

Kinases activatrices de la division cellulaire : in vivo veritas ?

Les protéine-kinases sont omniprésentes dans les mécanismes de régulation cellulaire. Elles s'organisent en grandes familles, fondées sur des similitudes de séquence et des homologies de fonctions [1]. Elles interviennent, entre autres, dans la régulation de la croissance et de la division : les Cdk (*cyclin dependent kinases*) jouent ainsi un rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire [2].

La division d'une cellule eucaryote comporte schématiquement quatre étapes, qui décrivent le devenir du matériel génétique nucléaire : durant la phase S (synthèse d'ADN), les chromosomes sont dupliqués ; ils sont répartis en deux lots identiques durant la mitose (phase M). Les phases S et M sont séparées par les phases G2 (entre S et M) et G1 (entre M et le début de la phase S suivante). C'est peu avant le début de la phase S, en phase G1, que la cellule entame son cycle de division. Les kinases dépendantes des cyclines sont nécessaires pour la réplication de l'ADN et pour la mitose et un dérèglement de leur activité est observé dans des lignées de cellules cancéreuses [3].

Les Cdk sont de petites protéine-kinases qui, seules, n'ont pas d'activité. Il est possible de distinguer des classes à l'intérieur de cette famille et nous nous intéresserons dans un premier temps à Cdk1 et 2. Ces kinases phosphorylent spécifiquement des acides aminés sérine ou thréonine suivis d'une proline. Pour être actives, elles doivent être phosphorylées par une CAK (*Cdk activating kinase*) et former un complexe avec une sous-unité régulatrice appartenant à la famille des cyclines. On connaît maintenant diverses voies par lesquelles la cellule peut régler le degré d'activation des Cdk [4] : elle peut contrôler leur phosphorylation par la CAK, contrôler les niveaux de

transcription et de dégradation des cyclines ou inactiver le complexe kinase-cycline par association avec des protéines inhibitrices ou par une phosphorylation inhibitrice des Cdk. Les cyclines peuvent aussi être des facteurs de localisation intracellulaire des Cdk ou, simplement, mettre en contact la kinase et son substrat [5].

Aspects structuraux de l'activation des Cdk

De remarquables études cristallographiques permettent aujourd'hui de comprendre les mécanismes fondamentaux de la régulation des Cdk. Grâce aux travaux initiaux sur la protéine-kinase A et aux différentes structures résolues depuis, on sait que, de façon générale, les protéine-kinases sont organisées en deux lobes : le petit lobe amino-terminal est constitué majoritairement de feuillets β et joue un rôle important dans la fixation de l'ATP (pour revue, voir [6]). Le lobe carboxy-terminal est constitué majoritairement d'hélices α et intervient dans l'interaction avec le substrat. L'acte catalytique implique des résidus situés dans les deux lobes et a lieu à leur interface. Une partie de ces résidus est consacrée à un positionnement correct de l'ATP : dans une kinase active, l'adénosine est « enchâssée » dans le sillon situé entre les lobes, les phosphates pointant vers l'extérieur. Avant le transfert du phosphate γ , la liaison phosphate β -phosphate γ est alignée avec l'hydroxyle qui sera phosphorylé.

La structure de Cdk2 seule, donc inactive, a été déterminée en 1994 par l'équipe de S. Kim (Berkeley, CA, USA) [7]. Elle permet de comprendre pourquoi les Cdk1 et les Cdk2 n'ont pas d'activité par elles-mêmes. En effet, si l'organisation générale de la kinase ressemble beau-

coup à celle de kinases actives, elle en diffère par la structure d'une région du site actif, appelée « boucle-T » (en sphères de van der Waals sur la *figure 1*). Cette boucle est située dans le « segment d'activation », impliqué dans la régulation par phosphorylation de nombreuses kinases [8]. Elle contient justement la thréonine qui doit être phosphorylée par la CAK pour que la kinase soit active (thréonine 160, en rouge sur la *figure 1*). Sur la structure de Cdk2 seule (*figure 1*, structure de gauche), on constate que la structure adoptée par la boucle-T bloque complètement la fixation du substrat et l'accès aux phosphates de l'ATP (ATP en rose sur la *figure 1*). A un niveau plus fin, on constate que la conformation de la liaison β - γ de l'ATP ne permettrait pas, de toutes façons, le transfert du phosphate et que des résidus directement impliqués dans la catalyse ne sont pas positionnés comme dans une kinase active.

