

## Les chaînes libres d'ubiquitine

### Une nouvelle cible virale pour l'induction de la voie NF- $\kappa$ B

Aurélien Schwob<sup>1-5</sup>, Renaud Mahieux<sup>1-5</sup>, Chloé Journo<sup>1-5</sup>

<sup>1</sup> CIRI (Centre International de Recherche en Infectiologie), équipe Oncogénèse Rétrovirale labellisée Ligue contre le Cancer, université de Lyon, Lyon, France ;

<sup>2</sup> Inserm U1111, Lyon, France ;

<sup>3</sup> École Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, Lyon, France ;

<sup>4</sup> Université Claude Bernard Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France ;

<sup>5</sup> CNRS UMR5308, Lyon, France.

chloe.journo@ens-lyon.fr



#### La poly-ubiquitination, régulateur essentiel de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B

La poly-ubiquitination est un processus essentiel de la signalisation cellulaire [1, 2] (→).

Cette modification post-traductionnelle consiste en la liaison covalente d'une chaîne d'ubiquitine, petite protéine de 76 acides aminés, à une protéine cible. Elle permet de réguler la formation de complexes de signalisation d'une façon extrêmement flexible et dynamique : flexible par la diversité des topologies de chaînes décrites, qui sont déterminées par la position de l'acide aminé de l'ubiquitine engagé dans la liaison à l'ubiquitine voisine et dictent le devenir de la protéine cible ; dynamique par les machineries d'ubiquitination, de dé-ubiquitination et d'édition des chaînes d'ubiquitine qui en assurent le caractère réversible. La poly-ubiquitination est catalysée par une machinerie  $\epsilon$ 1/ $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3<sup>1</sup> [1], dans laquelle les  $\epsilon$ 3 ubiquitine ligases, très diverses, sélectionnent les cibles à modifier.

L'importance de la poly-ubiquitination est particulièrement bien illustrée dans l'exemple de la voie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*), régulateur majeur de l'in-

flammation, de l'immunité et de la survie cellulaire. En l'absence de stimulation, les facteurs NF- $\kappa$ B sont retenus inactifs dans le cytoplasme par un inhibiteur. Dans la voie d'activation canonique<sup>2</sup>, en réponse à une stimulation (par exemple la présence d'IL[interleukine]-1 $\beta$ , Figure 1), l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  (*inhibitor of NF- $\kappa$ B*) est phosphorylé par le complexe IKK (*I $\kappa$ B kinase*) et dégradé par le protéasome [14] (→) ce qui autorise la trans-

location nucléaire des facteurs NF- $\kappa$ B et donc leur activité transcriptionnelle. L'activation d'IKK nécessite la kinase TAK1 (*transforming growth factor beta-activated kinase 1*) qui phosphoryle les sous-unités régulatrices IKK $\alpha$ / $\beta$ . La poly-ubiquitination non dégradative, et en particulier les chaînes en K63 et les chaînes linéaires en M1 (c'est-à-dire les chaînes dans lesquelles la lysine en position 63 [K63] ou la méthionine aminotermine [M1] de l'ubiquitine est engagée dans la liaison à l'ubiquitine voisine), est essentielle à l'activation du complexe IKK. Elle jouerait ici un rôle d'échafaudage en recrutant la kinase TAK1 *via* sa sous-unité régulatrice TAB2 (*TAK1 binding protein 2*), et le substrat IKK *via* sa sous-unité régulatrice NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*). Cependant, l'identité de la (ou des) protéine(s)

en amont d'IKK et de TAK1 modifiées par ubiquitination reste sujet à débat : si des formes modifiées d'IRAK1 (*interleukin 1 receptor-associated kinase 1*), TRAF6 (*TNF [tumor necrosis factor] receptor-associated factor 6*), TAB2, TAK1 et NEMO sont en effet détectées à la suite de la stimulation par l'IL-1 $\beta$  par exemple, aucune de ces protéines modifiées ne semble suffisante pour activer IKK *in vitro*.

