

II- Effets de la MLCK sur l'activité motrice

La phosphorylation de la RLC de la myosine II par le complexe Ca^{2+} /Calmoduline-dépendant de MLCK est nécessaire pour l'initiation de la contraction des muscles lisses et les cellules non musculaires (Zoe et al., 2000). La phosphorylation de la myosine est décrite dans les muscles squelettique et cardiaque, mais dans ces cellules sa fonction est différente à celle dans les muscles lisses et les cellules non musculaires (Adelstein, 1983).

Dans les muscles striés, la phosphorylation ne joue pas un rôle principal dans la régulation de la contraction mais elle est nécessaire pour moduler la réponse contractile par la diminution de l'utilisation de l'ATP, pour potentialiser la force et augmenter la vitesse de la contraction (Cooke et al., 1982; Craw et Kushmerik, 1982). Tous ces effets sont dépendants de Ca^{2+} qui se lie à la troponine et à l'actine de fibre mince (Kristine et al., 2000).

L'activité des muscles lisses et de la myosine II des cellules non musculaires de vertébrés sont réglées par la phosphorylation de la RLC de myosine. Le complexe Ca^{2+} /Calmoduline-dépendant de la MLCK phosphoryle la RLC de myosine sur la serine-19 et à une moindre mesure sur la thréonine-18 (Kamm et Stull, 1985).

2-1- Effets de la MLCK sur l'activité motrice de la myosine du muscle lisse

L'activation du muscle lisse par différents agonistes ou par la dépolarisation électrique, typiquement résulte de l'augmentation rapide de la concentration de Ca^{2+} qui est due à l'influx de Ca^{2+} extracellulaire. Le Ca^{2+} lié à la calmoduline active la MLCK, ce qui conduit, d'une manière prédominante, à la phosphorylation de la serine-19 de RLC de myosine qui peut atteindre des niveaux maximaux dans quatre secondes (Fischer et Pitzer, 1989) (**Fig. 2**). La phosphorylation de la RLC permet à la myosine ATPase d'être activée par l'actine et les muscles se contractent (Kamm et Stull, 1985).

Dans les muscles lisses, le Ca^{2+} libéré dans le cytosol se combine avec la calmoduline pour former un complexe Ca^{2+} /Calmoduline actif (Stull et James, 2004). La fixation réversible de Ca^{2+} sur la calmoduline induit un changement de conformation de la molécule qui va s'interagir avec la MLCK. Le complexe Ca^{2+} /Calmoduline active la pompe Ca^{2+} et la PKC (Eckert et al., 1999), et stimule la MLCK qui va phosphoryler la RLC au niveau de la serine-19 et la thréonine-18, ce qui conduit à un changement de leur conformation, elle passe à une conformation plus allongée et devient capable de se lier à l'actine (Marita et al., 1991). La phosphorylation de la MLCK est nécessaire à l'interaction actine-myosine et donc à la contraction de la cellule musculaire lisse (Ikebe et al., 1994).

