

I. Les protéines kinases

1. 1. Définition

Les protéines kinases sont des molécules hétérotétramériques. Elles sont formées de deux sous unités régulatrices (R_2) et deux sous unités catalytiques (C_2) (Robert et al., 1999). Ce sont des protéines enzymatiques qui interviennent dans la phosphorylation des protéines (Uehata et al., 1997; Guttman, 1999). La protéine kinase est en fait un nom qui s'applique à une famille d'enzyme apparente dont certaines ne sont activées que par des messagers secondaires lipidiques comme le diacyl glycérol (DAG) (Karaki et al., 1997). Tandis que, d'autres protéines kinases ont besoin de la présence simultanée d'ions Ca^{2+} (d'où la lettre C dans le nom de l'enzyme comme la protéine kinase C), servant de coactivateur comme la PKA (enzyme activé par l' AMP_c) (Karp, 1998).

La protéine kinase joue un rôle dans la stimulation et l'inhibition de d'autres protéines telle que la MLCK, formant une phosphoprotéine (Karp, 1998).

1.2. Les différents types des protéines kinases

Selon la classification fonctionnelle, plusieurs types sont à distinguer:

a. La protéine kinase C (PKC)

C'est une famille de sérine/thréonine kinase capable de transmettre le signal extracellulaire en activant d'autres protéines kinases en particuliers les MAP kinases (mitogen-activated protein kinase: MAPK) (Chokroun et al., 2002). Ce sont des kinases multifonctionnelles capables de phosphoryler une large variété de protéines (Mutsui et al., 1993). Il existe aux moins 11 isoformes de PKC (PKC_α , PKC_β , PKC_γ , PKC_ϵ ...) (Mellor et Parker, 1998). L'activation de la PKC a des divers effets sur la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, sur la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC) et sur la contraction du muscle lisse (Nakajima et al., 1993). Le DAG active la PKC liée à la membrane par un mécanisme analogue à celui de l'activation de la PKA par l' AMP_c (Craw et al., 2003). La PKC se trouve dans le cytosol et dans la partie interne de la membrane cellulaire, elle n'est pas activée que lorsqu'elle se trouve liée à la membrane (Eckert et al., 1999). L'activation de la PKC par le DAG dépend du Ca^{2+} et de la phosphatidyl sérine. La fixation du DAG et de la phosphatidyl sérine sur la PKC localisée dans la partie cytoplasmique de la membrane augmente l'affinité de l'enzyme pour le Ca^{2+} (Eckert et al., 1999); il en résulte que la PKC peut être activé en présence de faible taux du Ca^{2+} cytosolique (Karaki et al., 1997). Donc l'activation de la PKC nécessite deux messagers intracellulaires, le DAG et le Ca^{2+} , induits par le même signal extracellulaire (Olsson et Holmgren, 2001).

b. La protéine kinase G (PKG)

La PKG est activée par la guanosine 3,5 monophosphate cyclique (GMP_c) produite par la stimulation du guanylate cyclase par l'intermédiaire du monoxyde d'azote (Olsson et Holmgren, 2001). L'activation de la PKG par le GMP_c conduit à la réduction de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire [(Ca²⁺)_i] (Jiang et al., 1998).

c. La protéine tyrosine kinase (PTK)

La PTK appartient à la superfamille des sérine/thréonine kinases, capable de phosphoryler des résidus sérine et thréonine (Karp, 1998). Selon la classification fonctionnelle, il existe trois groupes de PTK; la tyrosine kinase associée aux récepteurs de surface (groupe 1), la kinase d'adhésion focale (groupe 2), et la tyrosine kinase nucléaire (groupe 3) (Wang et whirter, 1994).

d. La protéine kinase A (PKA)

La famille d'enzymes de la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMP_c) est ubiquitaire. C'est un prototype pour la superfamille des kinases, elle constitue approximativement 2% du génome humain (Kim et al., 2005).

Les règles de nomenclatures acceptées par des spécialistes du monde entier facilitent les communications. La classification établie par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie a été établie sur des critères de spécificité (Bouzon et al., 1997). Chaque enzyme reçoit un matricule comportant quatre nombres dont le premier désigne de un à six classe d'appartenance (Pelmont, 1993). La nomenclature des enzymes s'écrit de manière générale sous forme: EC.X.X.X.X (où EC: Enzyme Commission) (Bouzon et al., 1997).

