

Les substrats de p34^{cdc2}, la kinase spécifique de la phase M du cycle cellulaire La liste continue de s'allonger

Durant la mitose, la structure cellulaire se modifie considérablement : la membrane nucléaire se disloque, la chromatine se condense et les transports entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique sont inhibés. La phase M voit l'activation de la protéine kinase p34^{cdc2}, dont les cibles sont nombreuses : oncogènes (*c-Abl*, *p60^{src}*), caséine kinase II, protéines des microtubules, de la membrane nucléaire et des nucléoles, facteurs d'élongation de la traduction et constituants du système contractile. La kinase p34^{cdc2}, associée à des cyclines, joue ainsi probablement le rôle de chef d'orchestre des modifications structurales accompagnant la mitose, soit en phosphorylant directement certains constituants cellulaires, soit en activant en cascade des protéines kinases qui vont elles-mêmes phosphoryler d'autres cibles.

Jean-Claude Cavadore
Françoise Le Bouffant
Jean-Claude Labbé

Au cours de la mitose s'opèrent dans la cellule un grand nombre de changements structuraux et l'arrêt des phénomènes de transport membranaire. L'état mitotique est caractérisé par l'activation d'une protéine kinase, p34^{cdc2}, spécifique de la métaphase. Dans cet article, nous décrivons l'identification de certaines cibles de cette kinase comme les microtubules, les lamines, certaines protéines nucléaires, un facteur d'élongation EF-1 γ , les produits des oncogènes *c-Abl* et *c-src*, la caldesmone et les chaînes légères de la myosine protéine qui sont spécifiquement phosphorylées durant la transmission interphase/métaphase.

Pendant le cycle cellulaire, la transition interphase/mitose s'accompagne d'une réorganisation structurale générale

de la cellule qui est caractérisée par un ensemble de modifications telles la rupture de l'enveloppe nucléaire, la condensation de la chromatine, la vésicularisation du Golgi et du réticulum endoplasmique, la formation d'un fuseau de division, la réorganisation du cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires, microtubules). Ces modifications structurales réversibles en fin de mitose sont induites par le facteur de maturation MPF (*maturation promoting factor*), complexe moléculaire dont l'action est nécessaire et suffisante, dans les ovocytes, pour provoquer la cascade d'événements conduisant à une mitose totale (voir l'article de C. Le Peuch, *m/s* n° 1, vol. 6, p. 10). Ce facteur a été caractérisé par plusieurs groupes à partir de divers matériels biologiques [1-3] ; il est composé de deux sous-unités [4] : une protéine

ADRESSE

J.-C. Cavadore : directeur de recherches à l'Inserm. F. Le Bouffant : chargée de recherche Cnrs. J.-C. Labbé : chargé de recherche Cnrs. Centre de recherches de biochimie macromoléculaire/Cnrs et Inserm U. 249, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