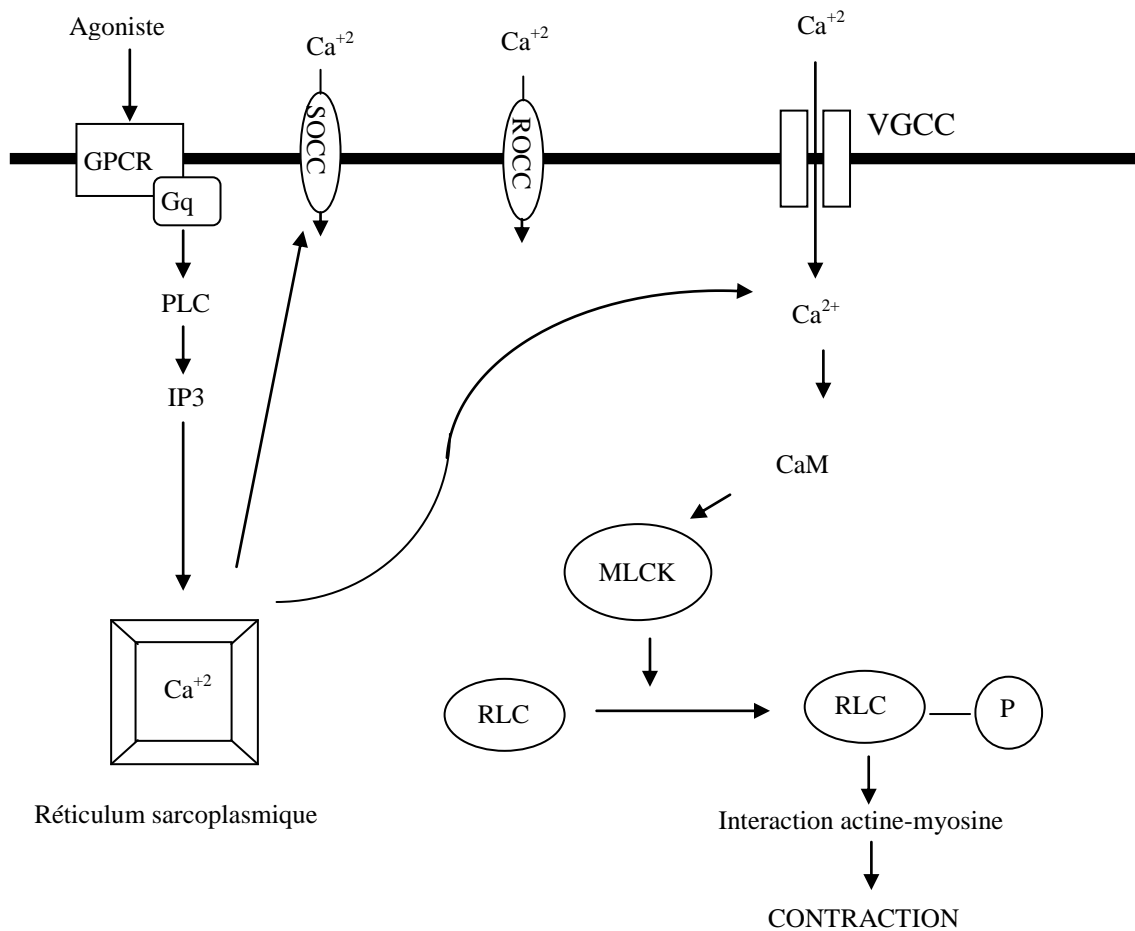


Figure 2. Rôle de Ca²⁺ dans la contraction musculaire.

Une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ conduit à sa liaison à la calmoduline, ce complexe active la MLCK pour phosphoryler la chaîne légère de myosine II (Kenneth et al., 2004).

- SOCC: Store-Operated Calcium Channel.
- ROCC: Receptor-Operated Calcium Channel.
- VGCC: Voltage-Operated Calcium Channel.
- GPCR: G Protéine-Coupled Receptor.

La phosphorylation des RLC de myosine entraîne le démasquage du site de liaison de l'actine sur la tête de myosine lourde (Eckert et al., 1999), et la formation de complexe actomyosine, ce qui provoque un glissement des filaments fins sur les filaments épais et donc la contraction (Allain, 2004). La force nécessaire est produite par l'activité ATPasique intrinsèque de la myosine qui hydrolyse l'ATP en ADP et Pi (Khromov et al., 2004) (**Fig. 3**).

L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) provoque la libération de Ca²⁺ intracellulaire, suivie par des influx de Ca²⁺ extracellulaire à travers les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants et indépendants (Hofmann et al., 2000). L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ initie la contraction par l'activation de la MLCK-Ca²⁺/Calmoduline dépendante qui phosphoryle les chaînes légères de myosine et par conséquent l'activation de la myosine ATPase. La diminution de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire inactive la MLCK et provoque la déphosphorylation de la RLC par la myosine phosphatase (Hofmann et al., 2000)

2-1-1- Site de fixation de la MLCK sur l'actine

En plus de son activité kinase, la MLCK de muscle lisse a une activité de liaison à l'actine, par laquelle elle peut réguler l'interaction actine-myosine du muscle lisse (Ye et al., 1997). La MLCK est présentée en association avec une liaison sarcomérique, et se lie au filament avec une haute affinité (Dabrowska et al., 1982). La MLCK peut inhiber l'interaction dépendante de l'ATP entre l'actine et la myosine par la liaison au filament d'actine (Ye et al., 1997).

Généralement, la MLCK possède deux sites de liaison à l'actine sur le N-terminal du domaine central de la kinase, le site responsable de l'effet inhibiteur est la séquence Méthéonine-1-Proline-41 et la calmoduline réagit avec la MLCK dans la séquence Proline-26-Proline-41 (Ye et al., 1997).