Sur la base de la réaction principale catalysée et le type de coenzyme utilisé (Pelmont, 1993) le premier "X" correspond au ce type de la réaction catalysée par les enzymes (Datta et al., 1989). Pour la PKA, le premier "X" est "2" c'est-à-dire EC: 2 qui signifie que l'enzyme est une "transférase" pouvant provoquer des échanges des parties glycosidiques entre deux substrats (Pelmont, 1993). Le deuxième "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe du donneur d'électrons sur lequel l'enzyme agit (Datta et al., 1989). Pour la PKA, le chiffre est "7" qui signifie la sous classe de l'enzyme, c'est-à-dire la nature du groupe transféré; pour la PKA le groupe est le groupement phosphate (Pelmont, 1993). Le troisième "X" permet un classement supplémentaire en fonction de la nature du groupe d'accepteur d'électron sur lequel l'enzyme agit (Datta et al., 1989). Pour la PKA, le troisième "X" est le chiffre "11" (Pelmont, 1993). Le quatrième "X" permet un classement

supplémentaire en fonction du substrat sur lequel l'enzyme agit (Datta et al., 1989). Pour la PKA, le quatrième "X" varie selon le substrat sur lequel l'enzyme agit. La formule générale de la PKA est donnée comme suit: EC: 2.7.11.X (X: varie) (Pelmont, 1993).

1.3. La PKA

1.3.1. Définition

En biologie cellulaire, la PKA (EC 2.7.11.11) appartient à la famille des enzymes dont l'activité est dépendante de la concentration de l'AMP_c dans la cellule (Rang, 2003).

A la suite de la fixation d'un neurotransmetteur, la sous unité catalytique de la PKA phosphoryle les protéines effectrices qui sont les médiateurs directs de la réponse cellulaire (Eckert et al., 1999). Comme d'autres protéines kinases, la PKA est une enzyme qui décore des protéines covalentes avec le groupe phosphate (Bauman et Scott, 2002).

La caractéristique unique de la PKA est que son activité est réglementée par des fluctuations des niveaux d'AMP_c à l'intérieur des cellules (d'où son pseudonyme comme l'AMP_c de la protéine kinase dépendante) (Chin et al., 2002). Cette enzyme fonctionne ainsi comme l'effecteur pour une variété d'hormones qui travaillent par le biais d'une voie de signalisation d'AMP_c (Robinson et Stratakis, 2002). En d'autre terme, la PKA est essentiellement responsable en dernier ressort de l'ensemble des réponses cellulaires à cause du second messager l'AMP_c (Robinson et Stratakis, 2002).

1.3.2. Structure

a. Structure tridimensionnelle

Les protéines kinases sont des tetramères constituées de deux sous unités catalytiques (C₂) et deux sous unités régulatrices (R₂) (Madhusdan et al., 1994). La PKA est constituée de deux domaines séparés par une large crevasse dans laquelle sont situés les sites de fixation de l'ATP et les sites de reconnaissance de la séquence consensus du peptide phosphorylable (Jeannine et Guy, 2005). Le domaine N-terminal plus petit est impliqué dans la fixation de l'ATP, il est majoritairement constitué de large feuillet β-antiparallèles (Fig.1). Le domaine C-terminal est impliqué dans la fixation du peptide phosphorylable et dans la catalyse (Rang, 2003).