RÉFÉRENCES

1. Lohka M, Hayes MK, Maller JL. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3009-13.
 2. Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. *cdc2* is a component of the M-phase specific histone H1 kinase : evidence for identity with MPF. *Cell* 1988 ; 55 : 371-8.
 3. Labbé JC, Picard A, Peaucellier G, Cavadore JC, Nurse P, Dorée M. Purification of MPF from starfish : identification as H1 histone kinase *p34^{cdc2}* and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* 1989 ; 57 : 253-63.
 4. Labbé JC, Capony JP, Caput D, et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. *EMBO J* 1989 ; 8 : 3053-8.
 5. Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of MPF activity. *Nature* 1989 ; 339 : 280-6.
 6. Verde F, Labbé JC, Dorée M, Karsenti E. Regulation of microtubule dynamics by *cdc2* protein kinase in cell-free extract of *Xenopus* eggs. *Nature* 1990 ; 343 : 233-8.
 7. Salmon ED, Saxton WH, Leslie RJ, Karow ML, McIntosh RJ. Diffusion coefficient of fluorescein-labeled tubulin in the cytoplasm of embryonic cell of sea urchin : video image analysis of fluorescence redistribution after photobleaching. *J Cell Biol* 1984 ; 99 : 2157-64.
 8. Feartherstone C, Griffiths G, Warren G. Newly synthesized G protein of vesicular stomatitis virus is not transported to the Golgi complex in mitotic cell. *J Cell Biol* 1985 ; 101 : 2036-46.
 9. Tuomikoski T, Felix MA, Dorée M, Gruenberg J. Inhibition of endocytic vesicle fusion *in vitro* by the cell-control protein kinase *cdc2*. *Nature* 1989 ; 342 : 942-5.
 10. Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. *In vitro* disassembly of the nuclear lamin and M-phase specific phosphorylation of lamin by *cdc2* kinase. *Cell* 1990 ; 591-602.
 11. Ward GE, Kirschner MW. Identification of cell-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 1990 ; 61 : 561-77.
- kinase de 34 kDa homologue au produit du gène *cdc2* de *Schizosaccharomyces pombe*, et d'une cycline, protéine qui s'accumule au cours du cycle et qui active la kinase *p34^{cdc2}* lorsqu'un seuil de concentration est atteint [5].
- Ces derniers mois, un nombre important de publications ont décrit les cibles de la kinase *p34^{cdc2}* ; le nombre de ces cibles est actuellement en constante progression.

p34^{cdc2} **et microtubules**

On sait que les microtubules sont impliqués à la fois dans le transport de vésicules et le transit membranaire pendant l'interphase et dans le transport des chromosomes durant la mitose. En utilisant un système acellulaire comprenant des extraits d'œuf de xénope, des centrosomes et de la kinase *p34^{cdc2}* purifiés, Verde *et al.* [6] ont établi qu'il existait une corrélation entre la longueur des microtubules et l'activité H1 histone kinase de *p34^{cdc2}*, la longueur des microtubules diminuant lorsque l'activité kinase augmente. Ces changements dans la stabilité dynamique des microtubules sous l'influence de la kinase *p34^{cdc2}* sont très similaires à ceux observés *in vivo* durant la transition interphase/mitose [7]. L'analyse de ces résultats *in vitro* montre que l'état de phosphorylation d'un facteur, qui pourrait être une protéine spécifique associée aux microtubules (MAPx), est contrôlé par l'équilibre entre *p34^{cdc2}* et une ou des phosphatases. Ce facteur phosphorylable semble directement responsable de la modulation de l'instabilité dynamique des microtubules.

p34^{cdc2} **et endocytose**

Au cours de la mitose, le transport de vésicules membranaires impliquant des fusions de vésicules d'endocytose est inhibé [8] ; durant cette même phase du cycle, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique se fragmentent en vue de leur égale partition dans les cellules filles. Tuomikoski *et al.* [9] ont montré que la fusion de vésicules membranaires préparées à partir de cel-

lules BHK (*baby hamster kidney cells*) est inhibée par des extraits mitotiques de xénope. Par ailleurs, l'addition de kinase *p34^{cdc2}* purifiée à des extraits interphasiques provoque une inhibition de 90 % de la fusion des vésicules d'endocytose. Ces résultats montrent que les événements précoces dans la fusion des vésicules sont sous le contrôle de la kinase *p34^{cdc2}* et que celle-ci joue probablement un rôle important dans les mécanismes de contrôle du trafic membranaire des cellules mitotiques.