Le rétrovirus humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1) constitue un excellent outil pour disséquer l'activation des voies NF- $\kappa$ B canonique et non-canonique. Ce rétrovirus est en effet l'agent étiologique de deux pathologies dans lesquelles l'activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B viro-induite est critique : une pathologie neuro-inflammatoire, la paraparésie spastique tropicale<sup>3</sup>, et une hémopathie maligne, la leucémie T de l'adulte [3] (→).

HTLV-1 code la protéine régulatrice Tax qui, outre son rôle essentiel de transactivateur viral, est un inducteur très puissant des voies NF- $\kappa$ B canonique et non-canonique. Dans la voie canonique, le modèle actuel suggère que le virus exploite la machinerie d'ubiquitination pour modifier Tax par des chaînes en K63, permettant ainsi l'interaction de Tax avec TAB2 et NEMO et l'activation d'IKK [4] (Figure 1). Cependant, si l'on sait que l'enzyme  $\epsilon$ 2 de conjugaison Ubc13 :

(→) Voir la Nouvelle de J.F. Peyron, *m/s* n° 12, décembre 2001, page 1327 et la Synthèse de E. Andermarcher *et al.*, *m/s* n° 2, février 2005, page 141

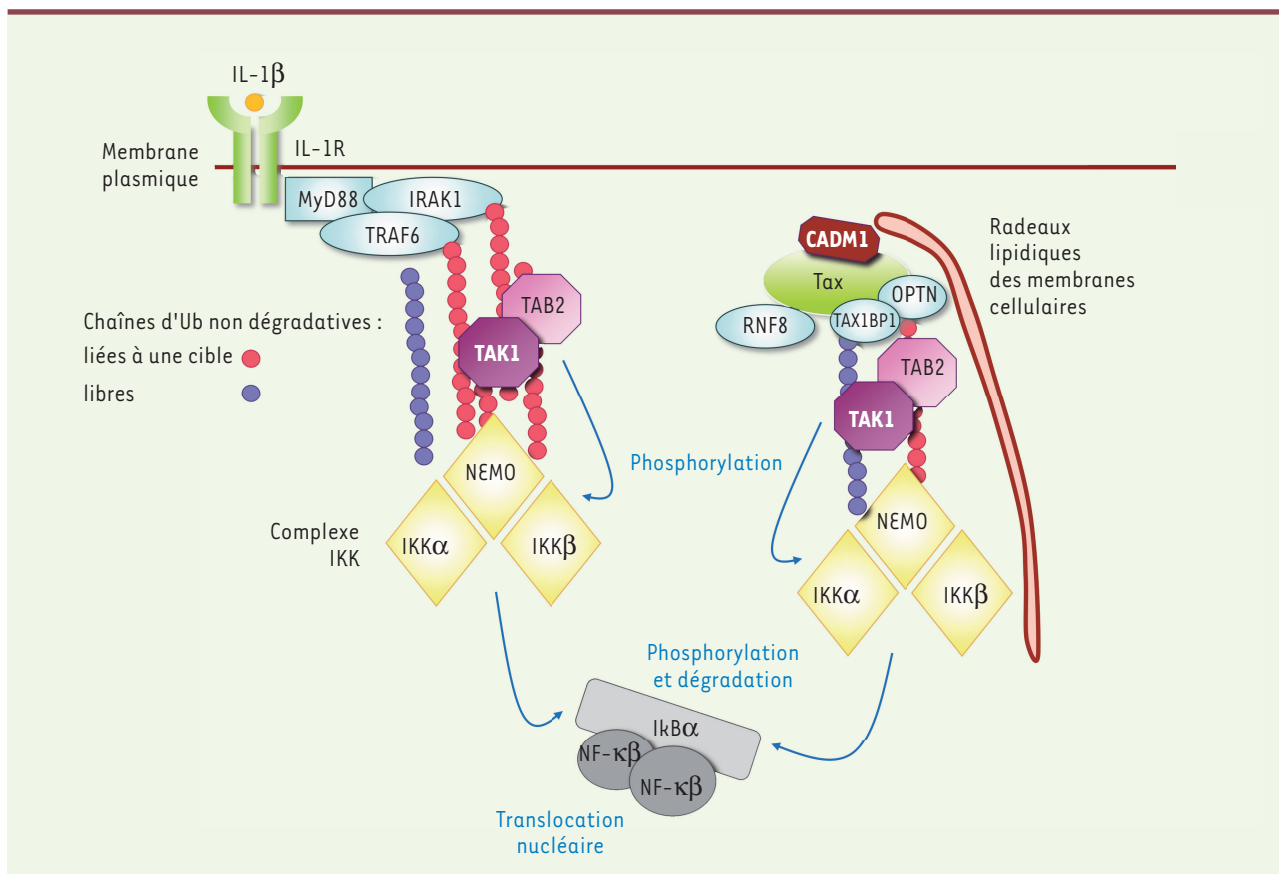
(→) Voir l'Éditorial de N. Benaroudj, *m/s* n° 2, février 2005, page 115