L'équipe de N. Pavletich (New York, NY, USA) a aussi déterminé la structure de Cdk2 associée à une région de la cycline A (qui se comporte, pour l'activation de la kinase, comme la cycline entière) [9]. Il faut noter que, dans le cas particulier de Cdk2, la simple association avec la cycline A permet d'activer faiblement la kinase. La structure illustre bien ce phénomène (*figure 1*, structure de droite, la cycline est représentée en gris clair). La fixation de la cycline induit des changements conformationnels importants sur Cdk2, en particulier dans le lobe amino-terminal et dans la boucle-T (le lobe carboxy-terminal ne subit pas de modifications notables). L'hélice « PSTAIR »*, région conservée qui caractérise les Cdk et participe à l'interface kinase-cycline, subit une rotation de 90° sur

* Pro-Ser-Thr-Ala-Ileu-Arg.

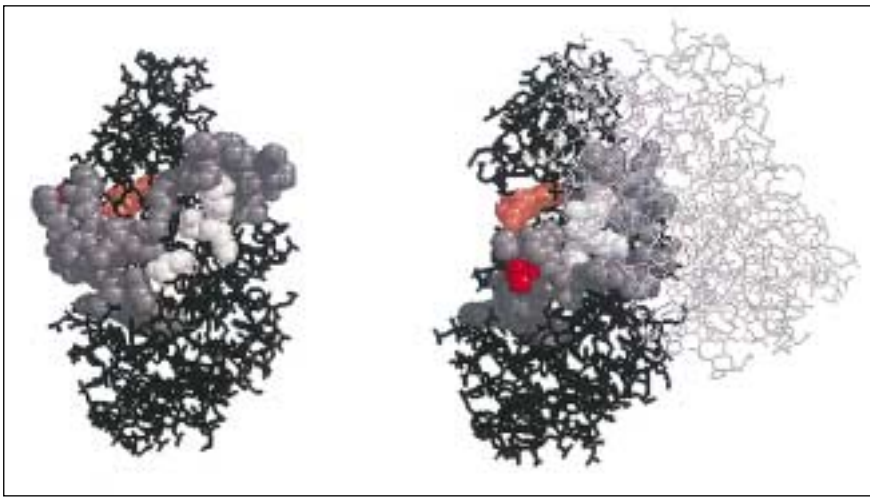


Figure 1. **Structures cristallographiques de Cdk2 seule et du complexe Cdk2-CycA [7, 9], vues sous les mêmes angles. La cycline A est représentée à droite en structure « fil de fer » gris clair. Cdk2 est principalement représentée en « fil de fer » noir. Sont représentées en sphères de van der Waals la boucle T (gris), la thréonine 160 (rouge) et la région basique qui accueille T¹⁶⁰ phosphorylée (blanc). L'ATP co-cristallisé avec Cdk2 est représenté en rose, le phosphate étant « devant ».**

son axe et est translatée vers le sillon catalytique, ce qui permet aux résidus directement impliqués dans le transfert du phosphate de se positionner correctement. Simultanément, la boucle-T libère le site catalytique. Il faut noter que la thréonine 160 est alors exposée au solvant, contrairement à ce que l'on observe dans la structure de Cdk2 seule. L'équipe de N. Pavletich a, en outre, déterminé la structure du complexe phosphorylé, donc complètement actif [10]. Les oxygènes du phosphate interagissent avec trois résidus basiques qui forment une « poche » (en blanc sur la *figure 1*). Cette interaction achève de libérer le site actif et rigidifie la structure de la kinase, qui est alors extrêmement semblable à celle de la protéine-kinase A active. L'ensemble de ces travaux (plus une étude structurale remarquable sur le mécanisme par lequel le petit inhibiteur p27^{Kip1} bloque l'activité de Cdk2-cycline A [11]), permet de mieux comprendre les mécanismes de la régulation des Cdk et, en particulier, pourquoi il est nécessaire que la kinase soit phosphorylée pour être entièrement active : la phosphorylation par la CAK renforce l'interaction avec la cycline et, surtout, rigidifie le site catalytique dans une

conformation qui est semblable à celle observée dans les kinases actives.

