

SUMO : une nouvelle voie de modification des protéines apparentée à l'ubiquitinylation

La fonction et la stabilité des protéines peuvent être modulées de façon très fine par différents processus de modifications post-traductionnelles. Ainsi, certains acides aminés spécifiques de protéines cibles sont modifiés par une grande variété de groupements : phosphates, lipidiques, méthyls, acétyls ou carbohydrates. Une des modifications les plus étudiées est la conjugaison à l'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés, dont la fonction majeure est de cibler ses substrats vers la principale machinerie cellulaire de dégradation des protéines, le protéasome [1]. Récemment, plusieurs protéines apparentées à l'ubiquitine telles que SUMO, Nedd8 ou Isg15 ont été caractérisées. Toutes ces protéines sont composées de 80 à 100 acides aminés et présentent une faible homologie avec l'ubiquitine (entre 18 et 58 %). Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la réparation de l'ADN, la dégradation des protéines, les mécanismes d'autophagie ou la progression dans le cycle cellulaire. La protéine de cette famille qui a suscité le plus d'intérêt ces dernières années est la protéine SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). Cette dernière a été identifiée dans des études indépendantes, d'où ses différentes appellations : Pic1, Sentrin, Smt3, GMP1, UBL1 ou DAPI. Le nombre grandissant de substrats modifiés par SUMO semble indiquer que cette modification des protéines, appelée « sumoylation », est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Ses conséquences sur l'activité biologique des protéines cibles commencent à peine à être clarifiées, et il semble qu'elle puisse exercer des

effets différents selon les substrats. L'étude approfondie de deux protéines conjuguées par SUMO, Ran-GAP et PML, suggère notamment un rôle de cette nouvelle voie de modification post-traductionnelle dans le ciblage des protéines vers différentes sous-structures cellulaires.

Ubiquitinylation et sumoylation : un air de famille

Comme pour l'ubiquitine, la conjugaison de la protéine SUMO à son substrat implique la formation d'une liaison covalente isopeptidique entre un résidu glycine présent à son extrémité C-terminale et une lysine de la protéine substrat. Elle se fait selon un processus enzymatique analogue à celui de l'ubiquitinylation (*figure 1*) mais utilise des enzymes apparemment différentes. Trois étapes se succèdent au cours du mécanisme classique d'ubiquitinylation (*figure 1A*) [1]. L'ubiquitine (Ub), clivée à partir de son précurseur polypeptidique, est d'abord activée par la formation d'une liaison thioester de haute énergie entre son extrémité C-terminale et un résidu cystéine présent dans le site catalytique d'une enzyme d'activation E1, cette étape étant entièrement dépendante de l'ATP. L'ubiquitine est alors transférée sur un résidu cystéine de l'une des nombreuses enzymes de type E2, ou Ubc (pour *ubiquitin conjugating enzyme*). Les E2 confèrent un premier niveau de spécificité dans la reconnaissance des substrats. Bien que les E2 puissent parfois transférer directement l'ubiquitine sur ses protéines cibles, cette réaction requiert généralement un facteur additionnel appelé E3 ou *ubiquitin protein ligase*. Les protéines

et les complexes protéiques ayant une activité E3 interviennent dans la reconnaissance et donc dans le choix du substrat protéique à ubiquitinyler (pour revue, voir [1]). Dans la majorité des cas, le substrat subit une polyubiquitinylation, une chaîne d'ubiquitine se formant à partir de la première ubiquitine conjuguée à la protéine cible. Toutefois, dans de nombreuses situations, une seule molécule d'ubiquitine est fixée sur sa protéine cible. Cette mono-ubiquitinylation semble impliquée, non plus dans le ciblage des protéines vers le protéasome, mais dans d'autres processus cellulaires sans relation apparente avec le protéasome, par exemple l'endocytose. Enfin, la conjugaison par l'ubiquitine est un phénomène réversible du fait de l'existence d'hydrolases (UBP pour *ubiquitin-specific protease*) qui entraînent la « dé-ubiquitinylation » du substrat. D'autres hydrolases, les UCH (*ubiquitine C-terminal hydrolase*) assurent parallèlement la maturation de l'ubiquitine à partir de précurseurs polypeptidiques [2].

