ras* et *c-K-Ras*. La découverte du troisième gène *RAS* est ainsi issue de la transfection de l'ADN d'une lignée de neuroblastome humain dans les cellules NIH-3T3 [9]. Dénommé *N-RAS*, ce gène s'avéra être très similaire à *H-RAS* et *K-RAS* et être fréquemment activé dans les tumeurs humaines, avec une certaine spécificité pour les tumeurs d'origine hématopoïétique.

In fine, l'analyse de la séquence du gène *N-RAS* comme de celle des gènes *H-RAS* et *K-RAS* dans les différentes tumeurs, montre que l'activation du potentiel oncogène du gène *Ras* est due à des mutations ponctuelles ciblant alternativement deux domaines de la protéine p21, au niveau des acides aminés en position 11,12 et 13 ou 59 et 61.

La fonction biochimique des protéines p21ras a été ensuite rapidement décryptée [10]. Ce sont des GTPases de petit poids moléculaire (20-25 kDa), capables de lier les nucléotides GTP et GDP, et possédant une activité GTPase intrinsèque d'hydrolyse du GTP. Elles sont impliquées dans la transmission des signaux générés par l'interaction d'un facteur de croissance avec son récepteur exprimé à la surface de la cellule, affectant les processus intracellulaires en aval du récepteur. Les mutations ponctuelles dans les domaines de liaison au GDP/GTP conduisent à un dysfonctionnement de ces protéines en les bloquant sous leur forme activée liée au GTP, ce qui est à l'origine de leur activité oncogénique.

La découverte des premiers gènes de la famille Ras

En séquençant la région génomique localisée en amont du gène codant l'actine de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'équipe de Dieter Gallwitz (*Max-Planck Institute for Biological Chemistry*, Göttingen) identifie en 1983 un gène homologue de *Ras* qu'ils nomment *YPT1* [11]. *YPT1* sera le premier membre de la future famille *Rab* (voir ci-dessous). Peu de temps après, Pascal Madaule, jeune post-doctorant français dans l'équipe de Richard Axel (*Columbia University*, New-York) à la recherche des gènes codant des peptides neurotropes chez l'aplysie (un mollusque gastéropode marin à corps nu, appelé également lièvre de mer) clone un autre gène homologue de *Ras* qui s'avèrera être le membre fondateur de la famille *Rho* (voir plus loin) [12].

S'appuyant sur l'existence des deux isoformes du gène *RAS* et la découverte des deux homologues de *RAS* chez la levure et l'aplysie, Pierre Chardin, alors étudiant en thèse dans l'unité Inserm U248 dirigée par Armand Tavitian à la Faculté de médecine Lariboisière Saint-Louis (Paris), émet l'hypothèse que les gènes *Ras* constituent en fait une vaste famille, codant une variété de protéines. Pour valider cette hypothèse, il met au point une méthode originale fondée sur l'iden-

tification d'une région peptidique minimale conservée entre les différentes protéines Ras et nécessaire à leur activité d'hydrolyse du GTP (la séquence d'acides aminés « DTAGQE »). Il dessine et synthétise (manuellement à cette époque !) un oligonucléotide dégénéré codant ce peptide qu'il utilise pour cribler, dans des conditions d'hybridation à faible stringence, des banques d'expression du génome humain, afin de rechercher les séquences correspondant à de nouveaux gènes *Ras*. Son premier essai l'amène à identifier un gène humain qu'il nommera *RAL* (pour *RAS-like*) [13]. Il existe en fait deux gènes paralogues chez l'homme, *RALA* et *RALB*, qui codent des protéines présentant 83 % d'identité entre elles. On sait aujourd'hui que les protéines Ral et leurs effecteurs jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions cellulaires (*Figure 1*). Elles sont elles-mêmes par ailleurs des effecteurs des protéines Ras et semblent nécessaires à leur action oncogénique (*Figure 1*).