L'obtention du domaine central de la kinase par protéolyse de la MLCK et la purification du domaine C-terminal de télokin montrent que seule la séquence de 1 à 41 résidus est responsable de la liaison du complexe Ca²⁺/Calmoduline au MLCK, ce qui permet l'interaction actine myosine (Shirinsky et al., 1983; Ye et al., 1997).

La liaison de l'actine au MLCK peut être effectuée sur deux sites: un site sensible au complexe Ca²⁺/Calmoduline et un site non sensible à ce complexe (Ye et al., 1997) (Tableau 1). Le premier site est impliqué dans l'effet inhibiteur de la MLCK sur l'interaction actine myosine, l'autre site n'a aucune activité régulatrice (Ye et al., 1997).

Dans le site sensible au complexe Ca²⁺/Calmoduline, le site de liaison à l'actine est localisé à l'extrémité N-terminale de la MLCK. Il est constitué de la séquence de Méthéonine-1-Proline-41 (Ye et al., 1997). Cette localisation est déterminée par une

comparaison de l'activité de liaison à l'actine du fragment recombinant NN (exprime les segments d'acides aminés de 1 à 337 de la MLCK Bovine) qui contient seulement le site sensible au complexe Ca^{2+} /Calmoduline avec celui du fragment NN/41, qui est dépourvue de la séquence 1-41 de fragment NN (Ye et al., 1997).

Contrairement à ce site de liaison, la position de site de liaison non sensible au complexe Ca^{2+} /Calmoduline à l'actine n'est pas déterminée précisément, tout qui peut être conclu est que ce site se trouve dans le fragment NC (fragment exprime les acides aminés de 19 à 721 de la MLCK de l'estomac Bovin), et localisé entre le site sensible au complexe Ca^{2+} -calmoduline et le domaine central de la MLCK (Ye et al., 1997).

Tableau 01. Liaison de la MLCK aux filaments d'actine: leur fragments et leur effets Inhibiteurs sur l'interaction actine-myosine (Ye et al., 1997).

MLCK et leur fragments	Sites de liaison de l'actine		Effets inhibiteurs de l'interaction actine-myosine
	Site sensible au complexe Ca^{2+} /CaM	Site insensible au complexe Ca^{2+} /CaM	
-MLCK	+	+	+
-Fragment NTCB	+	-	+
-Fragment NN	+	-	+
-Fragment NC	-	+	-
-Fragment NN/41	-	-	-
-Fragment NN/25	±	-	-

La séquence Méthionine-1- Proline-41 est responsable de la liaison du complexe Ca^{2+} /Calmoduline à l'actine. Ce site de liaison exerce un effet inhibiteur sur l'interaction actine-myosine seulement quand la myosine est phosphorylée (Ye et al., 1997).

2-1-2- Site de fixation de la MLCK sur la calmoduline

En présence de Ca^{2+} , le domaine C- terminal de la calmoduline se lie au domaine N-terminal de la séquence de liaison de calmoduline dans la MLCK (Kristine et al., 2000). L'interaction de la calmoduline avec la partie catalytique de la MLCK est nécessaire pour son activation (Dabra wska et al., 1982).

Le segment régulateur se déplace ultérieurement du site catalytique avec la calmoduline dans une position proche de la fin mais adjacente de la partie catalytique. L'exposition de site catalytique de la kinase permet à la séquence N-terminale de la RLC de myosine de se lier et permet le transfert du phosphate à partir de l'ATP à la RLC, ce qui conduit à la réorientation de la calmoduline (Kristine et al., 2000).

La MLCK possède un autre site de fixation à la calmoduline pour réguler son activité kinase; le site est la séquence Alanine-796-Serine-815 pour la MLCK de Poulet (Olson et al., 1990), et la séquence Alanine-1002-Serine-1021 pour la MLCK de l'estomac des Bovins (Kobayashi et al., 2002) (**Fig. 3**).