En ce qui concerne SUMO, un certain nombre d'enzymes ont été récemment identifiées (*figure 1B*). L'activité E1 est assurée par un hétérodimère formé de deux sous-unités appelées Aos1 et Uba2 [3], la première présentant une homologie avec l'extrémité N-terminale de l'enzyme E1 de l'ubiquitine, et la seconde étant homologue à sa portion C-terminale. Ainsi, l'enzyme hétéromérique E1 de la voie SUMO, Aos1/Uba2, correspondrait à une version clivée de l'enzyme unique E1 spécifique de la voie ubiquitine. Concernant l'activité E2, de nombreuses équipes ont montré qu'une

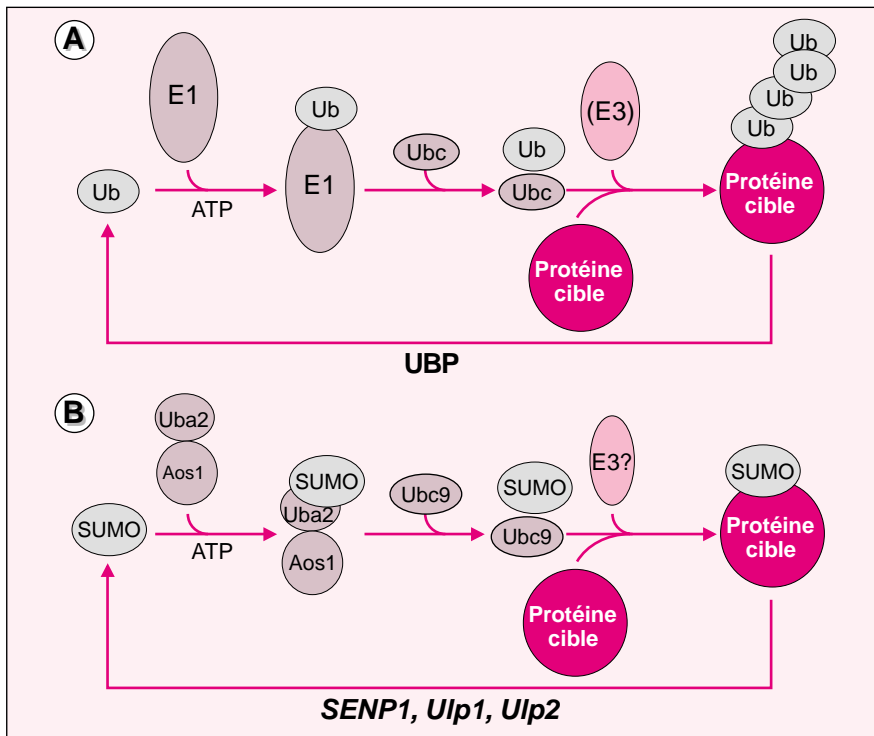


Figure 1. **Les cascades d'enzymes impliquées dans l'ubiquitinylation (A) et la sumoylation (B).** Les deux processus enzymatiques sont analogues mais impliquent des enzymes différentes. Une enzyme de type E1 active l'ubiquitine (Ub) ou SUMO et les fixe par une liaison thioester, l'enzyme E1 de la voie SUMO étant composée d'un hétérodimère entre Uba2 et Aos1. Ub ou SUMO sont alors transférées, toujours par l'intermédiaire d'une liaison thioester, sur une enzyme E2 (une des nombreuses Ubc dans le cas de Ub, Ubc9 dans le cas de SUMO). Dans la grande majorité des cas, un troisième facteur E3 (ou ubiquitin protein ligase) est nécessaire pour l'ubiquitinylation des protéines cibles. Pour la sumoylation, la nécessité d'un E3 n'a pas encore été établie. Des hydrolases spécifiques de l'ubiquitine (UBP) ou de SUMO (SENP1, Ulp1 et 2) sont capables de déconjuguer les protéines substrats.

protéine de la famille des Ubc, la protéine Ubc9, agissait spécifiquement dans la conjugaison par SUMO et non pas dans celle par l'ubiquitine comme on avait pu le penser. Il reste à déterminer si des enzymes équivalentes aux E3 de la voie ubiquitine interviennent dans la voie SUMO, et à préciser les mécanismes permettant une reconnaissance spécifique des substrats. Cette cascade enzymatique aboutit à la formation d'une liaison isopeptidique entre une lysine de la protéine cible et l'extrémité C-terminale de la protéine SUMO. Cependant, à la différence de l'ubiquitine qui peut former une chaîne de «poly-ubiquitine» sur un même résidu, une seule molécule SUMO peut modifier une lysine cible particulière. Des