Génétique moléculaire des Cdk

Historiquement, les premières Cdk ont été isolées chez les levures *Schizosaccharomyces pombe* (Cdc2) et *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc28) ainsi que chez la grenouille *Xenopus laevis* et l'étoile de mer (Cdc2) (dans les années 1980). Depuis, une multitude d'analogues fonctionnels ou structuraux de Cdc2 et Cdc28 ont été isolés chez tous les eucaryotes chez lesquels on les a cherchés [2], ce qui suggère que les mêmes mécanismes moléculaires fondamentaux du contrôle de la division cellulaire se retrouvent dans ces organismes (et non chez les bactéries et archéas, d'après les séquences complètes de leurs génomes). Avec l'achèvement du séquençage systématique du génome de *Saccharomyces cerevisiae*, il a été possible de recenser, sur la base des analogies de séquence, la totalité des Cdk de cette levure : Cdc28, Kin28, Pho85, Ctk1 et Srb10. Seule Cdc28 joue un rôle essentiel lors de la division cellulaire. De façon plus générale, si l'on pensait à l'origine que le rôle des Cdk se cantonnait à la régulation

du cycle cellulaire, les résultats obtenus au cours des dernières années montrent qu'en fait, ce système modulaire de kinase, ce système modulaire de kinase, dont l'activité se prête à des régulations multiples et fines (cyclines, phosphorylations, inhibiteurs), peut être utilisé par la cellule dans des situations aussi variées que la réponse à la carence en phosphate chez la levure ou la transcription générale. Il faut donc distinguer maintenant entre les Cdk qui sont au cœur du contrôle de la division cellulaire (dans les cellules animales, ce sont par exemple Cdk1, 2, 3, 4 et 6) et celles qui interviennent dans une autre fonction cellulaire (Cdk5 ou 7). Mais la frontière est sans doute plus floue.

En effet, plusieurs exemples suggèrent que des Cdk (*figure 2*) dont la fonction principale est éloignée du contrôle de la division jouent *in fine* un rôle dans ce contrôle. Il y a d'abord le cas de Pho85 qui, chez *S. cerevisiae*, est impliqué dans la réponse à une carence nutritionnelle (en phosphate), mais joue aussi un rôle non essentiel au moment de l'entrée dans un nouveau cycle de division [12]. L'exemple le plus frappant a cependant été mis en évidence lors de la recherche de la kinase CAK responsable de l'activation des Cdk1 et 2. Plusieurs équipes de biochimistes ont simultanément annoncé l'isolement de cette kinase en 1993 (voir par exemple [13]). Ils travaillaient tous sur des cellules animales. Le premier point intéressant dans cette découverte est que cette kinase est capable d'activer *in vitro* un spectre assez large de Cdk : à une Cdk ne semble pas correspondre une CAK particulière. Cette CAK est, par ailleurs, elle-même une Cdk : son activité dépend partiellement d'une cycline et d'une phosphorylation activatrice [14]. Cette kinase a été appelée Cdk7. En décembre 1994, la revue *Cell* a publié les résultats de deux études qui ont amené un éclairage nouveau et inattendu sur Cdk7. Elles ont montré que, dans les cellules humaines et dans la levure, Cdk7 et son analogue Kin28 participent au facteur de transcription TFIIF, impliqué dans la transcription générale [15-17]. Bien sûr, il a immédiatement été suggéré que