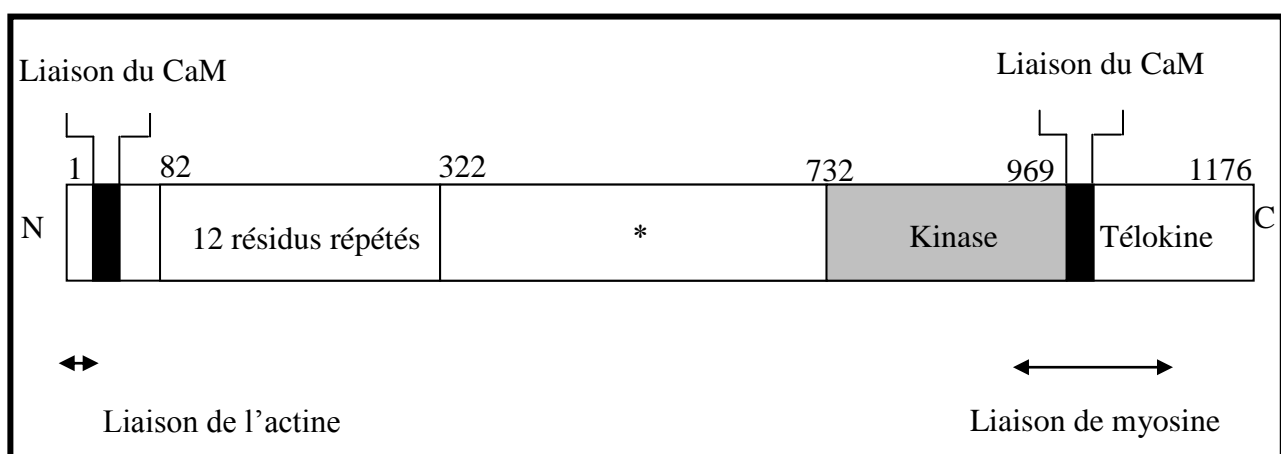


Figure 3. Site de fixation de la calmoduline sur la MLCK (Ye et al., 1997).

2-1-3- Phosphorylation de la RLC de myosine par la MLCK

L'activité de la MLCK du muscle lisse peut être moduler par la phosphorylation des RLC de myosine dans des sites spécifiques qui aboutit à l'augmentation des valeurs du K_{cam} ou V_{max} (Poperechnaya et al., 2000) (**Fig. 4**).

La phosphorylation de la serine-19 et la thréonine-18 stimule l'activité de myosine, tandis que la phosphorylation de la serine-1, la serine-2 et la thréonine-9 conduit à l'inhibition de l'activité de myosine (Chew et al., 2002). La phosphorylation de la serine-19 par la MLCK régule l'activité de l'actine qui active la myosine ATPase, et la formation des filaments de myosine (Ikebe et al., 1988). La déphosphorylation de la thréonine-18 et de la serine-19 conduit à une augmentation de l'activité ATPasique de la myosine activée par l'actine, cette augmentation est supplémentaire par rapport à celle obtenue avec la monophosphorylation en serine-19 (Ikebe et al., 1985).

