

# Phosphorylation et régulation de la protéine-kinase C

La compréhension des modes de régulation de la protéine-kinase C (PKC) a considérablement évolué au cours de ces derniers mois. On sait notamment que les réactions de phosphorylation y contribuent de façon majeure, comme le montrent les travaux récents de cartographie des sites phosphorylés *in vivo* sur PKC $\alpha$  et PKC $\beta$ II, complétés par des études de mutagenèse dirigée. Ces résultats et le modèle fonctionnel qui en découle sont présentés ici. Ils permettent de refonder la recherche d'éventuelles PKC-kinases et aident à comprendre le fonctionnement d'autres kinases qui présentent des sites de phosphorylation équivalents.

## La protéine-kinase C

La protéine-kinase C (PKC) fut identifiée en 1977 comme une sérine/thréonine kinase activée par protéolyse [1]. Puis, on montra qu'elle est activée de manière réversible par un lipide neutre, le diacylglycérol, en présence de phospholipides. L'identification de la PKC comme récepteur principal des promoteurs de tumeurs de la classe des esters de phorbol (qui activent directement la kinase en mimant l'effet du diacylglycérol) a fortement stimulé la recherche sur cette protéine et ses voies de signalisation. Depuis le clonage du premier ADNc de PKC en 1986 [2] d'autres clones ont été décrits si bien qu'aujourd'hui on regroupe sous le terme général de PKC toute une famille d'enzymes jouant un rôle prépondérant au cours de la vie cellulaire, notamment pendant les phases de prolifération et de différenciation [3-6]. Cette famille

d'enzymes, qui ont en commun la capacité de lier certains phospholipides, peut être subdivisée en trois catégories : les PKC conventionnelles (cPKC) répondent à la définition d'origine de régulation par le calcium et le diacylglycérol ; les autres PKC ne sont pas sensibles au calcium et sont dites nouvelles (nPKC) ou atypiques (aPKC) selon qu'elles sont ou non activées par le diacylglycérol (figure 1). Le mécanisme d'activation n'est pas seul à permettre de distinguer ces iso-types ; des différences existent aussi

au niveau de leur réseau d'expression tissulaire, de leur localisation subcellulaire et des substrats que ces enzymes phosphorylent [3-6].

La régulation de l'activité de la PKC fait intervenir des facteurs lipidiques. Il est vite apparu, cependant, que ces molécules sont inopérantes si la PKC n'a pas été préparée à y répondre. Or, la phosphorylation de la PKC est au cœur du processus qui conduit à la compétence catalytique de l'enzyme, qui représente cette capacité d'être activée par des molécules de seconds messagers.