Les cribles suivants se révèlent tout aussi fructueux. Pierre et ses collègues du laboratoire (Nicolas Touchot, Ahmed Zahraoui, Véronique Pizon, Isabelle Lerosey et d'autres) identifient ainsi les premiers gènes *Rab* (pour *Ras-like in rat brain*) [14, 15]. Les protéines Rab constituent la branche la plus étendue de la superfamille Ras (plus de 70 membres ont été identifiés à ce jour chez l'homme). Localisées sur la membrane de tous les compartiments de la cellule, ce sont des régulateurs essentiels du transport intracellulaire. En interagissant avec une grande variété d'effecteurs (moteurs moléculaires, kinases et phosphatases, protéines d'échafaudage, etc.), elles régulent toutes les étapes du transport vésiculaire, depuis la formation des vésicules de transport, leur mouvement le long du cytosquelette et leur ciblage vers leur destination finale. Les protéines Rab contribuent aussi à spécifier l'identité structurale et fonctionnelle des compartiments de la cellule [16] (*Figure 1*).

Ils identifient aussi les premiers gènes *RAP* (pour *Ras proximal*) [17]. Les cellules de mammifères expriment deux protéines Rap1 (Rap1A et Rap1B) et trois protéines Rap2 (Rap2A, 2B et 2C). Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses cascades de signalisation régulant l'adhérence cellulaire dépendant des intégrines, l'assemblage des contacts intercellulaires, l'établissement de la polarité, l'exocytose ou la prolifération cellulaire [18] (*Figure 1*).

Un peu plus tard, Pierre Chardin s'intéressera aussi aux protéines de la famille Rho et caractérisera notamment la protéine Rnd1 (appelée aussi Rho6) [19]. La famille Rho (Rho, Rac, Cdc42, Rnd) compte une vingtaine de membres impliqués essentiellement dans la dynamique du cytosquelette d'actine (polymérisation de l'actine,

Figure 1. Les 5 grandes familles de la superfamille Ras : A. Ras, Ral. B. Rap, Rho, Rab. Les protéines cyclent entre une forme inactive liée au GDP, et une forme active liée au GTP. Ces transitions sont régulées par des GEF activatrices stimulant l'échange du GDP par le GTP, et des GAP qui stimulent leur activité GTPase et les ramènent à leur état inactif. Dans le cas des protéines Rho et Rab, des protéines appelées GDI (*GDP displacement inhibitor*) participent également au cycle GDP/GTP en les maintenant inactives dans le cytosol. PI3K : phosphoinositide 3-kinase.

nucléation et extension des filaments, etc.) (Figure 1) [20]. Elles induisent ainsi plusieurs types d'organisation de l'actine qui sont à l'origine de nombreux processus cellulaires (mise en place de la polarité, migration, croissance axonale, etc.).

La régulation des GTPases

Après leur identification, la question du fonctionnement des protéines Ras et apparentées est très vite posée. Elle

Pierre Chardin, directeur de recherche à l'Inserm, nous a quittés le 3 septembre 2019 à l'âge de 61 ans. Ses remarquables travaux au début de sa carrière dans le laboratoire d'Armand Tavitian (Faculté de médecine Lariboisière Saint-Louis) ont été à l'origine de la découverte de nombreux gènes et protéines apparentés aux proto-oncogènes et oncogènes *Ras* et qui constituent

aujourd'hui une famille de plus de 150 membres, appelée communément la superfamille *Ras*. Pierre a été à l'origine d'une « école française des petites protéines G », qui sera longtemps très active en organisant régulièrement des réunions et plusieurs congrès internationaux, dont des conférences Jacques Monod, et qui contribuera beaucoup à l'avancée de nos connaissances sur le rôle essentiel joué par ces protéines dans de multiples fonctions cellulaires, comme le transport, la migration ou encore la division cellulaire.