(→) Voir la Synthèse de G. Rizkallah *et al.*, *m/s* n° 8-9, juin-juillet 2015, page 629

<sup>1</sup> L'ubiquitination s'effectue en trois étapes : activation de l'ubiquitine par la formation d'une liaison thioester avec une enzyme activatrice de l'ubiquitine ( $\epsilon$ 1), puis transfert de l'ubiquitine sur une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine ( $\epsilon$ 2), et enfin transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible, catalysé par une ubiquitine ligase ( $\epsilon$ 3) qui forme la liaison peptidique entre l'ubiquitine et un résidu lysine ou la méthionine aminotermine de la protéine cible.

<sup>2</sup> L'activité des dimères NF- $\kappa$ B peut être régulée selon deux voies de signalisation dites classique (canonique) et alternative (non canonique). La voie classique s'applique aux dimères composés des sous-unités RelA(p65), c-Rel et/ou p50 qui sont retenus dans le cytoplasme par des inhibiteurs spécifiques. La voie alternative, activée par un nombre plus limité de récepteurs concerne les dimères associant RelB à p52 ou p50.

<sup>3</sup> Myélonuropathie démyélinisante caractérisée cliniquement, entre autres, par une paralysie progressive des jambes.



**Figure 1. Exploitation virale de la machinerie d'ubiquitination pour l'activation de la voie NF-κB.** Le modèle d'activation canonique de la voie par la protéine virale Tax d'HTLV-1 (partie droite) est comparé au modèle physiologique d'activation par l'IL-1β via le récepteur IL-1R (partie gauche). L'inhibiteur IκBα est phosphorylé par le complexe IKK et dégradé par le protéasome, induisant la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF-κB. Le complexe IKK est lui-même activé par phosphorylation par TAK1. La poly-ubiquitination non dégradative sous forme de chaînes d'ubiquitine (Ub) liées à des protéines cibles ou libres permettrait le recrutement de TAK1 via TAB2 et du complexe IKK via NEMO, au niveau de la membrane plasmique dans le cas d'une stimulation par l'IL-1β et au niveau de radeaux lipidiques des membranes cellulaires dans le cas d'une stimulation par Tax. Ho *et al.* [5] montrent pour la première fois l'exploitation des chaînes libres d'ubiquitine par une protéine virale, via l'activation de l'É3 ubiquitine ligase RNF8. CADM1 : *cell adhesion molecule 1* ; HTLV-1 : rétrovirus humain T-lymphotrope de type 1 ; IκBα : inhibiteur de NF-κB ; IKK : IκB kinase ; IL-1β : interleukine 1β ; IL-1R : récepteur de l'IL-1 ; IRAK1 : *interleukin 1 receptor-associated kinase 1* ; MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88* ; NEMO : *NF-κB essential modulator* ; NF-κB : *nuclear factor-kappa B* ; RNF8 : *ring finger 8 protein* ; OPTN : optineurine ; TAB2 : *TAK1 binding protein 2* ; TAK1 : *transforming growth factor beta-activated kinase 1* ; TAX1BP1 : *Tax1-binding protein 1* ; TRAF6 : *TNF [tumor necrosis factor] receptor-associated factor 6*.