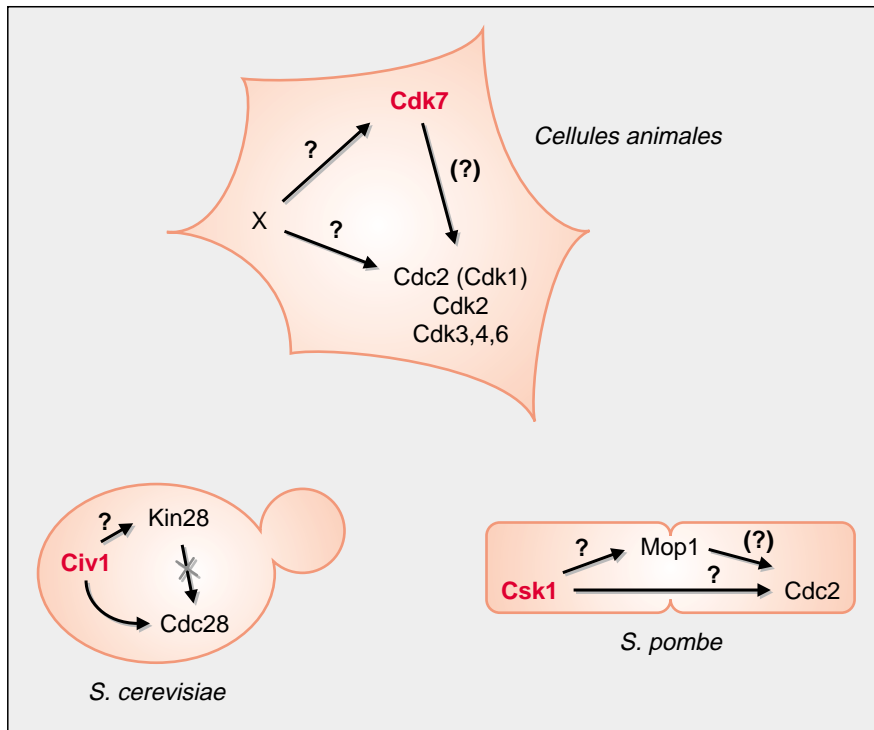


Figure 2. **Kinases activatrices des Cdk chez les levures et dans les cellules animales.** Pour être actives dans le contrôle de la division cellulaire, les Cdk doivent être associées à une cycline et phosphorylées par une CAK (Cdk activating kinase). La première CAK a été mise en évidence dans les cellules animales (xénope et étoile de mer) ; il a été montré *in vitro* que la Cdk7, une kinase dont l'activité dépend aussi d'une cycline et de phosphorylations, phosphorylait Cdk1 et Cdk2. Chez la levure *S. cerevisiae*, la protéine Kin28, très proche au point de vue structural de Cdk7, ne joue cependant pas de rôle dans la phosphorylation de Cdc28, l'analogue de Cdk2. Une nouvelle kinase, Civ1, active *in vivo* sur Cdc28 a été mise en évidence chez *S. cerevisiae*. Chez *S. pombe*, la kinase Csk1 fonctionne comme une CAK. Elle phosphoryle aussi Mop1, l'homologue de Cdk7 chez cette levure. Les kinases jouant un rôle de CAK sont indiquées en rouge. Tous les points d'interrogation s'appliquent à des réactions de phosphorylation qui n'ont été observées qu'*in vitro*.

Cdk7 constituait un lien entre la régulation de la transcription et le contrôle du cycle cellulaire [17]. Mais, dans le même temps, des éléments permettaient de douter de la réalité de la fonction de Cdk7 dans l'activation des Cdk *in vivo*.

Les études sur Cdk7 ont en effet montré, d'une part que l'activité de Cdk7 reste constante, d'autre part que Cdk7 n'est active que dans le noyau de la cellule, ce qui implique que les Cdk y sont nécessairement activées (sauf lors de la mitose durant laquelle l'enveloppe nucléaire est désassemblée). Enfin, si dans les cellules animales Cdk7 participe bien au facteur TFIIH et possède une activité CAK, la situation est différente chez

la levure *S. cerevisiae*. La protéine Kin28, la Cdk la plus proche en séquence de Cdk7, appartient bien au facteur TFIIH et est bien essentielle à la transcription [16-18]. En revanche, Kin28 ne joue pas de rôle, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, dans la phosphorylation de Cdc28 (la seule Cdk de levure impliquée directement dans le contrôle de la division) [18, 19]. A la suite de ces travaux, plusieurs équipes – dont la nôtre – ont isolé et caractérisé la protéine-kinase qui, chez *S. cerevisiae*, active Cdc28 [20-22]. Cette kinase, que nous avons appelée Civ1 (CAK *in vivo*) est sans analogue pour l'instant dans les banques de données. Elle se distingue de la plupart des membres de

