

*Signal,
hormones
et métabolisme*

Rôle du domaine PH dans le recrutement membranaire des facteurs d'échange pour les petites protéines G

Le « domaine PH » est un module structural d'une centaine d'acides aminés qui a été découvert dans la pleckstrine, principal substrat de la protéine kinase C (PKC) dans les plaquettes (PH = *pleckstrin homology*). On trouve ces domaines PH dans près d'une centaine de protéines différentes. Certaines sont impliquées dans la transmission du signal : kinases, phospholipases C, protéines GAP (*GTPase activating protein*), facteurs d'échange pour les petites protéines G, protéines adaptatrices, d'autres sont associées au cytosquelette [1-3].

Domaine PH et PtdInsP₂

Le domaine PH le mieux caractérisé aux points de vue structural et fonctionnel est celui de la phospholipase C δ (PLCδ). Ce domaine PH porte un site de liaison pour le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns4,5P₂), principal substrat de la PLCδ. Dans ce cas, le domaine PH sert donc à recruter l'enzyme dans les régions de la membrane riches en PtdIns4,5P₂, son substrat [4, 5]. D'autres domaines PH, comme ceux de la pleckstrine, de la β-spectrine, ou de la dynamine sont aussi capables de reconnaître le groupement inositol phosphate du PtdIns4,5P₂ à la surface des membranes (ou l'inositol-1,4,5 trisphosphate, en solution) mais avec une affinité moindre [6, 7]. Pour l'instant, tous les domaines PH dont la fonction a été précisément caractérisée sont impliqués dans le recrutement à la membrane. Beaucoup reconnaissent le PtdIns4,5P₂, mais il a été suggéré que ceux qui ont une faible affinité pourraient, en réalité, s'associer plus spé-

cifiquement avec d'autres ligands portant des groupements de charges négatives [8]. La question n'est pas tranchée, car il pourrait exister localement des concentrations transitoirement élevées de PtdIns4,5P₂, permettant l'association de domaines PH à faible affinité.

Domaine PH des facteurs d'échange

La plupart des protéines de la famille « Dbl » ont été découvertes par leur pouvoir oncogénique (*m/s n° 7, vol. 11, p. 1039*) ou par leur capacité de stimuler l'invasion tumorale (Tiam1, voir *m/s n° 7, vol. 12, p. 226*). Elles portent un domaine « Dbl » qui peut stimuler l'échange du nucléotide sur les petites protéines G de la famille Rho/Rac/CDC42, immédiatement suivi par un domaine PH [9-11] (*figure 1*). Bien que le domaine Dbl porte seul l'activité d'échange mesurée en solution, le domaine PH est indispensable à l'activité *in vivo* [12]. Nous avons récemment caractérisé le facteur d'échange de la petite pro-

téine G ARF1 (*ADP-ribosylation factor 1*) qui joue un rôle essentiel dans le recouvrement des vésicules de sécrétion lors du transport à travers l'appareil de Golgi (*m/s n° 3, vol. 10, p. 364*). Cette protéine, appelée ARNO, porte elle aussi un domaine PH situé immédiatement après le domaine facteur d'échange proprement dit (domaine « sec7 ») (*figure 1*). Ce domaine PH permet à la protéine de s'associer aux membranes chargées négativement et contenant du PtdIns4,5P₂ [13]. On peut donc penser que le principal rôle du domaine PH dans ces facteurs d'échange pour les petites protéines G est de permettre leur recrutement à proximité de leur cible associée à la membrane. Cependant le domaine PH à lui seul n'est en général pas suffisant pour donner une association stable aux membranes et l'interaction supplémentaire d'une région proche du domaine PH avec la membrane ou une protéine membranaire est souvent indispensable. Ainsi, le domaine PH de la kinase qui phosphoryle le récepteur β-adrénergique (β-ARK) pourrait s'associer à la membrane

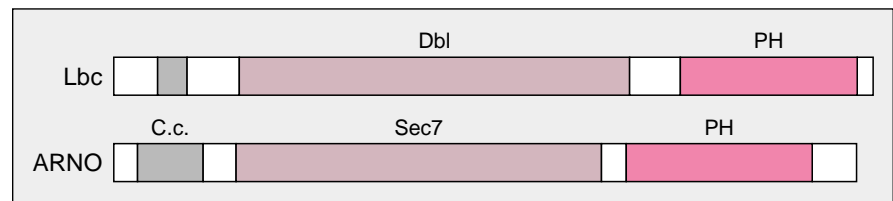


Figure 1. Comparaison des structures primaires des facteurs d'échange de Rho et ARF1. Lbc : oncogène, facteur d'échange de Rho ; ARNO : facteur d'échange d'ARF1. Les domaines responsables de l'activité d'échange sont représentés en bistre et les domaines PH en rouge. Les domaines d'échange de type « Dbl » stimulent l'échange du nucléotide sur les petites protéines G de la famille Rho/Rac/CDC42, alors que les domaines « Sec7 » sont spécifiques des petites protéines G de la famille ARF. C.c. : domaine coiled-coil.

par un groupement de charges positives situé en surface de la région en feuillet β , et avec les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques par son hélice α carboxyterminale [14]. Une interaction semblable entre le domaine PH d'ARNO et les sous unités $\beta\gamma$ pourrait expliquer en partie un rôle des protéines G hétérotrimériques dans le transport vésiculaire.