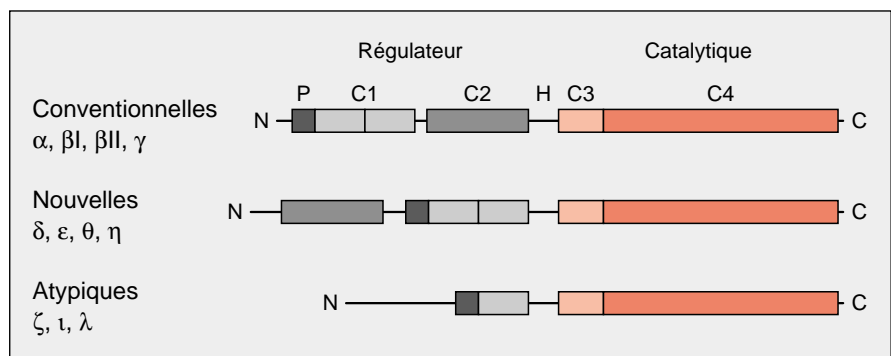


Figure 1. **La famille des PKC.** Les trois classes de PKC et leurs structures primaires sont représentées. Les PKC sont constituées d'un domaine catalytique, côté carboxy-terminal (C), et d'un domaine régulateur, côté amino-terminal (N), séparés par une région charnière (hinge, H) qui présente des sites sensibles à la protéolyse. Quatre domaines (C1-C4) ont été identifiés, dont la conservation sous-tend la classification. Les PKC conventionnelles (cPKC) et nouvelles (nPKC) présentent un double domaine C1, capable de lier le diacylglycérol et les esters de phorbol ; les PKC atypiques (aPKC) ne possèdent qu'une copie de ce domaine et ne lient pas ces molécules. Le domaine C2 permet la liaison aux lipides acides (phosphatidylsérine, par exemple), et au Ca<sup>2+</sup> dans le cas des cPKC. Les domaines C3, qui contient le site de liaison de l'ATP, et C4, où se forme la poche de liaison des substrats, possèdent des déterminants structuraux que l'on retrouve dans toutes les protéine-kinases. À l'état basal, une séquence dite pseudosubstrat (P) occupe la poche de liaison des substrats et inhibe l'activité kinase. Lors de l'activation, les réarrangements conformationnels de l'enzyme entraînent le déplacement de la séquence P, rendant accessible le site pour la phosphorylation de substrats.

## La phosphorylation, un mécanisme de régulation

Les protéine-kinases sont fréquemment phosphorylées et, de fait, nombre de ces protéines font partie de cascades de phosphorylation. La régulation par phosphorylation peut s'opérer d'au moins deux manières. Il peut s'agir d'un mécanisme d'activation (ou de désactivation) direct, ou bien d'un mécanisme indirect, on pourrait dire permissif, qui ne modifie pas l'activité, mais qui prépare la protéine à une autre étape de régulation, notamment par des molécules de seconds messagers. Dans de nombreux cas du premier type, le gain fonctionnel est associé à la phosphorylation d'une région particulière appelée *activation loop* (boucle d'activation) dans le domaine kinase de la protéine (par exemple, la *mitogen activated protein* (MAP) *kinase*, et la MAP-kinase kinase). Parmi les cas du deuxième type figure la protéine-kinase dépendante de l'AMPc (PKA), dont l'activité est directement réglée par la concentration d'AMPc. Néanmoins, on sait que cette protéine doit aussi être phosphorylée dans la boucle d'activation pour permettre le positionnement du substrat au niveau du site catalytique [7]. La famille des PKC est un autre exemple d'enzymes réglées par des

seconds messagers et dont la phosphorylation d'un site conservé dans leur boucle d'activation a un impact important sur la fonction de la protéine [8, 9]. On constate donc, dans le cas de ces enzymes directement réglées par des seconds messagers, la constance du rôle d'un groupement phosphate au niveau de la boucle d'activation.

Le site de phosphorylation de la boucle d'activation est un site majeur, présent sur de très nombreuses kinases. Cependant, plusieurs de ces protéines (PKA, PKB, PKC, S6 kinase, par exemple) possèdent, en dehors du domaine kinase consensus, d'autres sites de phosphorylation, plus récemment identifiés mais encore mal connus. La PKC constitue l'une des premières protéine-kinases pour lesquelles un effort de caractérisation de ces sites a été réalisé; il concerne les deux isoformes PKC $\alpha$  et PKC $\beta$ II.

### Les sites phosphorylés *in vivo* sur PKC $\alpha$ et PKC $\beta$ II

La PKC $\alpha$  a été purifiée directement à partir de rétine de bovin [10] et la PKC $\beta$ II bovine recombinante à partir de cellules d'insectes (Sf9) infectées par un baculovirus recombinant pour cette protéine [10, 11]. Les deux cartes de phosphorylation de ces deux

isoformes sont concordantes et indiquent trois sites (*figure 2*). Le premier site concerne la boucle d'activation (T497 pour PKC $\alpha$ ), les deux autres sont carboxy-terminaux, situés en dehors du domaine kinase (T638 et S657 pour PKC $\alpha$ ). Les protéines ont été extraites de cellules non stimulées, ce qui suggère que la phosphorylation de ces trois sites intervient lors de la maturation fonctionnelle des enzymes et non pour régler leur fonction lors de réponses à des signaux spécifiques. L'analyse de ces sites a montré qu'ils ont chacun un rôle dans l'élaboration ou le maintien de la structure active de la protéine.