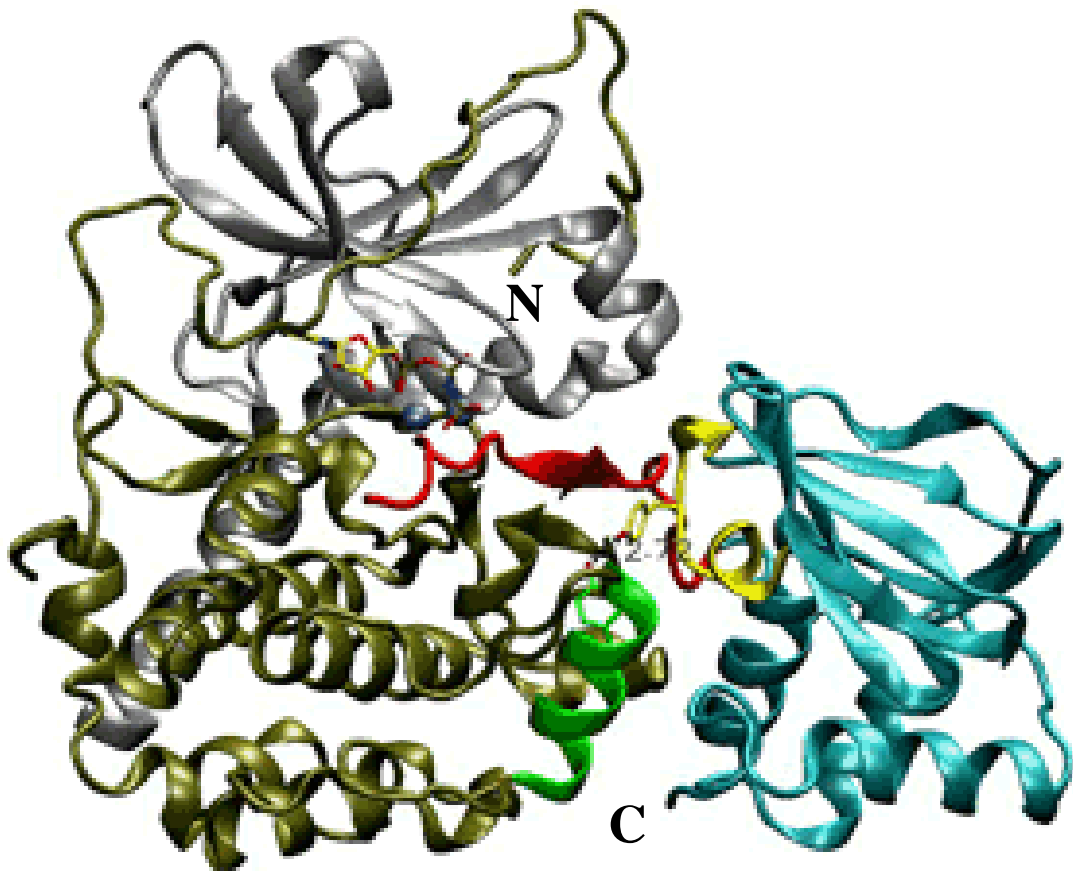


Figure 1: Structure de la PKA: Le domaine N-terminal est constitué de large feuillet- β antiparallèle. Le domaine C-terminal est constitué d'hélice α (Kim et al., 2005).

La PKA est un hétérodimère composé de deux types de sous unités (Johnson et al., 2001):

La sous unité catalytique

Cette sous unité contient le site actif de l'enzyme (Johnson et al., 2001). Elle contient également un domaine qui lie l'ATP (source de phosphate) et un domaine qui lie la sous unité de régulation (Shabb, 2001).

La sous unité régulatrice

Deux molécules de cette sous unité se lient dans une orientation antiparallèle pour former un homodimère. pour les sous unités de type I (Fig. 2). Cette liaison est covalente par des liaisons disulfures (Shabb, 2001). Cette sous unité possède également deux domaines qui lient l'AMP_c, un domaine qui interagit avec la sous unité catalytique et un domaine autoinhibiteur qui sert de substrat ou de pseudosubstrat pour la sous unité catalytique (Chin et al., 2002). Les sous unités régulatrices existent en deux formes principales: RI et RII, chaque formulaire comporte deux sous types désignés alpha et bêta (Shabb, 2001). Chacun des quatre isotopes de la sous unité régulatrice sont codés par un autre gène (Bauman et Scott, 2002).

En outre trois isotopes de la sous unité catalytique ont été identifiés (alpha, bêta et gamma) (Robinson et Stralakis, 2002) (Fig. 2).

b. Structure en acides aminés

Le nombre d'acides aminés de la sous unité catalytique est de 351. Cependant, la sous unité régulatrice contient entre 381 et 418 acides aminés (Tasken et al, 1993).