Uev1a<sup>4</sup> est impliquée dans l'ubiquitination de Tax, la nature de l'É3 ubiquitine ligase ciblant Tax reste inconnue. Les travaux de l'équipe de Chou-Zen Giam apportent un éclairage nouveau sur cette question [5].

### Étude de l'activation de la voie NF-κB à partir de composants sub-cellulaires

Dans cette étude [5], les auteurs exploitent deux systèmes expérimentaux subcellulaires. Le premier consiste à utiliser des extraits cytosoliques de cellules HeLa<sup>5</sup> auxquels est ajoutée la protéine Tax purifiée afin de caractériser l'activation de la voie NF-κB. Le second,

utilisé pour l'étude fine de l'ubiquitination, est un système totalement *in vitro* reposant sur la co-incubation de protéines recombinantes.

L'activation canonique de la voie NF-κB dans les extraits cytosoliques en présence de Tax est vérifiée en étudiant la phosphorylation d'IκBα (Figure 1). Lors d'une sur-expression de l'hétérodimère É2 Ubc13 : Uev1a, l'activation de la voie NF-κB, due à Tax, augmente. En revanche, l'effet opposé est

<sup>4</sup> L'enzyme É2 de conjugaison est un hétérodimère formé du complexe Ubc13/Uev1a.

<sup>5</sup> Lignée cellulaire immortelle d'origine humaine issue de cellules cancéreuses.



observé pour des extraits cytosoliques de cellules dans lesquels l'expression de Ubc13 : Uev1a a été préalablement inhibée (Ubc13KD pour *knockdown*, c'est-à-dire rendu silencieux par interférence par shARN). Ces résultats valident le système expérimental et posent alors la question de la nature de l'É3 ubiquitine ligase exploitée par Tax.

### Identification de la protéine RNF8 comme partenaire de Tax et impact sur la voie NF-κB canonique

Les données de la littérature ont amené les auteurs à considérer la protéine RNF8 (*ring finger 8*) comme un candidat possible jouant le rôle d'É3 ubiquitine ligase utilisée par Tax. Après avoir confirmé l'interaction entre RNF8 et Tax dans un système cellulaire (lignée HEK 239T<sup>6</sup>), le système sub-cellulaire d'extraits cytosoliques a été utilisé pour tester l'impact fonctionnel de RNF8 sur l'activation de la voie NF-κB par Tax. Deux principaux résultats ont été obtenus. Tout d'abord, pour des extraits provenant de cellules exprimant peu ou pas RNF8 (cellules RNF8KD [*knockdown*] ou RNF8KO [*knockout*]), une diminution de la phosphorylation des facteurs IKKα/β et IκBα et de la dégradation d'IκBα induites par Tax, donc de l'activation canonique de NF-κB, a été observée. Inversement, l'expression ectopique de la protéine RNF8 a entraîné une augmentation de l'activation des facteurs TAK1 et IKK et une phosphorylation accrue d'IκBα. Ces résultats permettent donc de conclure au rôle potentialisateur de RNF8 dans l'activation canonique de la voie NF-κB par Tax.

### Implication des chaînes libres d'ubiquitine dans l'activation de la voie NF-κB par Tax

L'équipe de Chou-Zen Giam a ensuite déterminé l'impact de Tax sur l'activité ubiquitine ligase de RNF8 en mettant

à profit le système *in vitro*. RNF8 a été incubée avec une enzyme E1 d'activation de l'ubiquitine et de diverses combinaisons d'hétérodimères E2 contenant Ubc13, en présence ou en absence de Tax. Ces expériences ont montré que RNF8 catalyse la production de chaînes de di- et de poly-ubiquitine, plus spécifiquement en K63, et que Tax stimule cette activité. Cette activité de RNF8 est en accord avec ses effets sur l'activation de NF-κB, puisque les mutants de RNF8 qui ne provoquent pas d'augmentation de l'ubiquitination en K63 n'ont pas d'effet sur NF-κB. De manière inattendue cependant, aucune des protéines ajoutées au système *in vitro* ne présente une augmentation de son ubiquitination en K63 en présence de RNF8, y compris Tax. Ces éléments indiquent donc que Tax stimule la production, par RNF8, de chaînes libres d'ubiquitine en K63 non ancrées sur une cible protéique (*Figure 1*). Ces résultats s'inscrivent parfaitement dans une série de découvertes récentes, réalisées en particulier par l'équipe de Zhijian J. Chen. Celle-ci a identifié les chaînes libres d'ubiquitine en K63 comme de véritables seconds messagers intracellulaires, produits au sein de complexes de signalisation, qui sont directement responsables de l'activation, d'une part, des kinases TAK1 et IKK, au cours de l'activation de NF-κB [6], et, d'autre part, de celle des senseurs viraux intracellulaires RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) et MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*), au cours de la réponse innée antivirale [7, 8]. Les travaux de Ho et collaborateurs sont les premiers à montrer une exploitation virale de ce mécanisme [5].