p34^{cdc2} **et enveloppe** **nucléaire**

Durant la transition interphase/méphase, on constate, dans toutes les cellules, une disparition de la membrane nucléaire. Cette enveloppe est schématiquement constituée de deux membranes : l'une externe, en continuité morphologique avec le réticulum, et l'autre interne, tapissée par un réseau fibrillaire protéique, les lamines. La fonction de ce réseau fibrillaire est de participer, d'une part, à l'attachement de la chromatine à la membrane nucléaire, par l'intermédiaire d'une isoprénylation des lamines, et, d'autre part, à l'organisation spatiale de la chromatine interphasique. Ces protéines de 65-70 kDa sont biochimiquement apparentées aux filaments intermédiaires, elles ont en commun une organisation structurale en trois domaines (tête, corps central en hélice α de 53 nm et queue de longueur variable). Les lamines ont été classées sur des bases fonctionnelles en deux types principaux, les lamines A et C complètement solubilisées au cours de la mitose et les lamines B qui restent associées aux membranes tout au long du cycle cellulaire. Ces lamines sont phosphorylées tout au long du cycle, mais une augmentation du taux de phosphorylation est observée durant la mitose et il a été proposé que la dépolymérisation des lamines au cours de la mitose soit directement reliée à leur phosphorylation. Cependant, la nature de la kinase responsable de cette dépolymérisation n'était pas identifiée jusqu'ici. Deux mémoires récents publiés simultanément ont établi la

nature de la kinase et les séquences des sites de phosphorylation, c'est ainsi que Peter *et al.* [10] ont montré que la lamine kinase impliquée était p34^{cdc2} et que les sites phosphorylés *in vitro* étaient identiques à ceux obtenus *in vivo* au cours de la phase M. Une de ces phosphorylations, dans le cas de la lamine B de poulet, s'effectue sur la sérine 16, dans un motif SPTR (Ser-Pro-Thr-Arg), résidu conservé dans la partie N-terminale de toutes les lamines. Ces mêmes auteurs ont clairement établi que la phosphorylation sur la sérine 16 est associée, *in vitro*, à la

dépolymérisation de la lamine B de poulet. Des résultats similaires ont été rapportés par Ward et Kirschner [11], qui ont déterminé l'existence de 4 sites phosphorylables sur la lamine C humaine et identifié 3 de ces 4 sites aux sérines 22, 392, 404, la phosphorylation sur le résidu Ser 392 étant spécifique de la phase M. L'analyse des sites de phosphorylation suggère que plusieurs protéines kinases différentes peuvent agir, la S6 kinase II semblant un candidat physiologique plausible. Une confirmation de la nature des sites de phosphorylation a été donnée de

manière élégante par Heald et Mac Keon [12] qui, par mutagenèse des résidus sérine 22 et 392 de la lamine A humaine en résidus alanine, ont montré que la suppression de la phosphorylation entraîne une absence de dépolymérisation des lamines A. Outre les lamines, d'autres protéines nucléaires sont aussi des cibles de p34^{cdc2} pendant la mitose. Peter *et al.* [13] ont ainsi pu mettre en évidence deux substrats majeurs de phosphorylation, la nucléoline et la protéine No38. Ces protéines de 96 et 36 kDa sont impliquées dans la