études par mutagenèse de plusieurs protéines substrats de SUMO ont montré que la lysine utilisée par la réaction est souvent incluse dans une courte séquence faiblement conservée, le motif LKXE. Les cellules contenant relativement peu de molécules SUMO non conjuguées, il est possible que des enzymes analogues aux UBP soient capables de détacher SUMO de ses protéines cibles et jouent un rôle de régulation important. Deux hydrolases ont en effet été récemment identifiées chez la levure (Ulp1 et Ulp2) et deux autres chez l'homme (SENP1 et SUSP1) [4-7] mais leur spécificité vis-à-vis d'un ou de plusieurs substrats(s) ou leur implication éventuelle dans la maturation de SUMO restent à déterminer.

ner. En effet, l'extrémité C-terminale de SUMO doit être hydrolysée juste après deux résidus glycine, libérant ainsi entre 2 et 5 résidus présents à l'extrémité C-terminale de SUMO, pour être activée et former une liaison thioester avec l'enzyme E1 de la voie de sumoylation. Il est également important de noter que l'état de phosphorylation de nombreuses protéines cibles semble influencer leur sumoylation. Par ailleurs, les cellules de mammifères contiennent au moins trois gènes codant pour des homologues de SUMO (*SUMO-1*, *-2* et *-3*) présentant entre 66 % et 95 % d'homologie entre eux. La modification par chacune de ces isoformes semble répondre différemment aux stress environnementaux (choc thermique ou stress oxydatif) [8]. Ainsi, la cellule dispose de nombreux niveaux de régulation de l'état de sumoylation des protéines substrats.

La protéine SUMO : un nouveau signal d'adressage intracellulaire ?

La protéine SUMO a été identifiée pour la première fois comme « modificateur post-traductionnel » en 1996 par deux groupes étudiant les mécanismes d'import des protéines dans le noyau [9, 10]. Le passage des protéines à travers l'enveloppe nucléaire s'effectue grâce à la présence de complexes protéiques localisés au niveau des pores nucléaires. Ran, une petite GTPase de la superfamille de Ras, est l'un des facteurs nécessaires au transport actif nucléaire (*m/s 1998, n° 1, p. 85*). La conversion de sa forme liée au GTP en une forme liée au GDP est activée par la protéine RanGAP (*Ran GTPase-activating protein*). Cette dernière est localisée à la fois dans le cytoplasme et au niveau de l'enveloppe nucléaire où elle forme un complexe stable avec une protéine des pores nucléaires, RanBP2 (*figure 2A*). Les deux équipes ont montré que la conjugaison covalente de RanGAP par SUMO était nécessaire à son interaction avec RanBP2 et que la localisation cellulaire de cette protéine dépendait de sa sumoylation : la forme non conjuguée de RanGAP est en effet localisée dans le cytoplasme tandis que la