Le poids moléculaire de chaque sous unité de la PKA est résumé dans le tableau suivant:

Tableau: La structure de la sous unité catalytique (C) et la sous unité régulatrice (R) avec leur isoforme de la PKA (Tasken et al., 1993).

Sous unité	Nombre d'acides aminés	Poids moléculaire	Poids moléculaire apparait par SDS-PAGE
C _α	351	40.589	40 KDa
C _β	351	40.622	41 KDa
C _γ	351	40.412	39 KDa
RI _α	381	42.981	49 KDa
RI _β	380	43.027	53.5 KDa
RII _α	404	45.518	51 KDa
RII _β	481	46.346	53 KDa

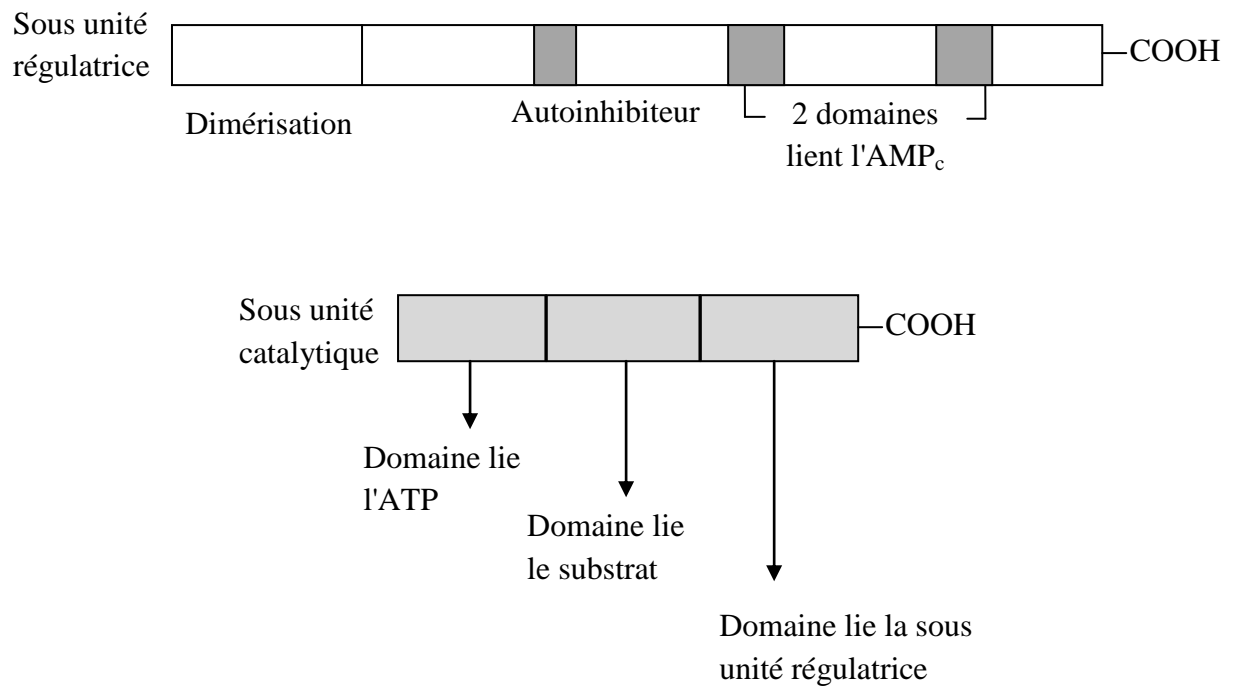


Figure 2: Les deux sous unités régulatrice et catalytique de la PKA (Johnson et al., 2001).