Les facteurs d'échange de Ras : Sos1, Sos2 et RasGRF portent aussi dans leur région aminoterminal un domaine Dbl (ou DH pour *Dbl Homology*) associé à un domaine PH [12]. Malgré de nombreux essais par notre groupe et d'autres laboratoires, aucune activité d'échange de Sos pour les protéines de la famille Rho/Rac n'a pu être détectée pour l'instant. On peut imaginer que le domaine « Dbl » de Sos a perdu l'activité d'échange mais pourrait avoir conservé la capacité d'interagir avec certaines petites protéines G, cependant les tests d'interaction par « double-hybride » ont donné des résultats négatifs jusqu'à présent. On sait depuis longtemps que la protéine Sos est nettement plus active sur Ras farnésylé en présence de vésicules lipidiques que sur Ras non modifié, en solution [15], et il a été montré récemment que le domaine PH de Sos1 est capable de se lier au PtdIns4,5P₂ avec une affinité raisonnable [16] mais probablement pas suffisante pour provoquer une association stable du complexe Grb2/Sos à la membrane.

Stabiliser l'association à la membrane...

Le modèle couramment admis est que ce complexe Grb2/Sos cytosolique est recruté à la membrane après activation de tyrosines kinases, le domaine SH2 de Grb2 interagissant avec une tyrosine phosphorylée d'un récepteur tyrosine kinase (EGF, HGF) ou de l'adaptateur Shc. C'est vraisemblablement ce mécanisme qui joue le rôle principal dans le recrutement membranaire du complexe Grb2/Sos, mais l'association serait stabilisée par l'interaction supplémentaire du domaine PH avec le PtdIns4,5P₂, qui permettrait surtout

de positionner Sos dans l'orientation optimale pour rencontrer son substrat : Ras ancré à la membrane. Un même mécanisme pourrait être utilisé par IRS1, principal substrat du récepteur de l'insuline, qui serait recruté sur le récepteur par son domaine PTB [17] et pourrait être positionné correctement sous la membrane à l'aide de son domaine PH.

Pour comprendre le mode d'activation des protéines de la famille « Dbl » il faudra préciser le ligand spécifique du domaine PH pour chacune de ces protéines, et sans doute caractériser un second « facteur », encore énigmatique, qui jouerait un rôle essentiel dans l'activation, probablement en favorisant leur recrutement à proximité de leur cible.

Le domaine PH de la tyrosine kinase BTK reconnaît préférentiellement le PtdIns3,4,5P₃ [18], alors que celui de la sérine/thréonine kinase PKB (oncogène Akt) reconnaît préférentiellement le PtdIns3,4 P₂ (*m/s n° 4, vol. 13, p. 608*) [19]. La stimulation de la PI3kinase pourrait donc activer ces deux kinases (BTK et Akt) en permettant l'interaction de leurs domaines PH avec des inositides membranaires phosphorylés en position 3. L'activation de la PI3kinase a aussi des effets importants sur le transport intracellulaire, qui pourraient être expliqués si des phosphoinositides phosphorylés en position 3 stimulaient le facteur d'échange d'ARF (ARNO) ; pour l'instant nous ne savons pas si ces phospholipides interagissent avec ARNO mieux ou moins bien que le PtdIns4,5P₂.

... positionner, orienter

Dans le cas du facteur d'échange d'ARF, le rôle principal du domaine PH est clairement de permettre le recrutement de la protéine sur des membranes lorsqu'elles sont riches en lipides chargés négativement et en PtdIns4,5P₂. En solution, les collisions entre deux protéines ont lieu en trois dimensions et chaque protéine s'oriente au hasard. Si ces deux protéines sont recrutées sur une membrane les collisions ont lieu en deux dimensions ce qui produit un effet de concentration locale, et les

protéines sont orientées par rapport à la membrane, ce qui peut leur permettre de se positionner de façon optimale pour interagir. Ces deux effets de concentration et de positionnement suffisent à expliquer une efficacité accrue de plusieurs ordres de grandeur, et il ne semble pas y avoir d'autre processus de stimulation de l'activité par les phosphoinositides. En revanche, dans le cas de la sérine/thréonine kinase Akt, l'activité kinase pourrait être démasquée par le PtdIns3,4P₂, ce qui conduit à envisager un réarrangement des différents domaines d'Akt lorsque son domaine PH interagit avec ce phosphoinositide [19].