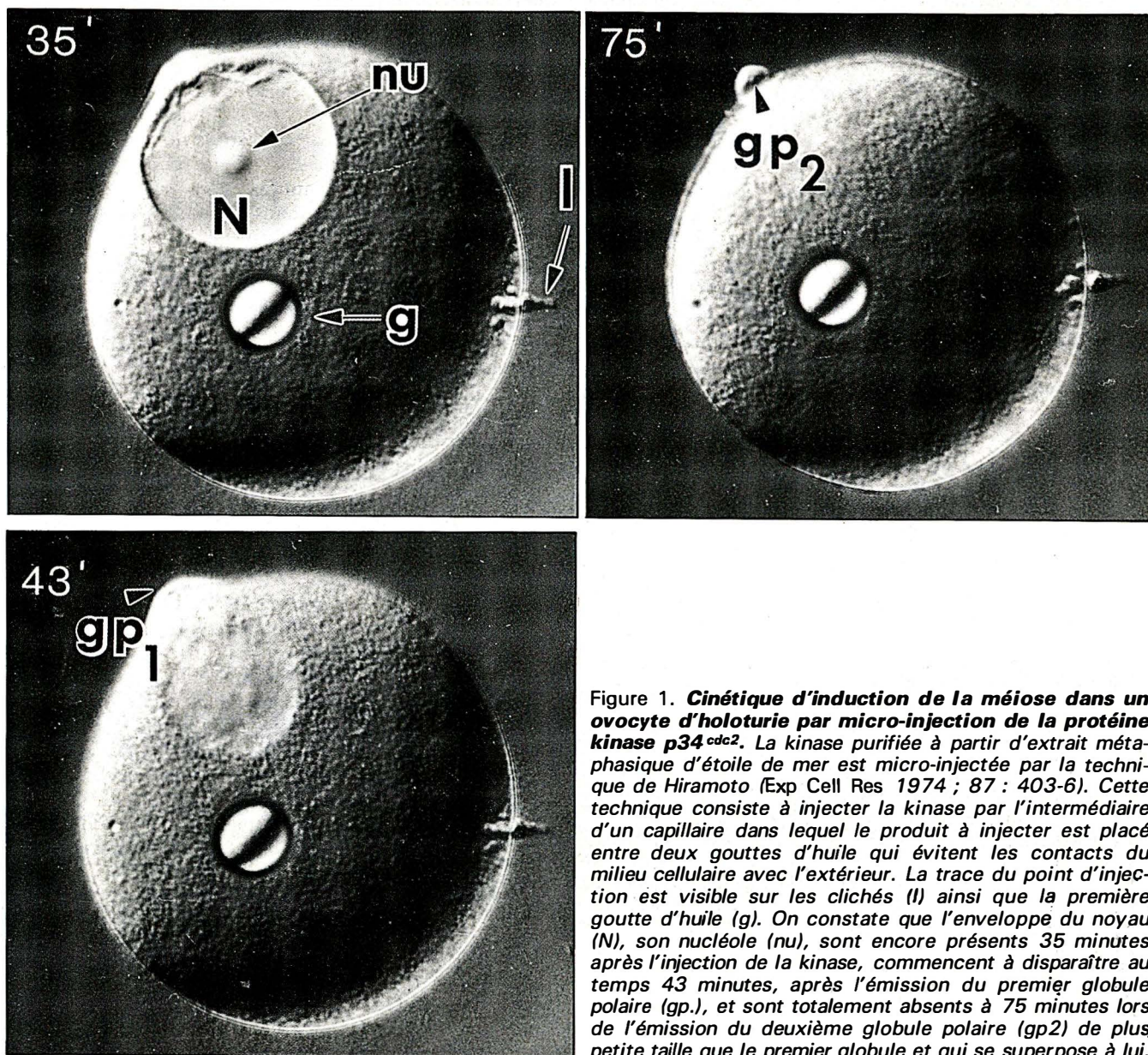


Figure 1. **Cinétique d'induction de la méiose dans un ovocyte d'holoturie par micro-injection de la protéine kinase p34^{cdc2}.** La kinase purifiée à partir d'extrait métaphasique d'étoile de mer est micro-injectée par la technique de Hiramoto (Exp Cell Res 1974 ; 87 : 403-6). Cette technique consiste à injecter la kinase par l'intermédiaire d'un capillaire dans lequel le produit à injecter est placé entre deux gouttes d'huile qui évitent les contacts du milieu cellulaire avec l'extérieur. La trace du point d'injection est visible sur les clichés (I) ainsi que la première goutte d'huile (g). On constate que l'enveloppe du noyau (N), son nucléole (nu), sont encore présents 35 minutes après l'injection de la kinase, commencent à disparaître au temps 43 minutes, après l'émission du premier globule polaire (gp1), et sont totalement absents à 75 minutes lors de l'émission du deuxième globule polaire (gp2) de plus petite taille que le premier globule et qui se superpose à lui.