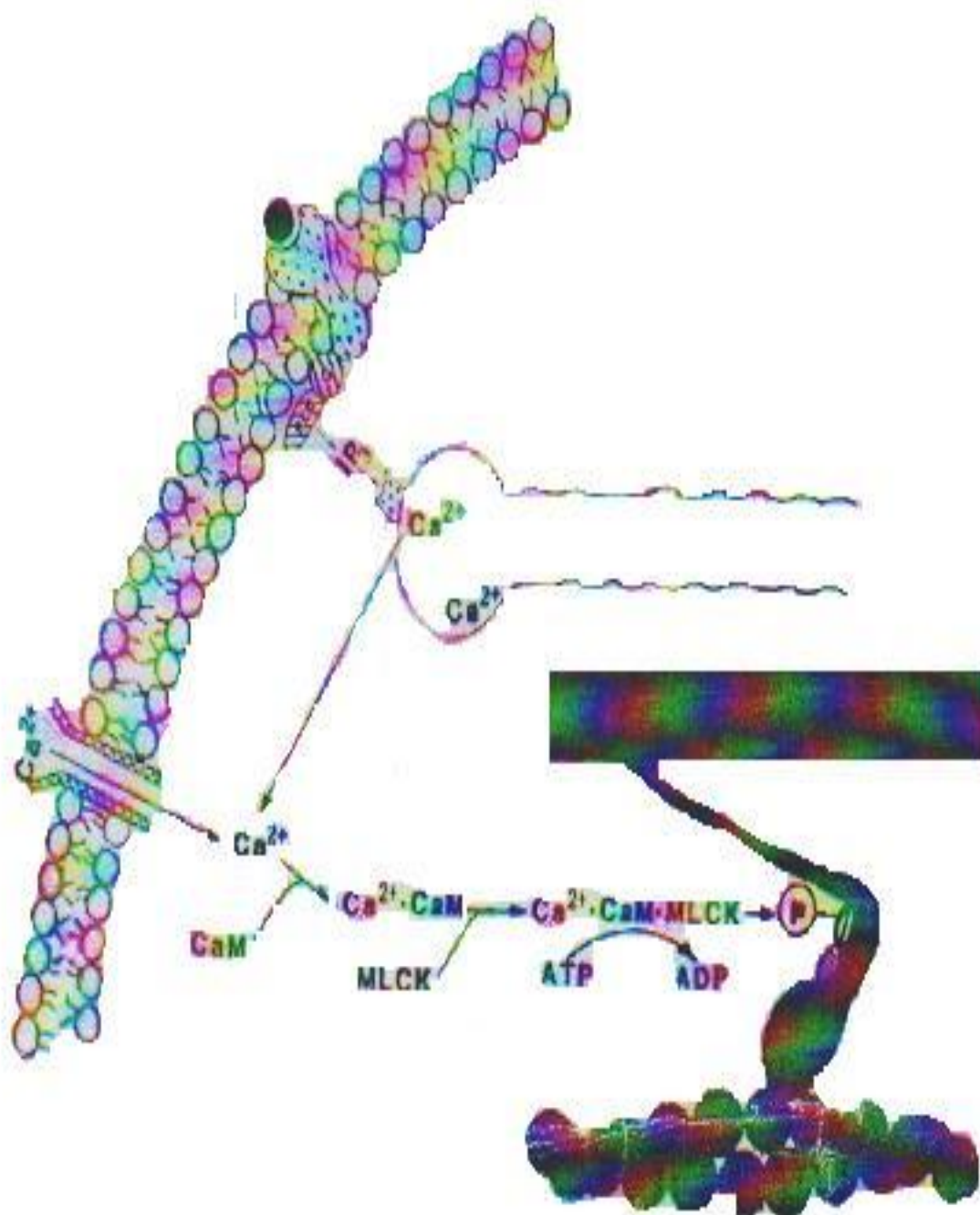


Figure 4. La contraction du muscle lisse (Barany, 1996).

2-1-4- Modulation de la phosphorylation de la RLC par le Ca²⁺

La sensibilité de la phosphorylation de la RLC au Ca²⁺, peut être moduler par l'action de différents signaux qui modifient l'activité de la MLCK ou l'activité de myosine phosphatase. La sensibilité de la phosphorylation au Ca²⁺ intracellulaire devient constante et la phosphorylation de la RLC augmente en réponse à l'application des agonistes qui conduisent à l'inhibition de la myosine phosphatase GTP-dépendante (Somlyo et somlyo, 2000) (**Fig. 5**).

La désensibilité de la phosphorylation de la RLC au Ca²⁺ se produit sur la phosphorylation de MLCK dans le domaine C- Terminal de la séquence de liaison de calmoduline. Bien que la réponse prédominante du muscle lisse aux agents dilatatoires, (les agonistes β -adrénergiques ou l'oxyde nitrique) est la déphosphorylation de la RLC qui peut être provoqué sans diminution de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (tel que, quand l'AMPc est élevée dans les muscles dépolarisés) (Kothikoff et Kamm, 1996). Dans ce cas, la phosphorylation de la MLCK est augmentée, ce qui suggère que la désensibilité de la phosphorylation de la RLC au Ca²⁺ peut résulter de l'activation de la myosine phosphatase AMPc-dépendante (Win et al., 1998).

La régulation de la phosphorylation de la RLC-Ca²⁺-dépendante par la concentration de Ca²⁺ intracellulaire est effectuée de deux manières: par l'augmentation de la phosphorylation suite à l'activation de la protéine kinase, et à fortes concentration par la stimulation de la phosphorylation de la protéine kinase II-dépendante de la calmoduline (CAMKII) de la MLCK (Kristine et al., 2000).

2-1-5- Rôle de l'AMPc dans la régulation de l'activité de la MLCK

La MLCK est une enzyme qui catalyse la phosphorylation du substrat spécifique de myosine, dont elle catalyse seulement la phosphorylation de la chaîne légère de myosine. Bien que la MLCK a besoin du complexe Ca²⁺/Calmoduline, pour son activité, elle est elle-même un substrat pour la protéine kinase- AMPc-dépendante qui module son activité (Adelstein, 1983).