### Phosphorylation et activité catalytique

Les mutants T497A de la PKC $\alpha$  et T500V de PKC $\beta$ II ne peuvent être phosphorylés sur le site muté et sont inactifs [8, 9] (*figure 2*), ce qui suggère que la présence d'un phosphate au niveau de la boucle d'activation est importante. En revanche, les mutants T497E de PKC $\alpha$  [12] et T500E de PKC $\beta$ II [9], qui, eux non plus, ne peuvent pas être phosphorylés sur le site muté, présentent une activité; cela indique clairement la nécessité d'une charge négative à cet endroit de la boucle d'activation. Ces deux isotypes

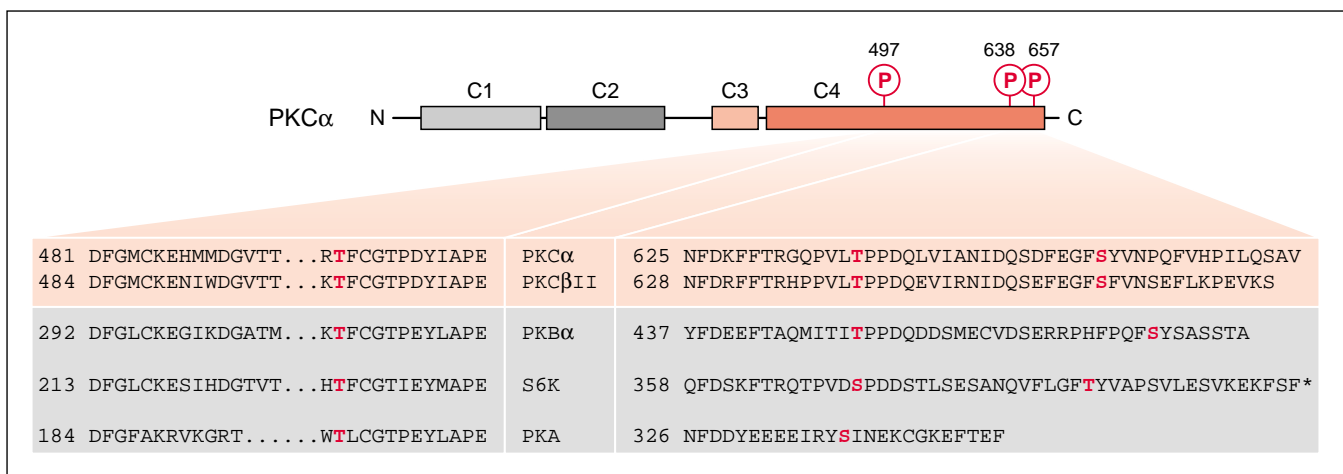


Figure 2. **Sites de phosphorylation sur PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ II et comparaison avec d'autres protéine-kinases.** Le schéma montre la structure primaire de PKC $\alpha$  avec les trois sites de phosphorylation cartographiés *in vivo*. Ces sites (indiqués en rouge) et la distance qui les sépare sont conservés dans l'ensemble de la famille des PKC [10] et sont présents sur d'autres protéine-kinases telles que PKB $\alpha$ , S6K et PKA (voir références citées respectivement dans [18, 17]). La séquence de S6K se poursuit au-delà du résidu indiqué (\*). Code à une lettre des acides aminés: A: Ala; C: Cys; D: Asp; E: Glu; F: Phe; G: Gly; H: His; I: Ile; K: Lys; L: Leu; M: Met; N: Asn; P: Pro; Q: Gln; R: Arg; S: Ser; T: Thr; V: Val; W: Trp; Y: Tyr.

de la PKC rejoignent un nombre croissant de protéine-kinases pour lesquelles cette caractéristique a également été rapportée [13]. Sur les deux sites terminaux, en revanche, un groupement phosphate ne paraît pas strictement requis pour aboutir à une enzyme active. En effet, les mutants T638A [12] ou S657A [14] de PKC $\alpha$  ont une activité spécifique comparable à celle de la PKC $\alpha$  normale. Cependant, la phosphorylation de ces deux sites permet la constitution d'une enzyme pleinement fonctionnelle.