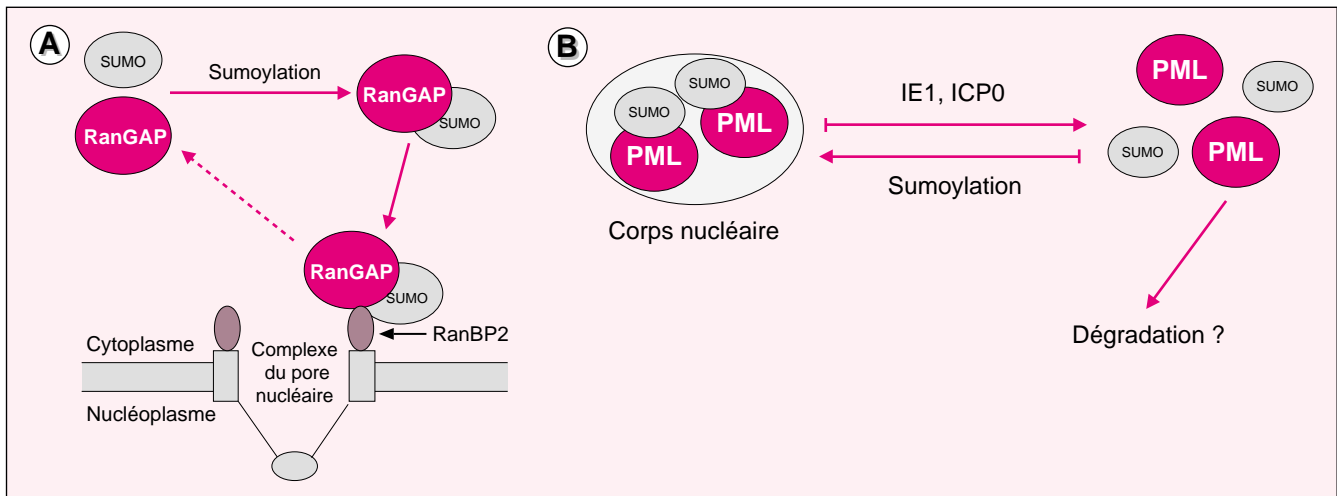


Figure 2. **Un rôle pour SUMO dans l'adressage intracellulaire?** **A. La sumoylation de RanGAP.** RanGAP existe sous deux formes dans la cellule : l'une cytoplasmique n'est pas conjuguée, l'autre, présente au niveau des pores nucléaires, est modifiée par SUMO. La sumoylation de RanGAP dans le cytosol entraîne son adressage vers les pores nucléaires où elle est capable, probablement du fait d'un changement conformationnel, d'interagir avec RanBP2. **B. La sumoylation de PML est nécessaire à l'intégrité des corps nucléaires.** La protéine PML, conjuguée à SUMO, est adressée vers les corps nucléaires. Certaines protéines virales comme IE1 (cytomégalovirus) ou ICP0 (herpes simplex virus) sont capables de dé-sumoiler les protéines PML (ainsi que les protéines SP100) et de conduire au désassemblage des corps nucléaires.

forme conjuguée à SUMO est uniquement présente au niveau des pores nucléaires. Il est possible que la conjugaison de RanGAP soit responsable d'un changement de sa conformation et expose ainsi un site de liaison à RanBP2. Ces résultats indiquaient donc que la sumoylation des protéines pouvait jouer un rôle dans leur localisation cellulaire.

Cette hypothèse a été renforcée par l'observation que la protéine PML (*promyelocytic leukemia*) avait un rôle semblable à celui de SUMO. PML est le composant majeur, avec la protéine SP100, des corps nucléaires PML (appelés également *nuclear bodies*, NB). Ces structures, dont le nombre varie de cinq à vingt dans le noyau interphasique, ont un diamètre d'environ 0,5 µm et sont étroitement associées à la matrice nucléaire [11, 12]. L'étude des corps nucléaires, identifiés il y a une trentaine d'années par microscopie électronique, a suscité un regain d'intérêt ces dix dernières années du fait de la découverte de leur implication dans une hémopathie maligne, la leucémie aiguë à promyélocytes. En effet, l'expression de l'oncoprotéine de fusion PML-RAR α résultant de la

translocation t(15;17) caractéristique des promyélocytes dans cette leucémie entraîne la désagrégation des corps nucléaires [13]. Le traitement des patients par l'acide rétinoïque provoque des rémissions caractérisées par la différenciation des promyélocytes en polynucléaires, rémissions qui s'accompagnent d'une réorganisation des corps nucléaires PML dans les cellules malignes. Ceci indique que l'intégrité de ces structures pourrait être critique pour certains aspects de la différenciation cellulaire. Plusieurs études ont montré que les protéines PML et SP100 subissent une modification covalente par SUMO et que la sumoylation de PML est indispensable à l'intégrité des corps nucléaires [15-17]. En effet, seule la forme conjuguée de PML est capable de s'agréger correctement et d'entraîner ainsi la formation de corps nucléaires structurellement intacts (*figure 2B*). Par ailleurs, les corps nucléaires PML sont extrêmement sensibles à l'infection par certains virus à ADN comme le virus herpès simplex, le cytomégalovirus ou les adénovirus [14]. Cette sensibilité pourrait être due à la capacité qu'ont certaines protéines précoces

de ces virus, comme la protéine ICP0 du virus herpès simplex ou la protéine IE1 du cytomégalovirus, de dégrader les formes modifiées des protéines PML et SP100 ou de les déconjuguer entraînant ainsi la désagrégation des corps nucléaires [18, 19]. De plus, la protéine IE1 est elle-même une cible de SUMO ce qui pourrait expliquer son adressage préférentiel vers les corps nucléaires, provoquant ainsi la désagrégation de ces derniers.