RÉFÉRENCES

12. Heald R, McKeon F. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamin desassembly in mitosis. *Cell* 1990 ; 61 : 579-89.
 13. Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* 1990 ; 60 : 791-801.
 14. Mulner-Lorillon O, Poulhe R, Cormier P, Labbé JC, Dorée M, Bellé R. Purification of a p47 phosphoprotein from *Xenopus laevis* oocytes and identification as an *in vivo* and *in vitro* p34^{cdc2} substrate. *FEBS Lett* 1989 ; 251 : 219-24.
 15. Bellé R, Derancourt J, Poulhe R, Capony JP, Ozon R, Mulner-Lorillon O. A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an *in vivo* substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 γ and EF-1 β . *FEBS Lett* 1989 ; 255 : 101-4.
 16. Mulner-Lorillon O, Cormier P, Labbé JC, et al. M-phase specific cdc2 protein kinase phosphorylates casein kinase II on its β subunit and increase casein kinase II activity. *Eur J Biochem* 1990 ; in press.
 17. Lamb NJC, Fernandez A, Watrin A, Labbé JC, Cavadore JC. Microinjection of p34^{cdc2} kinase induces marked changes in cell shape, cytoskeletal organization, and chromatin structure in mammalian fibroblasts. *Cell* 1990 ; 60 : 151-65.
 18. Satterwhite L, Cisek L, Corden J, Pollard T. A p34^{cdc2} containing kinase phosphorylates myosin regulatory light chain. *J Cell Biol* 1989 ; 60 : 151-65.
 19. Yamashiro S, Yamakita Y, Ishikawa R, Matsumura F. Mitosis-specific phosphorylation causes 83 K non muscle caldesmon to dissociate from microfilaments. *Nature* 1990 ; 344 : 675-8.
 20. Kipreos ET, Wang JYL. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science* 1989 ; 248 : 217-20.
 21. Shenoy S, Choi JK, Bagrodia S, Copeland TD, Maller JL, Shalloway D. Purified maturation promoting factor phosphorylates p60^{c-src} at sites phosphorylated during fibroblast mitosis. *Cell* 1989 ; 57 : 763-74.
 22. Morgan DO, Kaplan JM, Bishop JM, Varmus HE. Mitosis-specific phosphorylation of p60^{c-src} by p34^{cdc2} associated protein kinase. *Cell* 1989 ; 57 : 775-86.
- transcription et la maturation de l'ARN ribosomal, l'assemblage et le transport de particules préribosomales.
- Ces deux protéines sont phosphorylées *in vivo* et *in vitro* par p34^{cdc2}, sur des résidus sérine et thréonine pour la nucléoline et seulement sur des résidus thréonine pour No38, dans des motifs TPXKK (Thr-Pro-X-Lys-Lys). Ces résultats suggèrent que p34^{cdc2} est impliquée dans la réorganisation de la structure du noyau et peut entraîner un arrêt de la synthèse d'ARN messenger ainsi qu'un blocage de l'assemblage des particules ribosomales. Par ailleurs, il semble que p34^{cdc2} intervienne dans les processus de synthèse protéique. L'un des facteurs d'élongation, EF-1 γ , protéine de 42 kDa, est une cible de p34^{cdc2} tant *in vivo* qu'*in vitro* [14]. L'autre facteur d'élongation — EF-1 β — est, lui, un substrat de la caséine kinase II [15] qui est elle-même un substrat de p34^{cdc2}. En effet Mulner *et al.* [16] ont montré que la caséine kinase II est phosphorylée sur la sous-unité β par p34^{cdc2}, sur un résidu thréonine en dehors du site d'autophosphorylation de cette kinase.
- Cependant, si MPF semble nécessaire et suffisant pour conduire à la mitose dans les ovocytes (*figure 1, p. 897*), il en va tout autrement dans les cellules somatiques ; nous avons pu montrer [17] que la microinjection de la protéine kinase p34^{cdc2}, seule ou associée à la cycline B, dans des fibroblastes de rat en phase Go (*figure 2*) produit des changements morphologiques spectaculaires : perte d'adhérence au substratum, désassemblage des microtubules interphasiques, condensation de la chromatine, redistribution des microfilaments. L'ensemble de ces événements mime parfaitement ceux que l'on observe lorsque les cellules entrent normalement en prophase. Les effets obtenus lorsque l'on injecte la kinase en phase Go s'observent également lorsque l'injection est faite en phase G1 ; seule la phase S est réfractaire. La micro-injection de la kinase dans les cellules somatiques, si elle est suffisante pour provoquer les effets précoces de la prophase, est ainsi incapable de provoquer la désorganisation de l'enveloppe nucléaire et la formation d'un fuseau mitotique.