### Phosphorylation et stabilité de la structure active

Pour que l'activité de la PKC persiste, des interactions doivent s'opérer entre le domaine catalytique et l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. Or, ces interactions apparaissent gouvernées par le degré de phosphorylation de la protéine. Qui plus est, les groupements phosphate sur chacun des trois sites présentés ci-dessus agissent de façon coopérative pour stabiliser la structure active de la PKC. Notamment, le rôle déterminant du premier phosphate carboxy-terminal, proposé lors d'études des isotypes  $\beta$ I [15] et  $\beta$ II [10] de la PKC, vient d'être démontré [12]. L'analyse du mutant T638A de PKC $\alpha$ , dont le phénotype est d'une instabilité remarquable, a permis de comprendre les interactions qui président à la stabilité de la PKC. Ces interactions, qui mettent également à contribution la phosphorylation des sites T497 [12] et S657 [14], permettent à la protéine d'adopter une conformation plus compacte, ce qui se traduit par une sensibilité modérée vis-à-vis de phosphatases, de protéases, et également une moindre susceptibilité à l'inactivation par la chaleur ou par oxydation [12, 14]. Ces travaux ont conduit à proposer un modèle pour la régulation de PKC $\alpha$  (figure 3).

### Mécanismes de phosphorylation

Le seul site cartographié à la fois *in vivo* et *in vitro*, à la suite d'une réaction d'autophosphorylation, est T641 de PKC $\beta$ II (équivalent de T638 de PKC $\alpha$ ) [16]. La détection aux

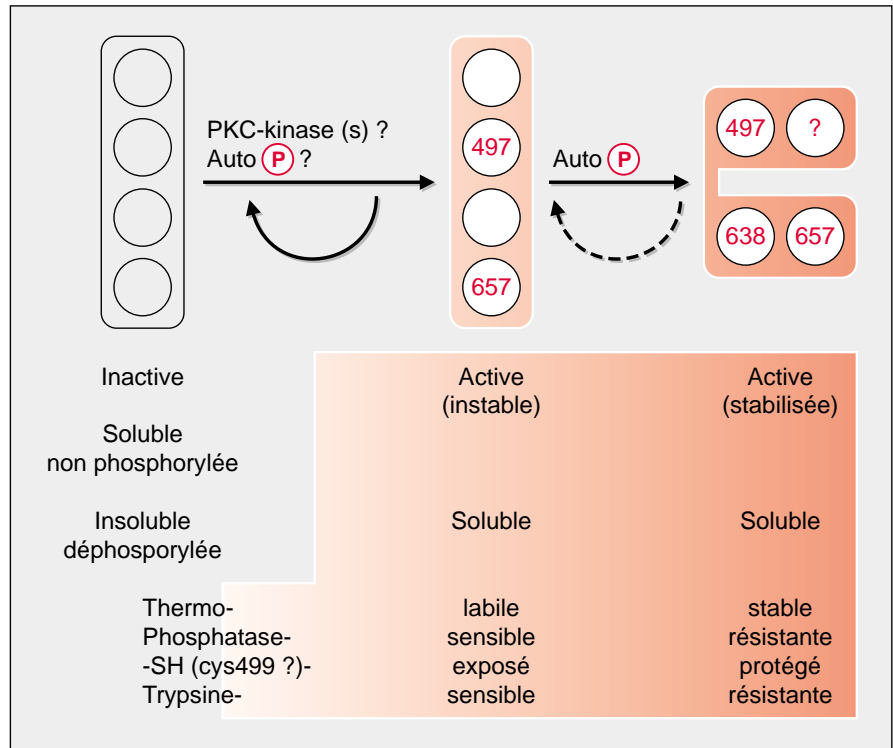


Figure 3. **Modèle de régulation de la PKC $\alpha$  par phosphorylation.** Au cours d'une phase initiale conduisant à la compétence catalytique, les sites T497 et S657 sont phosphorylés. La phosphorylation ultérieure de T638 verrouille la protéine dans sa conformation active. Les flèches rectilignes traduisent la phosphorylation, les flèches curvilignes, la sensibilité à la déphosphorylation, plus (ligne continue) ou moins (ligne discontinue) élevée. Le critère de solubilité est défini en présence d'un détergent non ionique de type Triton X-100. L'éventualité d'autres sites de phosphorylation encore inconnus est indiquée (?).