D'autres exemples semblent aussi indiquer que la sumoylation de certaines protéines est impliquée dans leur localisation vers un compartiment particulier de la cellule. Ainsi, la protéine HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) [20], une protéine kinase nucléaire corépresseur de facteurs de transcription à homéodomaine, est localisée dans des structures nucléaires distinctes des corps nucléaires PML, et cette localisation dépend de sa conjugaison par SUMO. Enfin, ce rôle de la sumoylation ne semble pas restreint aux mammifères. En effet, chez la drosophile, la conjugaison par SUMO de la protéine « dorsal » permet son importation dans le noyau [21]. De

plus, au cours de l'embryogenèse de drosophiles déficientes pour l'activité Ubc9, la protéine *bicoïd*, un facteur de transcription impliqué dans l'expression différentielle des gènes de segmentation (*m/s* 1996, n° 5, p. 639), n'est plus transportée vers le noyau, entraînant ainsi des défauts de segmentation au cours du développement [22].

Vers de multiples fonctions pour la voie SUMO

Si les fonctions exactes de la sumoylation restent encore largement inconnues, de nombreuses pistes commencent à être explorées. Récemment, une hypothèse a été formulée par le groupe de Ron Hay [23], qui a montré que l'inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B, I κ B α , un substrat bien connu de l'ubiquitine, est aussi modifié par SUMO. L'ubiquitine et SUMO ciblant le même résidu lysine de I κ B α , les auteurs suggèrent que SUMO pourrait entrer en compétition avec l'ubiquitine vis-à-vis d'un même substrat, empêchant celui-ci

d'être ubiquitinylé et dégradé. Une observation identique a été faite pour la protéine mdm2 [24]. Cette hypothèse est certes séduisante, mais il n'est pas certain qu'elle reflète un mécanisme général dans la mesure où, pour les autres substrats de SUMO, aucun lien entre ubiquitinylation et sumoylation n'a pu être établi.

De nombreuses cibles de SUMO ont été identifiées durant cette dernière année (*figure 3*) et l'étude de protéines mutantes ne pouvant plus être conjuguées à SUMO permet d'analyser les conséquences de la sumoylation. C'est ainsi qu'il a été proposé que la modification de la protéine p53 augmenterait son activité transcriptionnelle ainsi que son activité pro-apoptotique [25-27]. Au contraire, l'activation de la protéine c-jun serait accompagnée de sa « désumoylation » [27]. Enfin, ce schéma risque de se compliquer encore dans le futur car de très nombreuses protéines sont capables d'interagir avec l'enzyme E2 Ubc9 de la voie SUMO, suggérant qu'elles sont probablement elles-

mêmes des substrats de SUMO (*figure 3*).

De nombreux aspects concernant le rôle et la régulation de cette nouvelle voie de modification restent encore méconnus. La sumoylation a-t-elle toujours la même fonction, comme l'adressage vers un compartiment cellulaire particulier, ou au contraire, à l'instar de la phosphorylation, exerce-t-elle des fonctions multiples? Quels sont les mécanismes qui conduisent aux modifications éventuelles d'activité des protéines conjuguées à SUMO? Existe-t-il une hétérogénéité fonctionnelle entre les différents isoformes SUMO-1, -2 et -3? Quels sont les signaux contrôlant la sumoylation, et existe-t-il notamment une interférence avec les autres voies de modification des protéines comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation? ■

RÉFÉRENCES

1. Coux O, Piechaczyk M. Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *Med Sci* 2000; 16: 623-9.
2. Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 1997; 11: 1245-56.
3. Johnson ES, Schwiendorst I, Dohmen RJ, Blobel G. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J* 1997; 16: 5509-19.
4. Li SJ, Hochstrasser M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 1999; 398: 246-51.
5. Li SJ, Hochstrasser M. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2367-77.
6. Gong L, Millas S, Maul GG, Yeh ET. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 2000; 275: 3355-9.
7. Kim KI, Baek SH, Jeon YJ, et al. A new SUMO-1-specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. *J Biol Chem* 2000; 275: 14102-6.
8. Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 2000; 275: 6252-8.