La MLCK peut être phosphorylée en présence et en absence du complexe de liaison Ca²⁺/Calmoduline. Quand la MLCK est phosphorylée par la protéine kinase – AMPc-dépendante en présence du complexe Ca²⁺/Calmoduline, une mole de phosphate est incorporée dans la MLCK sans aucun effet sur son activité. La phosphorylation de la MLCK en absence du complexe Ca²⁺/Calmoduline conduit à l'augmentation rapide du taux d'incorporation du phosphate et aboutit à l'incorporation de deux moles de phosphate (Adelstein, 1983).

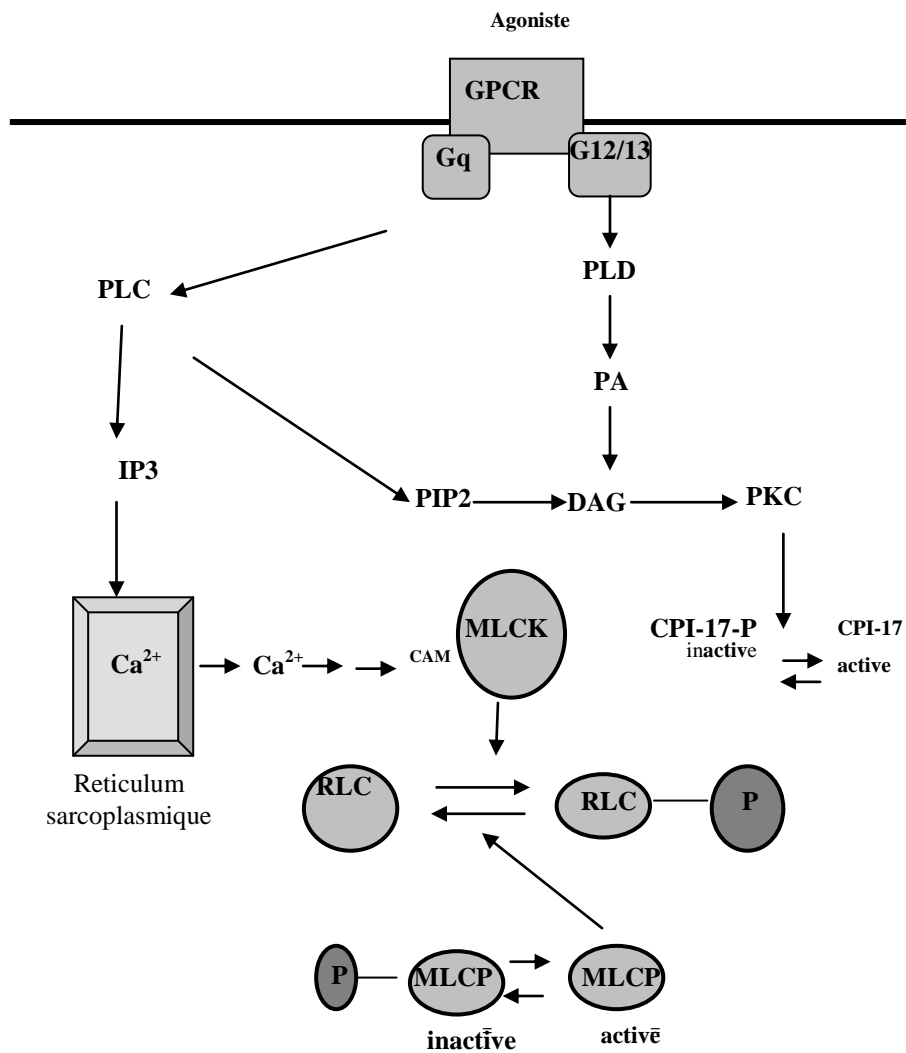


Figure 5. Rôle de la sensibilité au Ca^{2+} dans la contraction du muscle lisse (Kenneth et al., 2005).

- GPCR: G protein-coupled receptor.
- CPI-17: 17KD a inhibitory protein

L'AMPc dans les muscles lisses transforme la MLCK inactive mais activable, en MLCK phosphorylée qui ne peut pas se combiner à la calmoduline pour phosphoryler la myosine (Allain, 2004), la déphosphorylation de cette dernière entraîne la relaxation (Karaki et al., 1997) (**Fig. 6**).