moyens d'anticorps spécifiques de sites phosphorylés fait apparaître S660 sur le même isotype (équivalent de S657 sur PKC $\alpha$ ) comme cible probable d'une réaction d'autophosphorylation *in vitro* [10]. A l'opposé, parce qu'il n'a jamais pu être phosphorylé *in vitro*, ni par un mécanisme d'autophosphorylation, ni en présence d'activités kinase diverses, le site de la boucle d'activation est considéré comme phosphorylé par une PKC-kinase inconnue. D'où le schéma général selon lequel la PKC devrait d'abord être phosphorylée par une PKC-kinase au niveau de la boucle d'activation, avant d'être capable de s'autophosphoryler sur chacun des deux sites carboxy-terminaux [10].

Ce modèle a sans aucun doute permis d'organiser de façon cohérente une somme de connaissances sur la maturation fonctionnelle de la PKC.

Cependant, il présente des limites ; il est fondé, d'une part, entièrement sur des données acquises *in vitro* ; d'autre part, il n'intègre pas l'éventualité de réactions de déphosphorylation (voir plus bas), qui pourraient influencer la perception que l'on a de l'ordre selon lequel les sites sont phosphorylés. Le modèle actuel reste donc largement hypothétique dans le contexte de la cellule, *in vivo*, pour ce qui concerne la progression des étapes de phosphorylation et les mécanismes mis en œuvre.

De fait, des résultats récents incitent à reconsidérer ce modèle [14]. Ils indiquent que la phosphorylation du site le plus distal (S657 sur PKC $\alpha$ ) intervient probablement plus tôt qu'on ne l'imaginait après la synthèse de la protéine. Rien n'exclut même que ce site puisse faire l'objet *in vivo* d'une transphosphorylation par une PKC-kinase, avec pour effet

d'amorcer la maturation fonctionnelle. Ce site fait partie d'un motif (F-X-X-F/Y-S/T-F/Y)\* que l'on retrouve dans des protéines telles que S6-kinase [17] ou PKB [18]. La phosphorylation de ce site est critique pour ces deux protéines; elle semble s'opérer en *trans*, par l'intermédiaire de protéines non identifiées. Il se pourrait donc que la PKC-kinase-clé phosphoryle la PKC au niveau de ce site carboxy-terminal plutôt que sur la boucle d'activation. Ou peut-être existe-t-il plusieurs PKC-kinases qui agissent séquentiellement sur la PKC au cours de sa maturation. Ces nouvelles hypothèses et le parallèle surprenant qui se dessine au fur et à mesure entre des kinases de familles distinctes comme PKC, PKB ou S6-kinase, devraient aider à l'identification des kinase-kinases mises en jeu, notamment ces PKC-kinases qui ont jusqu'ici échappé aux chercheurs.

### PKC-kinase(s)... vers une réalité ?

L'identification de la PKC remonte à une vingtaine d'années. La mise en évidence d'un processus multiphasique de phosphorylation de la PKC et la proposition de l'existence de PKC-kinase(s) ne datent pas non plus d'aujourd'hui [19]. Pourtant, on ne connaît toujours pas d'activité kinase capable d'agir sur la PKC. Faut-il donc remettre en cause le concept de PKC-kinase ?