### Perspectives

Comme pour la plupart des voies de signalisation étudiées à l'heure actuelle, la redondance des mécanismes régulateurs, l'implication des membranes comme plateformes d'assemblage et les interactions avec d'autres voies de signalisation restent des questions pré-

gnantes pour qui s'intéresse à la signalisation NF-κB. À la suite des résultats obtenus par Ho et ses collaborateurs [5], il sera important de déterminer la pertinence physiologique de l'ubiquitination de Tax et de la production de chaînes libres pour l'activation d'IKK. En effet, si RNF8 ne catalyse pas l'ubiquitination de Tax, les résultats de Ho *et al.* n'excluent cependant pas un rôle de l'ubiquitination de Tax par une autre É3 ubiquitine ligase en contexte cellulaire. Il sera intéressant d'analyser si les mutants non ubiquitinés de Tax conservent, ou non, leurs propriétés d'interaction et d'activation de RNF8. Les propriétés différentes de Tax codée par HTLV-1 et de Tax codée par HTLV-2, un rétrovirus apparenté mais très peu pathogène, qui active la voie NF-κB canonique par un mécanisme indépendant de son ubiquitination [9], pourraient également être expliquées par l'activation de RNF8. La comparaison du rôle de RNF8 dans l'activation canonique et non canonique de NF-κB par Tax, qui a été effleurée dans cette étude, nécessitera d'être approfondie par des expériences complémentaires.

Il sera aussi crucial de replacer ce mécanisme dans le contexte cellulaire. En effet, l'activation du complexe IKK par Tax se déroule au contact de radeaux lipidiques dans les membranes cellulaires (*Figure 1*), où Tax serait recrutée, entre autres, par CADM1 (*cell adhesion molecule 1*) [10, 11]. Or, une étude récente indique que l'association de NEMO aux chaînes libres d'ubiquitine favorise son association aux membranes [12]. Il sera donc important d'analyser le recrutement éventuel de RNF8 par Tax à la surface de ces membranes et l'importance des chaînes libres dans le recrutement du complexe IKK. Les autres protéines cellulaires modulant l'activation de NF-κB induite par Tax, comme l'optineurine et TAX1BP1 (*Tax1-binding protein 1*) [13], devront également être replacées dans ce modèle.

Enfin, les auteurs suggèrent que l'exploitation de RNF8 pourrait contribuer

<sup>6</sup> Lignée cellulaire transformée d'origine humaine issue de rein embryonnaire et comportant l'antigène T du virus simien 40 (SV40).

à d'autres fonctions de Tax telles que l'activation des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*), l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN et l'accumulation de défauts mitotiques, des processus dans lesquels TAK1 ou RNF8 ont été impliquées. Par la stimulation de la production de chaînes d'ubiquitine libres, Tax pourrait également interférer avec la signalisation en aval des senseurs viraux. La validation de ces hypothèses constituera une avancée importante pour la compréhension de l'exploitation virale des chaînes libres d'ubiquitine. ♦