La relaxation du muscle lisse se présente d'une manière dépendante de l'AMPc et du GMPc (Somlyo et Somlyo, 2000). La stimulation de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA) induit l'activation de l'adénylate cyclase, alors que l'activation de GMPc et de la protéine kinase G (PKG) est médiée par l'oxyde nitrique qui se lie à la guanylate cyclase soluble (Somlyo et Somlyo, 2003). La PKG peut activer les canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} , phosphoryle et inactive les canaux calciques voltage-dépendants de type L pour inhiber les influx de Ca^{2+} . Elle est capable, d'activer les échanges Na^+/Ca^{2+} et la Ca^{2+} -ATPase dans la membrane plasmique, aboutissant à l'augmentation de la sortie de Ca^{2+} (Hamed et al., 2003). En plus, la PKG augmente la resequstration de Ca^{2+} par la phosphorylation de phospholambane, la protéine régulatrice de Ca^{2+} -ATPase sarcoplasmique (Watterson et al., 2005). La PKG peut inhiber des agonistes, qui provoquent la production de l' IP_3 (Komalavila et Lincoln, 1996).

2-2-Effet de la MLCK sur l'activité motrice de la myosine du muscle strié

Dans les muscles striés, la phosphorylation des chaînes légères de myosine augmente la tension isométrique générée à une concentration submaximale de Ca^{2+} , par diminution de K_m (constant de Michaelis) de l'actine pour la myosine (Morano et al., 1985). Dans une concentration maximale de Ca^{2+} , la phosphorylation des chaînes légères n'a aucun effet sur la force de contraction. Dans les muscles striés de l'adulte, la phosphorylation de RLC joue un rôle régulateur important mais n'est pas obligatoire pour la contraction musculaire (Paul herring et al., 2000).

2-3-Effet de la MLCK sur l'activité motrice de la myosine du muscle cardiaque

Plusieurs neurohormones modifient la force de contraction de Ca^{2+} intracellulaire. Les stimulations α_1 -adrénergiques et muscariniques, modifient la sensibilité des protéines contractiles aux ions Ca^{2+} (Clement et al., 1992). Les chaînes légères de myosine cardiaque peuvent être aussi phosphorylées par la MLCK (Walsh et al., 1979). Plusieurs études suggèrent que la phosphorylation de la RLC cardiaque est importante pour maintenir une fonction cardiaque normale (Terzic et al., 1991). La phosphorylation des protéines contractiles augmente la tension dans le muscle cardiaque.