c. Les gènes codants la PKA

Dans la *Saccharomyces cerevisiae*, la voie de la PKA répond au glucose et contrôle la résistance au stress, la glycolyse et la gluconéogénèse (Zurita-Martinez et Cardenas, 2005). La PKA est composée d'une sous unité régulatrice codée par les gènes BCY1 et de trois sous unités catalytiques codées par les gènes TPK1, TPK2 et TPK3 (Cannon et Tatchell, 1987; Toda et al., 1998). Dans les cellules aux repos, la PKA est un tétramère inactif constitué de deux sous unités régulatrices formant un complexe avec deux sous unités catalytiques (Zurita-Martinez et Cardenas, 2005). En réponse à un stimulus externe, comme le glucose, l'adénylate cyclase est activée, le taux d'AMP_c augmente et par conséquent l'AMP_c se fixe à la sous unité régulatrice provoquant un changement de conformation qui libère la sous unité catalytique de la PKA qui devient active (Zurita-Martinez et Cardenas, 2005). L'adénylate cyclase peut être activée par deux voies. Dans le premier cas; le récepteur de glucose (Gpr1) est couplé à la protéine G_α (*Gpa2*) et active la production d'AMP_c en réponse à la fixation d'un ligand. Dans le second cas, les protéines Ras1 et Ras2 fonctionnent en conjonction avec leur régulateurs positifs, les facteurs d'échange du nucléotide guanine Cdc25, Scd 25 pour activer l'adénylate cyclase en réponse au glucose ou à d'autres stimuli (Matten et al., 1994).

En plus, l'hyperexpression de l'allèle dominant actif RAS₂^{v19} induit une augmentation du taux de l'AMP_c (Toda et al., 1998). La protéine Ras est aussi régulée négativement par les protéines GAP (GTPase-activating proteins) Ira1 et Ira2 (Tanaka et al., 1991). Les taux de l'AMP_c et l'activité de la PKA sont négativement contrôlés par la phosphodiesterase (PDE) (Zurita-Martinez et Cardenas, 2005).

1.4. Classification de la PKA

La PKA est classée en deux types I et II selon leur association avec la sous unité régulatrice (RI et RII) (Scott, 1991).

La PKA type I est prédominante dans le cytoplasme, alors que la PKA type II est associée à des structures cellulaires ou à des organes (Scott, 1991).

La PKA type II est une enzyme n'est pas libre mais elle est ancrée dans des localisations spécifiques dans la cellule par des protéines spécifiques appelées: "protéines ancrant de la kinase A" (A kinase anchoring proteins; AKAPs) (Kennelly et Krebs, 1991). Les AKAP gardent la PKA dans sa localisation spécifique et limitent les cibles susceptibles d'être phosphorylés par la PKA, en empêchant la phosphorylation indiscriminée par la PKA libre dans le cytoplasme (Goghlan., 1993).

Plusieurs AKAP sont décrites et se lient à la sous unité R (RII) avec une affinité de quelques nanomole (Carr, 1992). Cependant, la liaison à la sous unité R (RI) a une affinité de quelques micromoles (Burton, 1997). La liaison de RII avec l'AKAP prend une taille de 15 à 300 KDa. Les AKAP sont capables de se lier à d'autres kinases (Colledge et Scott, 1999).

L'ancrage de la PKA module l'activité de plusieurs protéines cellulaires, incluant les récepteurs du glutamate portant les canaux ioniques et les canaux calciques de type L dans les muscles squelettiques (Colledge et Scott, 1999), la sécrétion d'insuline dans les cellules béta clonales (Lester et al., 1997), de la vasopressine, du médiateur de la translocation de l'aquaporine -2 dans les membranes des cellules rénales (Klussmann, 1999), la mobilité du sperme des mammifères (Vijayaraghavan, 1997) et la réaction acrosomale des spermatozoïdes (Harrison et al., 2000). Les peptides dérivants d'AKAP peuvent être utilisés pour inhiber l'activité de la PKA par l'interruption spécifique des kinases (Klussman, 1999).

Les études récentes montrent que les AKAP interagissent avec le domaine (RI) et que la PKA de type I a une localisation spécifique dans la cellule (Miki et Eddy, 1999).

Il existe une autre classification basée sur le mécanisme d'action (Jeannine et Guy, 2005).