### Unanchored ubiquitin chains: a new viral target for NF- $\kappa$ B activation

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Peyron JF. Les multiples rôles de l'ubiquitylation des protéines. *Med Sci (Paris)* 2001 ; 17 : 1327-9.
2. Andermarcher E, Bossis G, Farras R, et al. La dégradation protéasomique : de l'adressage des protéines aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 141-9.
3. Rizkallah G, Mahieux R, Dutarte H. Transmission intercellulaire de HTLV-1 : des mécanismes loin d'être complètement élucidés. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 629-37.
4. Kfoury Y, Nasr R, Journo C, et al. The multifaceted oncoprotein Tax : subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- $\kappa$ B activation. *Adv Cancer Res* 2012 ; 113 : 85-120.
5. Ho YK, Zhi H, Bowlin T, et al. HTLV-1 Tax stimulates ubiquitin E3 ligase, ring finger protein 8, to assemble lysine 63-linked polyubiquitin chains for TAK1 and IKK activation. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1005102.
6. Xia ZP, Sun L, Chen X, et al. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 2009 ; 461 : 114-9.
7. Jiang X, Kinch LN, Brautigam CA, et al. Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response. *Immunity* 2012 ; 36 : 959-73.
8. Zeng W, Sun L, Jiang X, et al. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* 2010 ; 141 : 315-30.
9. Journo C, Bonnet A, Favre-Bonvin A, et al. Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF- $\kappa$ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J Virol* 2013 ; 87 : 1123-36.
10. Huang J, Ren T, Guan H, et al. HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I $\kappa$ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 6208-17.
11. Pujari R, Hunte R, Thomas R, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax requires CADM1/TSLC1 for inactivation of the NF- $\kappa$ B inhibitor A20 and constitutive NF- $\kappa$ B signaling. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1004721.
12. Catici DA, Horne JE, Cooper GE, Pudney CR. Polyubiquitin drives the molecular interactions of the NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) by allosteric regulation. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 14130-9.
13. Journo C, Filipe J, About F, et al. NRP/Optineurin cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- $\kappa$ B by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog* 2009 ; 5 : e1000521.
14. Benaroudj N. Le protéasome, une machinerie cellulaire qui dégrade les protéines. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 115-6.

## NOUVELLE

### La levure à vin

#### Modèle d'étude des gènes et des maladies humaines dans un contexte personnalisé

Marie Filteau, Véronique Hamel, Christian R. Landry

Département de biologie, Institut de biologie intégrative et des systèmes (IBIS), PROTEO, Université Laval, 1030 de la Médecine, G0V1A6 Québec, Canada.  
christian.landry@bio.ulaval.ca

#### L'homologie comme outil en biologie médicale

De nombreux organismes servent de modèles dans le domaine biomédical pour l'étude des gènes et des maladies humaines. Pour des raisons historiques, ces modèles sont souvent des organismes étroitement associés aux humains et font donc partie de nos vies quotidiennes. Par exemple, la mouche à fruits, également appelée mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, que l'on retrouve en abondance dans les marchés de fruits, est utilisée depuis plus de 100 ans comme organisme

modèle pour comprendre les principes et les bases moléculaires de l'hérédité. Les autres modèles les plus couramment utilisés sont le ver rond *Caenorhabditis elegans*, le poisson zèbre *Danio rerio* et la souris *Mus musculus*. Ces modèles animaux ont un grand nombre de gènes homologues à ceux des humains, c'est-à-dire des gènes qui étaient présents chez leur ancêtre commun et qui ont été préservés. Cette homologie permet l'étude de ces gènes dans un contexte avantageux d'un point de vue expérimental. D'autres organismes que les animaux peuvent servir de modèle car les relations d'homologie remontent à des ancêtres encore plus lointains.

Ainsi, certains champignons microscopiques font aussi partie de ces modèles et ce, malgré le fait que l'ancêtre commun des humains et des champignons remontent à plus d'un milliard d'années ! C'est le cas de *Saccharomyces cerevisiae*, une levure très fortement associée à l'humain depuis des centaines d'années par la viticulture et la boulangerie [1, 2].

L'utilité de la levure comme modèle pour l'étude des gènes et maladies humaines a été démontrée à de nombreuses reprises par des travaux ciblés effectués depuis le milieu des années 1980 [3,4] (→). (→) Voir la Nouvelle de C. Jacq, *m/s* n° 5, mai 2004, page 506

Levure à vin : levure de bière ou de boulangerie.