

Régulation de la phospholipase D par les protéines G de faible poids moléculaire : réalités et perspectives

La phospholipase D (PLD) est exprimée dans une grande variété de tissus et cellules incluant le granulocyte. Les données sur les mécanismes d'activation de la PLD s'accumulent et démontrent une grande complexité. Plusieurs cofacteurs protéiques semblent nécessaires à son activité. Cependant, l'enzyme n'a toujours pas été purifiée et il n'existe que peu d'informations concernant son poids moléculaire. La PLD a une spécificité marquée pour la phosphatidylcholine (PtdCho) bien qu'elle puisse hydrolyser la phosphatidyléthanolamine dans certaines conditions. L'hydrolyse de la PtdCho par la PLD conduit à une libération de choline et une accumulation d'acide phosphatidique dans les cellules. Une caractéristique spécifique de cette phospholipase est qu'elle catalyse des réactions de transphosphatidylation en présence d'alcools primaires. Cette réaction d'échange de base conduit à la formation d'un phospholipide qui n'est habituellement pas présent dans la cellule. Cette propriété est utilisée pour mesurer l'activité PLD dans les cellules. Par exemple, en présence d'éthanol, l'enzyme induit une formation de phosphatidyléthanol aux dépens de l'acide phosphatidique. Plusieurs réponses fonctionnelles du granulocyte semblent dépendre d'une accumulation intracellulaire d'acide phosphatidique. En effet, une réduction par l'éthanol des niveaux d'acide phosphatidique observés en réponse aux facteurs chimiotactiques a permis de mettre en évidence un rôle potentiel

de la PLD au niveau des mécanismes de la sécrétion et de la production de l'anion superoxyde.

L'activation de la PLD nécessite plusieurs facteurs protéiques localisés, soit dans le cytosol, soit à la membrane plasmique des cellules. Plusieurs acteurs impliqués dans son activation ne sont d'ailleurs toujours pas isolés et des recherches sont en cours dans plusieurs laboratoires pour les caractériser. Les mécanismes d'activation de la PLD mettent en jeu de nombreux systèmes de contrôle, notamment les grandes protéines G trimériques et les petites protéines G monomériques. Un couplage physique entre la PLD et une protéine G trimérique semble de plus en plus improbable. De nombreuses données expérimentales suggèrent maintenant que la PLD est activée par les petites protéines G monomériques en réponse à des signaux relayés par les protéines G trimériques. Deux publications importantes ont identifié simultanément un des facteurs solubles comme étant le facteur d'ADP-ribosylation, l'ARF (*ADP-ribosylation factor*, *m/s* n° 3, vol. 10, p. 364) [1, 2]. Les ARF sont des petites protéines G qui avaient été identifiées à l'origine comme des cofacteurs impliqués dans l'ADP-ribosylation de G_{α} par la toxine cholérique, une protéine G trimérique impliquée dans l'activation de l'adényl cyclase [3]. Il est à noter que le rôle joué par l'ARF, l'ARF1 en particulier, dans la régulation du transport golgien et le trafic vésiculaire a été clairement démontré. Ces travaux suggèrent que l'acti-

vation de la PLD par l'ARF serait plutôt liée aux mécanismes de la sécrétion qu'à celui de l'explosion oxydative chez le granulocyte [4].

Sur un plan purement expérimental, on observe deux *pools* d'ARF dans les cellules. La majorité de l'ARF se trouve dans le cytosol, tandis que l'autre partie est associée aux membranes. C'est un système en perpétuel équilibre : l'ARF membranaire correspondrait à la forme liée au GTP, inversement l'ARF-GDP serait cytosolique. Ce cycle semble être sous la dépendance d'un facteur d'échange nucléotidique GDP/GTP et d'une protéine GAP (pour *GTPase activating protein*) dont les caractéristiques biochimiques restent à préciser. Il faut souligner que les analogues non hydrolysables du GTP, tel le GTP γ S, sont très utiles dans ces études. En effet, ils favorisent non seulement une translocation de l'ARF à la membrane mais également une fixation beaucoup plus stable de celui-ci à ce compartiment. L'ARF est séquestré au niveau de la membrane dans une conformation active permettant une interaction prolongée avec son effecteur. Ainsi, on a constaté qu'une diminution du GTP, mais également de l'ATP intracellulaire, provoque une redistribution de l'ARF membranaire dans le cytosol. Cette propriété a été avantageusement utilisée par l'équipe de S. Cockcroft (Londres, Grande-Bretagne) pour vider de leur contenu en ARF les cellules préalablement perméabilisées. L'activation par le GTP γ S de la PLD a ensuite pu être obtenue en ajoutant simplement