La PKA de type I: C'est une enzyme localisée dans le cytoplasme et une fraction soluble de la cellule (Robinson et Stratakis, 2002). Elle existe sous forme associée (c'est-à-dire les deux sous unités catalytiques et régulatrices sont associées). Cette forme fixe deux molécules d'ATP avec une forte affinité ($K_d=10 \mu\text{M}$) (Jeannine et Guy, 2005). Cette fixation diminue l'affinité des sous unités régulatrices pour l'AMP_c (la masse de la sous unité R est différente selon le type de la protéine kinase: le poids moléculaire de la sous unité R de type I est de 49 KDa (Jeannine et Guy, 2005). L'activation de ces enzymes par la dissociation requiert donc des concentrations relativement élevées d'AMP_c (Jeannine et Guy, 2005). Dans le cas de la protéine kinase type I, le mécanisme de la réaction est:



Dans lequel l'ATP est fixé soit à la forme associée soit à la forme dissociée. De plus, sa fixation déplace l'équilibre d'association ($K_d=50 \text{ nm}$) en faveur de la forme associée. L'ATP se comporte donc comme un substrat et un effecteur de la protéine kinase (Jeannine et Guy, 2005).

La PKA de type II: C'est une enzyme ayant une tendance à s'associer avec la membrane cellulaire (Robinson et Stratakis, 2002). Elle est capable de s'autophosphoryler. Cette réaction augmente l'affinité des sous unités R pour l'AMP_c (le poids moléculaire de la sous unité R de type II est de 56 KDa) (Madhusdan et al., 1994). L'activation par dissociation

des sous unités catalytiques et régulatrices est donc effective dans ce cas en présence de concentrations plus faibles d'AMP_c (Jeannine et Guy, 2005).

Il semble que dans les protéines de type I, la fixation de l'ATP implique à la fois une partie du site catalytique et une région particulière de la sous unité R (Jeannine et Guy, 2005). La fixation de l'AMP_c à cette dernière entraîne la dissociation des sous unités permettant la mise en place correcte de l'AMP_c dans le site catalytique pour la phosphorylation (Jeannine et Guy, 2005). L'activité de la sous unité C (PM = 40 KDa) est également inhibée par son interaction avec un inhibiteur protéique naturel thermostable qui se fixe à une séquence de 20 résidus proche de l'extrémité N-terminale (Jeannine et Guy, 2005).

1.5. Distribution de la PKA

La PKA actuellement connue chez les organismes eucaryotes et procaryotes (Hanks et Quinn, 1991). Elle se trouve:

- Au niveau du muscle lisse, la relaxation musculaire implique la PKA qui entraîne la relaxation par l'existence d'un médiateur qui est l'AMP_c qui provoque la diminution de la concentration intracellulaire du Ca²⁺ et l'activation de la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP) (Tajimi et al., 1995). La PKA se trouve aussi au niveau de la membrane plasmique des cellules myometriales (Dodge et al., 1999).
- Au niveau de la membrane de microsomes, de la trachée et du muscle lisse, la PKA phosphoryle les récepteurs de l'IP₃ (Schlossmann et al., 2000) et fait une régulation de la concentration du Ca²⁺ (Patel et al., 1999; Taylor et al., 1999).
- Au niveau du cœur, les récepteurs bêta-adrénergiques 1 et 2 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à l'adénylate cyclase par une protéine G. Leur stimulation induit la formation de l'AMP_c qui active la PKA (Gillot et al., 2006). La stimulation des récepteurs bêta 1 provoque l'accélération de la relaxation cardiaque (Neal, 2007). Alors que le récepteur bêta 2 provoque une stimulation cardiaque (récepteurs non prédominants, mais présents) et une libération de noradrénaline à partir des fibres sympathiques (Neal, 2007).
- Au niveau des vaisseaux sanguins, la PKA stimule les récepteurs bêta 2 adrénergiques et provoque la relaxation des fibres lisses, et même au niveau des branches de l'utérus et de l'intestin (Gillot et al., 2006).
- Au niveau du foie, la stimulation des récepteurs bêta 2 par la PKA provoque la glycogénolyse et la néoglycogénèse hépatique (Neal, 2007).

- Au niveau des artères pulmonaires, la PKA est activée par la forte concentration de l'AMP_c et même de GMP_c (Gillot et al., 2006).
- Au niveau du cytosol mamalien: le cytosol contient au moins deux types de PKA: I et II (Pelmont, 1993).