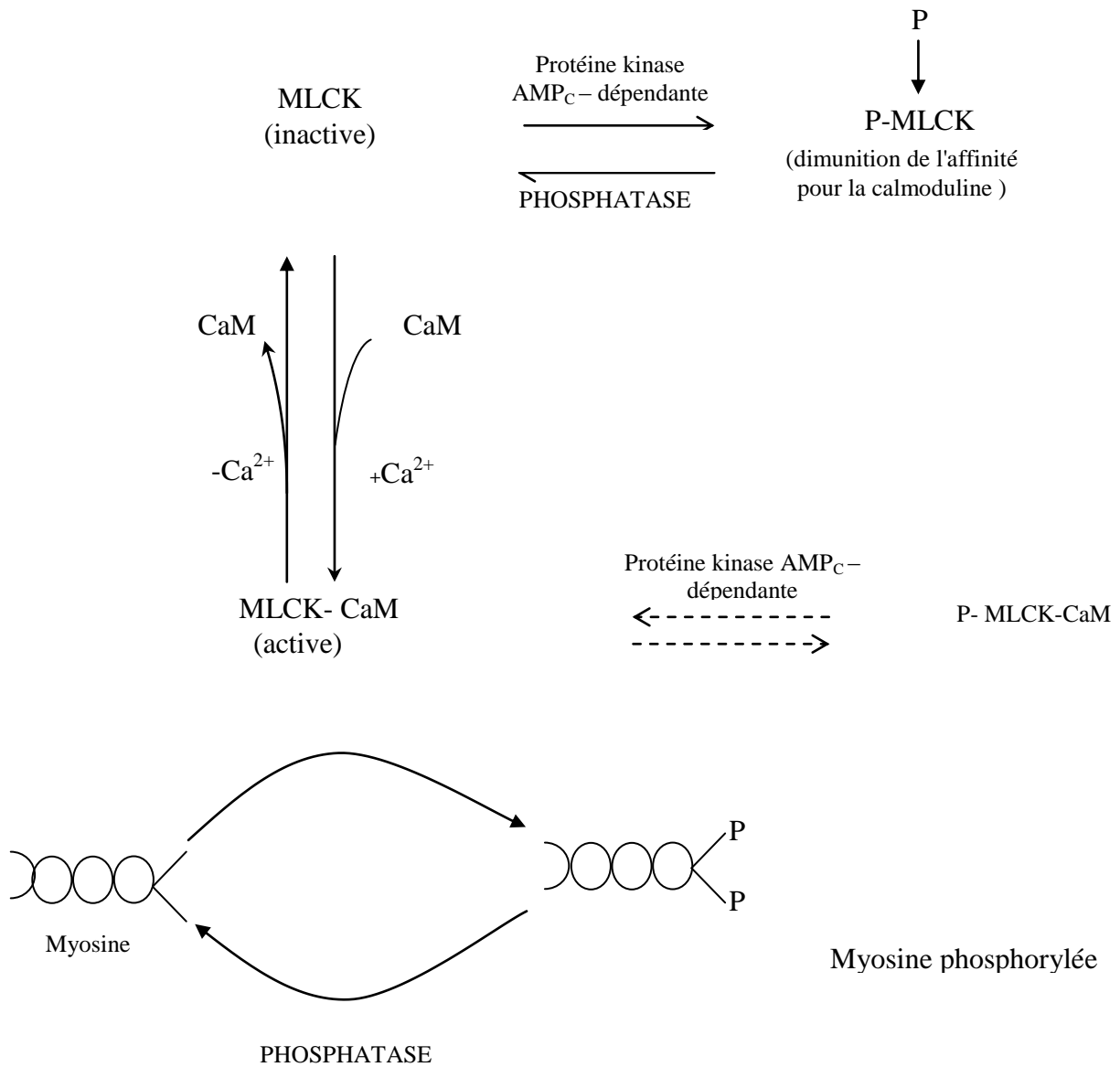


Figure 6. Effet de la phosphorylation de la myosine.

La myosine est phosphorylée par la MLCK qui est activée par le complexe Ca²⁺/Calmoduline (Robert et al., 1983).

Cette augmentation est améliorée par le traitement des cellules de la peau par la MLCK en présence de la PKC active. La modulation directe, par le complexe Ca^{2+} /calmoduline, de l'activité de la MLCK après une stimulation α_1 -adrénergique et muscarinique n'est pas identique dans les tissus cardiaques (Clement et al., 1992).

2-4-Effet de la MLCK sur l'activité motrice de la myosine des cellules non musculaires

Dans les cellules non musculaires, la MLCK est impliquée dans la régulation de la motilité, la mitose et la sécrétion (Means et al., 1991). La phosphorylation de la RLC par la MLCK dans les cellules et les tissus non musculaires est une fonction physiologique importante (Wadgaonkar et al., 2003). Dans les cellules non musculaires, la phosphorylation de la serine-19 de la myosine II est en corrélation avec la migration cellulaire et la cytokinèse (Majercit et Bourguignon, 1988).

Dans les fibroblastes, la déphosphorylation de la RLC de myosine provoque la circulation cellulaire et la diminution de la prolifération (Shoemaker et al., 1990). Aussi, l'inhibition de la MLCK, peut bloquer l'extension des lamellipodes et inhiber la chimio-attraction qui stimule la locomotion cellulaire. Cette observation démontre le rôle de la MLCK dans la motilité et la morphologie cellulaire (Walker et al., 1998).

Cependant, il est trouvé récemment que, la MLCK des cellules non musculaires peut être régulée par des mécanismes qui apparaissent pour être indépendants des échanges dans la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Kristine et al., 2001). Cette observation donne la possibilité que différents signaux de transduction peuvent jouer un rôle dans le contrôle de la régulation de la phosphorylation de la RLC. Donc cette régulation peut se faire par la kinase Rho associée au protéine kinase, qui phosphoryle directement la RLC au niveau de la Serine-19. La protéine mitogène active (MAP), la kinase ERK1 peuvent phosphoryler et activer la MLCK *in vitro* (Kristine et al., 2000).