aux cellules perméabilisées et lavées de leur contenu, de l'ARF de fusion ou purifié du cerveau de rat. L'ARF est myristoylé sur sa glycine N-terminale. Cette modification post-traductionnelle semble essentielle pour observer *in vitro* une activation optimale de la PLD par les nucléotides guanyliques [2]. Ainsi, la myristoylation de l'ARF, en augmentant le caractère hydrophobe de son segment N-terminal, favoriserait son association à la membrane ou des interactions protéine-protéine avec son effecteur, la PLD [5]. Bien que la présence de PLD ou d'isoenzyme de la PLD dans le cytosol ne puisse être totalement exclue, il est communément admis que la PLD est une protéine membranaire. La vision simpliste d'une PLD dont l'activité serait uniquement contrôlée par l'ARF s'est compliquée par la mise en évidence du rôle des petites protéines G de la famille rho dans la voie d'activation de la PLD. La participation des protéines rho membranaires a été démontrée par l'approche qui consiste à moduler leur activité par des facteurs d'échanges nucléotidiques inhibiteurs (rho GDI) ou stimulateurs (smg GDS). Ces facteurs d'échanges GDP/GTP sont relativement spécifiques de la famille rho. Ainsi l'addition de rho GDI inhibe l'activation de la PLD par les nucléotides guanyliques, alors que smg GDS la stimule [6]. La protéine rho GDI favoriserait l'extraction des petites protéines G des membranes et formerait avec elles un complexe soluble. Les protéines G, ainsi solubilisées, ne seraient donc plus disponibles pour interagir avec l'effecteur. Cette stratégie, utilisée par le groupe de JH Exton (Nashville, TN, USA), démontre une forte réduction de l'activité PLD stimulée par l'addition de GTP γ S sur des membranes traitées avec rho GDI. L'addition de la protéine G recombinante rhoA aux membranes « lavées » avec rho GDI reconstitue la réponse [7]. Ces résultats suggèrent que la protéine rho A est impliquée dans l'activation d'une PLD associée à la membrane. Il existe donc deux petites protéines G impliquées dans l'activation de la PLD. Quant à savoir si les fonctions de ces

voies d'activation sont différentes, il n'y a pas encore de réponse à cette question. Il est toutefois possible de penser que deux mécanismes distincts puissent agir en synergie pour stimuler la PLD.

Les polyphosphoinositides sont des constituants importants de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Bien que le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) ne soit pas le substrat préférentiel de la PLD, il joue un rôle majeur dans sa régulation. En effet, le PIP₂ semble être un cofacteur indispensable à l'activité de cette phospholipase. Ainsi, la néomycine, un antibiotique qui a une forte affinité pour le PIP₂, inhibe la PLD membranaire [8]. Enfin, l'ajout de PIP₂ est nécessaire pour obtenir une activité optimale de la PLD dans le modèle expérimental où l'enzyme est activée par l'ARF en présence de micelles de phospholipides [2]. La participation des protéines G dans la régulation de la synthèse du PIP₂ a déjà été démontrée. Des études récentes suggèrent la participation de rhoA dans la production de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate et de phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [9, 10]. Cette synthèse de polyphosphoinositides correspondrait à la stimulation d'activités, respectivement, phosphatidylinositide 5-kinase et phosphatidylinositide 3-kinase (PI 3-kinase). Cette dernière observation est particulièrement intéressante dans la mesure où l'activité de la PLD dans les cellules stimulées par les facteurs chimiotactiques est inhibée par la wortmannin [11], un inhibiteur spécifique de la PI 3-kinase. L'hypothèse que ces kinases puissent être impliquées dans la régulation de la PLD est très séduisante car il est admis que l'activation de la phospholipase est en partie dépendante de la présence d'ATP. Des études complémentaires concernant la définition de la relation entre rhoA, ARF et PLD seront nécessaires pour établir un modèle tenant compte de l'ensemble des observations faites, tant au niveau du mécanisme d'activation de la PLD que du transport vésiculaire intramembranaire.

S.G.B.

1. Cockcroft S, Thomas GMH, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong Q, Hsuan JJ. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 1994 ; 263 : 523-6.
2. Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein stimulates phospholipase D activity. *Cell* 1993 ; 75 : 1137-44.
3. Pauloin A, Bréfeldine A, protéines-G et transports membranaires golgiens. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 917-25.
4. Kahn RA, Yucel JK, Malhotra V. ARF signaling: a potential role for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 1993 ; 75 : 1045-8.
5. Boutin JA. La N-myristoyl transférase, carrefour entre virologie et oncologie: une voie d'accès à des anticancéreux et des antiviraux d'un genre nouveau. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 684-92.
6. Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD. Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 21509-12.
7. Malcolm KC, Ross AH, Qiu RC, Symons M, Exton JH. Activation of rat phospholipase D by the small GTP-binding protein rhoA. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 25951-4.
8. Liscovitch M, Chalifa V, Pertile P, Chen CS, Cantley LC. Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 21403-6.
9. Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. The small GTP-binding protein rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994 ; 79 : 507-13.
10. Zhang J, King WG, Dillon S, Hall A, Feig L, Rittenhouse SE. Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein rhoA. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 22251-4.
11. Naccache PH, Caon AC, Gilbert C, Gaudry M, Roberge CJ, Poubelle PE, Bourgoin S. Inhibition of tyrosine phosphorylation by wortmannin in human neutrophils. Dissociation from its inhibitory effects on phospholipase D. *Lab Invest* 1993 ; 69 : 19-23.