sa famille par l'absence d'une séquence conservée impliquée dans la fixation de l'ATP (elle interagit pourtant avec l'ATP avec des constantes d'affinité comparables à celles des autres kinases [G. Divita, *communication personnelle*]). En termes de séquence, elle est plus proche de la famille des Cdk que de toute autre protéine-kinase, et cependant n'appartient pas à cette famille : Civ1 est active par elle-même (son activation ne dépend pas d'une cycline). Civ1 est, par ailleurs, responsable de la majorité, sinon de la totalité, de l'activité CAK chez *S. cerevisiae* et est capable de phosphoryler *in vitro* Cdk2 humaine comme Cdc28 en présence ou en absence de cycline. Nos résultats démontrent que Civ1 et Cdc28 interagissent fortement. L'équipe de D. Morgan (San Francisco, CA, USA) a montré que la quantité et l'activité de Civ1 restent constantes au cours d'un cycle cellulaire normal. Il n'existe pour l'instant aucune indication sur la localisation intracellulaire de Civ1. Enfin, il est intéressant de noter que le gène *CIV1* avait été isolé, dans un premier temps, par J.G. Valay chez G. Faye à l'Institut Curie (Paris), comme un suppresseur d'une mutation thermosensible de *KIN28*. Il y a donc un lien génétique fort entre la CAK de *S. cerevisiae* et Kin28, l'analogue de la kinase qui semble être une CAK dans les cellules animales. Civ1 serait-elle alors aussi une CAK pour Kin28 ?

Le point le plus important est que la puissance des outils de génétique moléculaire disponibles dans la levure a permis de montrer que, *in vivo*, dans une levure dépourvue de Civ1, Cdc28 n'est plus phosphorylé. C'est la première fois qu'il est possible de montrer qu'une CAK potentielle joue *in vivo* un rôle dans la phosphorylation de sa cible.

Conclusion

La question demeure : Cdk7 est-elle vraiment la CAK des cellules animales ? Les dernières études permettent d'y ajouter une autre interrogation : existe-t-il des homologues de *CIV1* dans d'autres organismes, en particulier dans les cellules animales ? On peut envisager plusieurs

scénarios. Il est possible que Cdk7 active Cdk1 et/ou Cdk2 et d'autres Cdk dans les cellules animales et que Cvl1 active Cdc28 chez *S. cerevisiae*. Dans cette optique, il faudrait imaginer qu'un ancêtre commun aux deux kinases ait évolué de manière radicalement différente dans ces différents organismes (ce qui expliquerait la parenté de séquence entre Cvl1 et les Cdk). Il serait alors extrêmement intéressant d'identifier la CAK d'autres eucaryotes afin de comprendre cette évolution. Il est aussi toujours possible que l'activité CAK de Cdk7 soit un artefact *in vitro* (les études biochimiques poussées rendent cependant cette hypothèse improbable, et on peut espérer que l'étude génétique de la fonction de Cdk7 chez un eucaryote supérieur permettra bientôt de l'exclure définitivement): on trouvera alors peut-être un homologue de Cvl1 dans les cellules animales, qui sera la véritable kinase qui active les Cdk *in vivo*. Enfin, on peut envisager que d'autres kinases actives, par phosphorylation de la boucle-T, les kinases dépendantes des cyclines. La kinase Csk1 de *S. pombe*, isolée comme suppresseur d'un mutant de la cycline associée à Mop1, l'homologue de Cdk7 dans cette levure, est, par exemple, un excellent candidat au rôle de CAK (CAK-activating kinase) [23]. Csk1 n'est un homologue, ni de Cvl1, ni des Cdk et pourtant nous l'avons isolée comme suppresseur de mutants thermosensibles de *CIV1* (données non publiées), ce qui indique que, au moins chez *S. cerevisiae*, Csk1 fonctionne comme une CAK. Il est possible que Csk1 active Mop1 (Cdk7) et assure avec cette kinase, de façon redondante, la fonction de CAK chez *S. pombe*. Pour conclure, par différentes méthodes, en particulier en utilisant des mutants de la levure *S. cerevisiae* pour isoler un gène capable de remplacer *CIV1*, plusieurs équipes sont à la recherche d'une autre CAK chez les eucaryotes supérieurs. L'identification définitive de la – ou les – kinase(s) responsable(s), chez l'homme, de l'activation des différentes Cdk tout au long du cycle de division permettra de mieux comprendre la physiologie de cet aspect