Dans les années 1990, Pierre, reconnu mondialement comme un des meilleurs spécialistes des petites GTPases, fait de nombreux séjours dans des laboratoires à l'étranger. Il rejoint le laboratoire de Marc Chabre à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (Sophia-Antipolis) où il créera sa propre équipe en 2000. Dans le Sud, son aventure scientifique rejoindra une aventure personnelle puisqu'il y fondera une famille et s'adonnera à sa grande passion de la montagne et de l'alpinisme. Puis, Pierre s'éloignera, pour diverses raisons, de la biologie moléculaire et cellulaire, et se tournera vers la paléontologie. Il n'a pas eu le temps de laisser sa marque dans ce champ de recherche entièrement nouveau pour lui mais on se souviendra d'une analyse pertinente qu'il a publiée dans *médecine/sciences : Nous sommes tous de « race » africaine* [23] (→). Il y a quelques mois, Pierre a décidé de nous quitter, au grand désarroi de sa famille, de ses collègues et amis, qui admiraient sa rigueur scientifique, sa curiosité, son intuition, et son immense talent.

(→) Voir le Repères de P. Chardin, *m/s* n° 2, février 2008, page 205

sera élucidée par la découverte de deux autres grandes familles de protéines qui régulent leur activité : les GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) et les GAP (*GTPase-activating proteins*) (Figure 1). L'affinité des protéines de la superfamille *Ras* pour le GDP et le GTP est très forte (de l'ordre du nM) et, de surcroît, la concentration du GTP est seulement environ 10 fois plus élevée que celle du GDP dans les cellules, rendant l'échange « spontané » du GDP pour le GTP relativement inefficace. Les GEF agissent en stabilisant une forme sans nucléotide des protéines *Ras* et apparentées, ce qui favorise l'échange du GDP pour le GTP et donc l'activation des GTPases. Leur activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP est par ailleurs très faible ; les protéines GAP stimulent fortement cette activité d'hydrolyse, permettant aux GTPases de revenir rapidement (dans des échelles de temps compatibles avec les processus biologiques qu'elles contrôlent) sous une forme inactive liée au GDP.

Pierre Chardin sera de cette aventure là aussi et souvent pionnier dans un contexte de compétition internationale très rude. Il caractérisera notamment le premier facteur d'échange de la protéine *Ras* chez l'homme, *hSos1* (l'homologue humain de la protéine de drosophile *son of sevenless*) [21], et participera à la mise au point d'une méthode

originale permettant de mesurer l'activité d'hydrolyse de *Ras* stimulée par *RasGAP* [22].

Conclusion

Quarante ans après la caractérisation de la première protéine *Ras*, les GTPases de la superfamille *Ras* occupent une place centrale dans la physiologie de la cellule. Alternant entre une forme liée au GDP et une forme liée au GTP, elles agissent comme des interrupteurs moléculaires permettant de réguler dans l'espace et le temps la plupart des fonctions cellulaires sinon toutes. Il n'est donc pas étonnant que des altérations de leur cycle et de leur(s) fonction(s) soient responsables de très nombreuses maladies, et en premier lieu de cancers. Un des enjeux majeurs pour le futur est de capitaliser l'énorme masse de connaissances fondamentales accumulées pour concevoir des inhibiteurs spécifiques et développer de nouvelles approches de thérapies ciblées. ♦

Pierre Chardin, a pioneer in the discovery of the genes and proteins of the *Ras* superfamily