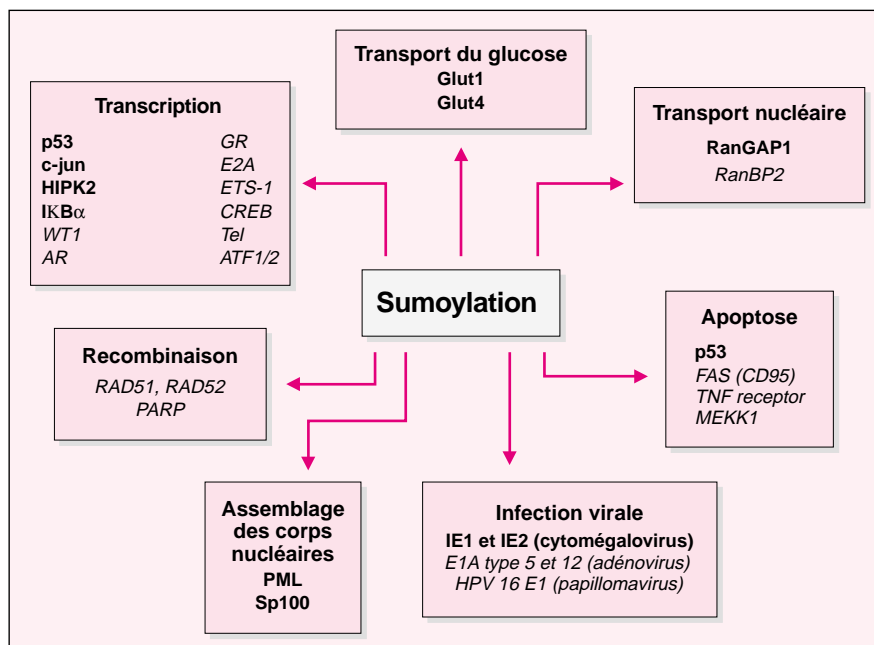


Figure 3. **La sumoylation au centre de nombreux processus biologiques.** Les protéines de mammifères connues pour être modifiées par SUMO sont représentées en caractères gras. Les protéines interagissant avec l'enzyme E2 Ubc9 et donc susceptibles d'être des substrats potentiels pour SUMO sont représentées en italique.

RÉFÉRENCES

9. Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 1997; 88: 97-107.
10. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1996; 135: 1457-70.
11. Seeler JS, Dejean A. The PML Nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 362-7.
12. Zhong S, Salomoni P, Pandolfi PP. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E85-90.
13. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque: le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.
14. Maul GG. Nuclear domain 10, the sites of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 1998; 20: 660-7.
15. Müller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 1998; 17: 61-70.
16. Sternsdorf T, Jensen K, Will H. Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 1997; 139: 1621-34.
17. Zhong S, Muller S, Ronchetti S, et al. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 2000; 95: 2748-52.
18. Everett RD, Freemont P, Saitoh H, et al. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependant loss of several PML isoforms. *J Virol* 1998; 72: 6581-91.
19. Müller S, Dejean A. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 1999; 73: 5139-43.
20. Kim YH, Choi CY, Kim, Y. Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12350-5.
21. Bhaskar V, Valentine SA, Courey AJ. A functional interaction between dorsal and components of the smt3 conjugation machinery. *J Biol Chem* 2000; 275: 4033-40.
22. Epps JL, Tanda S. The drosophila semushi mutation blocks nuclear import of bicoid during embryogenesis. *Curr Biol* 1998; 8: 1277-80.
23. Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 1998; 2: 233-9.
24. Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; 101: 753-62.
25. Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, et al. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 1999; 18: 6462-71.
26. Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, et al. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 1999; 18: 6455-61.
27. Muller S, Berger M, Lehembre F, et al. SUMO-1 modification of c-jun and p53 is co-regulated with ubiquitination in a phosphorylation-dependant manner. *J Biol Chem* 2000; 275: 13321-9.

François Lehembre
Anne Dejean

Unité de recombinaison et d'expression génétique, Inserm U. 163, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.