Le recrutement à la membrane par interaction avec les charges négatives des phosphates de différents phosphoinositides apparaît comme la principale fonction de beaucoup de domaines PH, mais on peut aussi imaginer que certains soient impliqués dans la reconnaissance d'autres groupements de charges négatives, par exemple les sites hyperphosphorylés de certaines protéines, ou même dans des interactions protéine/protéine en absence de phosphorylation. L'avenir nous montrera vraisemblablement que certains domaines PH peuvent aussi être utilisés à d'autres fins ■

RÉFÉRENCES

1. Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J, Saraste M. The PH domain, a common piece in the structural patchwork of signalling proteins *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 343-8.
2. Gibson TJ, Hyvönen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 349-53.
3. Boivin P, Lecomte MC. Les domaines homologues de la pleckstrine. *Med Sci* 1997; 13: 639-46.
4. Lemmon MA, Ferguson KM, Sigler PB, Schlessinger J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10472-4.
5. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB. Structure of the high affinity complex of inositoltrisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 1995; 83: 1037-46.

RÉFÉRENCES

6. Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS, Fesik SW. Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 1994; 371: 168-70.
7. Hyvönen M, Macias MJ, Nilges M, Oschkinat H, Saraste M, Wilmanns M. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J* 1995; 14: 4676-85.
8. Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 1996; 85: 621-4.
9. Galland F, Birnbaum D. Le proto-oncogène *mcf2/dbl* et les facteurs d'échange GDP-GTP. *Med Sci* 1992; 8: 819-26.
10. Fort P, Vincent S. Transduction du signal mitogène, cytosquelette et petites protéines G : vers un réseau de protéines GAP ? *Med Sci* 1993; 9: 59-65.
11. Lamarche N. et Hall, A. Dissection moléculaire des signalétiques induites par Rac et cdc42. *Med Sci* 1996; 12: 1421-23.
12. Cerione RA, Zheng Y. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 216-22.
13. Chardin P, Paris S, Antony B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson C, Chabre M. A human exchange factor for ARF contains sec7 and pleckstrin-homology domains. *Nature* 1996; 384: 481-4.
14. Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. Pleckstrin homology domain mediated membrane association and activation of the β -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G β subunits and lipid. *J Biol Chem* 1995; 270: 11707-10.
15. Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, et al. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and BTK. *EMBO J* 1996; 15: 6241-50.
16. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Tokier A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by PI3,4P₂. *Science* 1997; 275: 665-8.
17. Borg JP, Fournier E, Birnbaum D, Margolis B. PTB, un domaine d'interaction protéine-protéine important dans le jeu de dominos de la transduction du signal. *Med Sci* 1997; 13: 647-56.
18. Porfiri E, Evans T, Chardin P, Hancock J. Prenylation of ras proteins is required for efficient hSos1 promoted guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem* 1994; 269: 22672-7.
19. Kubiseski TJ, Chook YM, Parris WE, Rozakis-Adcock M, Pawson T. High affinity binding of the PH domain of mSos1 to PtdIns4,5P₂. *J Biol Chem* 1997; 272: 1799-804.

Pierre Chardin

Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Cnrs UPR 0411, 660, route des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France.

TIRÉS À PART

P. Chardin.



10^e Téléthon : 373 056 714 francs Thérapie génique : l'AFM s'engage résolument sur le chemin du « gène-médicament »

Les 6 et 7 décembre derniers, au terme de trente heures de fête dans toute la France, le 10^e Téléthon, organisé par l'AFM en collaboration avec France Télévision et Radio France, affichait un nouveau record de promesses de dons (1).

96 % des promesses ont été tenues ! Le Téléthon 96 recueille finalement la somme totale de : **373 056 714 francs** (2). Dans un contexte préoccupant pour le monde associatif, ce résultat témoigne de la confiance de la population pour l'AFM et de la **fidélité** du grand public à cette grande fête de la solidarité.

Grâce à cette confiance renouvelée, l'AFM dispose des moyens pour poursuivre son combat pour l'utilisation du « **gène-médicament** », une révolution médicale qui bénéficiera aussi bien aux maladies génétiques qu'aux maladies infectieuses ou aux cancers...

Après les cartes du génome, **Généthon**, le centre de recherche créé par l'AFM, se lance dans cette **nouvelle aventure**. Tête d'un réseau national qui s'étend de Nantes à Marseille, son laboratoire de vectorologie impulse une dynamique nouvelle pour la mise au point des outils de thérapie génique : les « vecteurs » qui permettront d'acheminer le gène-médicament au cœur des cellules malades.

En attendant les thérapies, l'AFM poursuit son action quotidienne pour **la citoyenneté des personnes handicapées** : nouvelles solidarités, nouvelles prises en charge, nouvelle législation... l'AFM construit en 1997 un projet de société autour de la personne malade.

Rendez-vous, les 5 et 6 décembre 97, pour le 11^e Téléthon

(1) 388 225 047 francs.

(2) Dons effectués par téléphone, minitel ou Internet + manifestations + partenaires.

Résultat du Téléthon 95 : 372 millions de francs ; taux de concrétisation : 97 %.



Contact Presse :
Emmanuelle Guiraud & Marie-Sylvie Flot/AFM - Tél. : 01.69.47.28.28
1, rue de l'Internationale - BP 59 - 91002 Évry Cedex