de leur régulation et fournira une cible potentielle pour la recherche de molécules inhibant la multiplication des cellules ■

RÉFÉRENCES

- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988; 241: 42-52.
- Dorée M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J* 1994; 8: 1114-21.
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and Cdk inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79: 573-82.
- Morgan DO. Principles of Cdk regulation. *Nature* 1995; 374: 131-4.
- Wolowiec D, Ffrench M. Kinases dépendantes des cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Med Sci* 1996; 12: 165-73.
- Taylor SS, Radzio-Andzelm E. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* 1994; 2: 345-55.
- De Bondt H, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 1993; 363: 595-602.
- Johnson LN, Noble MEM, Owen DJ. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 1996; 85: 149-58.
- Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, Pavletich NP. Mechanism of Cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 1995; 376: 313-20.
- Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 696-700.
- Russo AP, Jeffrey PD, Patten AK, Massagué J, Pavletich NP. Crystal Structure of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclin1-Cdk2 complex. *Nature* 1996; 382: 325-31.
- Poon RYC, Hunter T. Innocent bystanders or chosen collaborators? *Curr Biol* 1995; 5: 1243-7.
- Fesquet D, Labbe JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, Lorca T, Shuttleworth J, Dorée M, Cavadore JC. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (Cdk) through phosphorylation of Thr 161 and its homologues. *EMBO J* 1993; 12: 3111-21.
- Martinez AM, Afshar M, Martin F, Cavadore JC, Labbe JC, Dorée M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J* 1997; 16: 343-54.

15. Roy R, Adamczeski JP, Seroz T, Vermeulen W, Tassan JP, Schaeffer L, Nigg EA, Hoeijmakers JHJ, Egly JM. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIH transcription-DNA repair factor. *Cell* 1994; 79: 1093-101.

16. Feaver WJ, Svejstrup JQ, Henry NL, Kornberg RD. Relationship of Cdk-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIH/TFIIK. *Cell* 1994; 79: 1103-9.

17. Roy R, Bergmann E, Egly J. TFIH (BTF2), à l'interface de trois processus cellulaires: transcription, réparation et cycle cellulaire. *Med Sci* 1995; 11: 879-82.

18. Valay JG, Simon M, Dubois MF, Bensaude O, Facca C, Faye G. The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol* 1995; 249: 535-44.

19. Cismowski MJ, Laff GM, Solomon MJ, Reed SI. KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2983-92.

20. Kaldis P, Sutton A, Solomon MI. The Cdk-activating kinase (CAK) from budding yeast. *Cell* 1996; 86: 553-64.

21. Thuret JY, Valay JG, Faye G, Mann C. Cvl1 (CAK *in vivo*), a novel Cdk-activating kinase. *Cell* 1996; 86: 565-76.

22. Espinoza FH, Farrell A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Morgan DO. A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science* 1996; 273: 1714-7.

23. Molz L, Beach D. Characterization of the fission yeast *mcs2* cyclin and its associated protein kinase activity. *EMBO J* 1993; 12: 1723-32.

Jean-Yves Thuret*

Chercheur post-doctoral au Wellcome/CRC Institute of cancer and developmental biology.

Carl Mann

Chef du groupe cycle cellulaire.

Service de biochimie et de génétique moléculaire, Bâtiment 142, CEA/Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

** Adresse actuelle: Wellcome/CRC Institute, Tennis court road, Cambridge, CB2 1QR, Royaume-Uni.*

TIRÉS À PART

C. Mann.