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* 1964 ; 204 : 1104-5.
2. Kirsten WH, Mayer LA. Morphological responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 1967 ; 39 : 311-34.
3. Ellis RW, Defeo D, Shih TY, et al. The p21 *src* genes of Harvey and Kirsten sarcoma virus originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 1981 ; 292 : 506-11.
4. Shih TY, Weeks MO, Young HA, Scolnick EM. Identification of a sarcoma virus coded phosphoprotein in non producer cells transformed by Kirsten or Harvey murine sarcoma virus. *Virology* 1979 ; 96 : 64-79.
5. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 3637-40.
6. Goldfarb MP, Shimizu K, Perucho M, Wigler M. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 1982 ; 296 : 404-9.
7. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human E1 bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 1982 ; 297 : 474-8.
8. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, et al. T24 bladder carcinoma oncogene is an activated form to the normal human homologue of BALB and Harvey-*msv* transforming genes. *Nature* 1982 ; 298 : 343-7.
9. Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human *N-ras* gene. *Cell* 1983 ; 34 : 581-6.
10. Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic *ras* p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 5704-8.
11. Gallwitz D, Donath C, Sander C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human *c-ha*/bas proto-oncogene product. *Nature* 1983 ; 306 : 704-7.
12. Madaule P, Axel R. A novel *ras*-related gene family. *Cell* 1985 ; 41 : 31-40.
13. Chardin P, Tavitian A. The *ral* gene: a new *ras* related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J* 1986 ; 5 : 2203-8.

RÉFÉRENCES

14. Touchot N, Chardin P, Tavitian A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 8210-4.
15. Zahraoui A, Touchot N, Chardin P, Tavitian A. Complete coding sequences of the ras related rab 3 and 4 cDNAs. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 1204.
16. Zhen Y, Stenmark H. 2015. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 128 : 3171-6.
17. Pizon V, Chardin P, Lerosey I, et al. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the effector region. *Oncogene* 1988 ; 3 : 201-4.
18. Gloerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends Cell Biol* 2011 ; 21 : 615-23.
19. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, et al. A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 1998 ; 141 : 187-97.
20. Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 2006 ; 16 : 522-9.
21. Chardin P, Camonis JH, Gale NW, et al. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 1993 ; 260 : 1338-43.
22. Antony B, Chardin P, Roux M, Chabre M. GTP hydrolysis mechanisms in ras p21 and in the ras-GAP complex studied by fluorescence measurements on tryptophan mutants. *Biochemistry* 1991 ; 30 : 8287-95.
23. Chardin P. Nous sommes tous de « race » africaine ! *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 205-7.

TIRÉS À PART

B. Goud

Ce livre est l'histoire d'un parcours qui a mené à la caractérisation de l'hormone anti-müllérienne, l'AMH, hormone indispensable à la différenciation des sexes. Sans l'AMH, les filles n'auraient pas le monopole de l'utérus !

Substance testiculaire mystérieuse il y a cinquante ans, elle est aujourd'hui largement utilisée en endocrinologie pédiatrique et surtout en gynécologie pour évaluer les chances de fertilité féminine.

Nathalie Josso raconte, avec une clarté agrémentée d'une forte dose d'humour, les aléas de cette recherche, réussie à force de détermination, d'imagination et de hasards heureux. Son équipe a su attirer des collaborations du monde entier sans négliger pour autant le soutien inattendu d'un ouvrier de l'abattoir de la Villette, de la lapine Céleste et d'une bande de petits kangourous.

Ce témoignage, extrêmement accessible, devrait donner à de jeunes étudiants le goût et l'envie de la recherche.

Pédiatre de formation, Nathalie Josso s'est très vite orientée vers la différenciation sexuelle fœtale, menant de front une activité médicale en endocrinologie pédiatrique et des recherches fondamentales centrées sur l'hormone anti-Müllérienne. Entrée à l'Inserm peu d'années après la fin de son internat, elle y a réuni une équipe jeune et enthousiaste qui, d'abord à l'Ecole Normale Supérieure, puis à l'Université Paris-Sud, a permis à la France de conserver une place de leader dans le domaine de l'hormone découverte par Alfred Jost. Le Prix Andrea Prader, le Prix du Rayonnement Français et le Märta Philipson Award (Hôpital Karolinska de Stockholm) ont récompensé le travail de son groupe. Actuellement, Nathalie Josso partage son temps entre le laboratoire, la musique et les roses de son jardin.

ISBN : 978-2-7598-2080-1

142 pages

20 €

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France

Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : françois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Le sexe des anges : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

☐ Par carte bancaire :

☐ Visa

☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | Signature :