L'hypothèse de PKC-kinase(s) reste très plausible. Il convient plutôt de remettre en question les bases de sa recherche et peut-être de la réorienter, maintenant qu'on évalue mieux la complexité de la régulation de la PKC par phosphorylation. Cette régulation intègre des événements multiples qui ont des répercussions sensibles sur le plan structural, ne se limitant pas seulement à la mise en place de la boucle d'activation. Il existe en fait trois sites fondateurs (T497, T638, S657 sur PKC $\alpha$ ), situés dans deux régions distinctes du domaine catalytique (figure 2). Ces sites sont très conservés entre les diverses isoformes de PKC, et sont phosphorylés lors de la « fabrication »

de l'enzyme [10, 11]. D'autres sites de régulation de l'enzyme active, plus spécifiques d'une sous-famille ou d'une isoforme données, existent probablement et leur mise en évidence *in vivo* sera nécessaire. Par ailleurs, conjointement aux événements de phosphorylation, les travaux sur la PKC $\alpha$  ont mis en évidence sa déphosphorylation *in vivo* et indiqué l'importance de ce type de réaction pour régler l'activité de la PKC [12, 14, 20]. De toute évidence, parallèlement à la recherche de PKC-kinases, la prise en compte de cette dualité entre phosphorylation et déphosphorylation et l'identification de PKC-phosphatases seront indispensables pour mieux comprendre la régulation fonctionnelle de la PKC ■

Le travail de l'auteur a été réalisé dans le laboratoire de Peter J. Parker à l'Imperial Cancer Research Fund, London (Royaume-Uni).

### Frédéric Bornancin

Responsable d'unité. Groupe de biochimie cardiovasculaire. Synthélabo recherche, 31, avenue Paul-Vaillant-Couturier, 92220 Bagneux, France.

### RÉFÉRENCES

1. Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1977; 252: 7603-9.
2. Parker PJ, Coussens L, Totty N, Rhee L, Young S, Chen E, Stabel S, Waterfield MD, Ullrich A. The complete primary structure of protein kinase C, the major phorbol ester receptor. *Science* 1986; 233: 853-9.
3. Dekker LV, Parker PJ. Protein kinase C: a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 73-7.
4. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9: 484-96.
5. Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 168-73.
6. Newton AC. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 161-7.
7. Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM, Shuntoh H. Autoactivation of catalytic (C $\alpha$ ) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2332-41.

8. Cazaubon S, Bornancin F, Parker PJ. Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C $\alpha$ . *Biochem J* 1994; 301: 443-8.

9. Orr JW, Newton AC. Requirement for negative charge on « activation loop » of protein kinase C. *J Biol Chem* 1994; 269: 27715-8.

10. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC. Protein kinase C is regulated *in vivo* by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 1995; 5: 1394-1403.

11. Tsutakawa SE, Medzihiradzky KF, Flint AJ, Burlingame AL, Koshland DE Jr. Determination of *in vivo* phosphorylation sites in protein kinase C. *J Biol Chem* 1995; 270: 26807-12.

12. Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C $\alpha$ . *Curr Biol* 1996; 6: 1114-23.

13. Johnson LN, Noble MEM, Owen DJ. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 1996; 85: 149-58.

14. Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of protein kinase C $\alpha$  on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem* 1997; 272: 3544-9 et 272: 13458 (erratum).

15. Zhang J, Wang L, Schwartz J, Bond RW, Bishop WR. Phosphorylation of Thr642 is an early event in the processing of newly synthesized protein kinase C $\beta$ 1 and is essential for its activation. *J Biol Chem* 1994; 269: 19578-84.

16. Flint AJ, Paladini RD, Koshland DE Jr. Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science* 1990; 249: 408-11.

17. Pearson RB, Dennis PB, Han JW, Williamson NA, Kozma SC, Wettenhall REH, Thomas G. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J* 1995; 14: 5279-87.

18. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996; 15: 6541-51.

19. Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U, Fabbro D. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 13902-9.

20. Hansra G, Bornancin F, Whelan R, Hemmings BA, Parker PJ. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase C $\alpha$  correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *J Biol Chem* 1996; 271: 32785-8.

### TIRÉS À PART

F. Bornancin.

\* F: Phe; Y: Tyr; S: Ser; T: Thr.