p34^{cdc2}

et anneau contractile

En fin de phase M, lorsque les cellules commencent à se séparer, on observe, au niveau de la séparation, la présence d'un anneau contractile dont le mécanisme de formation est inconnu. Cet anneau, composé principalement de filaments d'actine et de myosine, exerce une force de constriction par un mécanisme de glissement des filaments les uns sur les autres analogue à celui des muscles. Il est particulièrement intéressant de noter que le groupe de Pollard [18] a déterminé que les chaînes légères de la myosine LC20 isolées à partir de muscles lisses, et non celles isolées à partir de muscles squelettiques, sont des substrats de phosphorylation de p34^{cdc2}. Cette phosphorylation a lieu uniquement sur des résidus sérine dans l'actomyosine et sur des résidus sérine et thréonine dans les préparations de LC20 purifiées. La fonction de cette phosphorylation pourrait être, par analogie avec les muscles lisses, de permettre une interaction actine/myosine et d'engendrer ainsi une force de constriction au niveau de l'anneau contractile. Dans le même ordre d'idée, la caldesmone, protéine participant aux mécanismes de régulation de la contraction des muscles lisses et des systèmes contractiles non musculaires en inhibant l'activité ATPase de l'actomyosine, est aussi un substrat de phosphorylation de la kinase p34^{cdc2} [19]. Cette protéine qui se lie à la fois à l'actine et à la calmoduline est dissociée des microfilaments durant la mitose sous l'effet d'une phosphorylation, probablement due à la protéine kinase p34^{cdc2}, puisque cette kinase phosphoryle *in vitro* la caldesmone. En inhibant l'activité ATPase de l'actomyosine, la caldesmone pourrait ainsi potentiellement jouer un rôle dans les remaniements de structure du cytosquelette qui ont lieu au cours de la mitose.

p34^{cdc2}

et oncogènes

Le produit du protooncogène *c-abl* est une protéine tyrosine kinase qui est

exprimée dans tous les tissus et cellules jusqu'ici examinés. Cette protéine tyrosine kinase qui n'a pas de fonction récepteur est phosphorylée au cours du cycle sur 10 sites différents. Trois de ces sites le sont au cours de l'interphase et les 7 autres le sont pendant la mitose. Tous les sites phosphorylés pendant la transition interphase/métaphase le sont par l'intermédiaire de $p34^{cdc2}$ [20]. Le traitement de cellules interphasiques NIH 3T3 par l'acide okadaïque, un inhibiteur spécifique des phosphatases 1 et 2A, induit une phosphorylation de *c-Abl* sur les sites spécifiques de la mitose et confère aux cellules une morphologie similaire à celle des cellules mitotiques. La phosphorylation différentielle de *c-Abl* au cours du cycle est donc sous le contrôle simultané de $p34^{cdc2}$ et d'une ou plusieurs phosphatases. L'expression de *c-Abl* dans tous les tissus examinés suggère que cette tyrosine kinase pourrait jouer un rôle fondamental dans la physiologie cellulaire.

Le produit du gène *c-src*, $p60^{c-src}$, est une tyrosine kinase associée à la face cytoplasmique de la membrane ; sa fonction physiologique est encore mal définie. On sait toutefois que lorsque les cellules entrent en mitose, on observe une très forte phosphoryla-

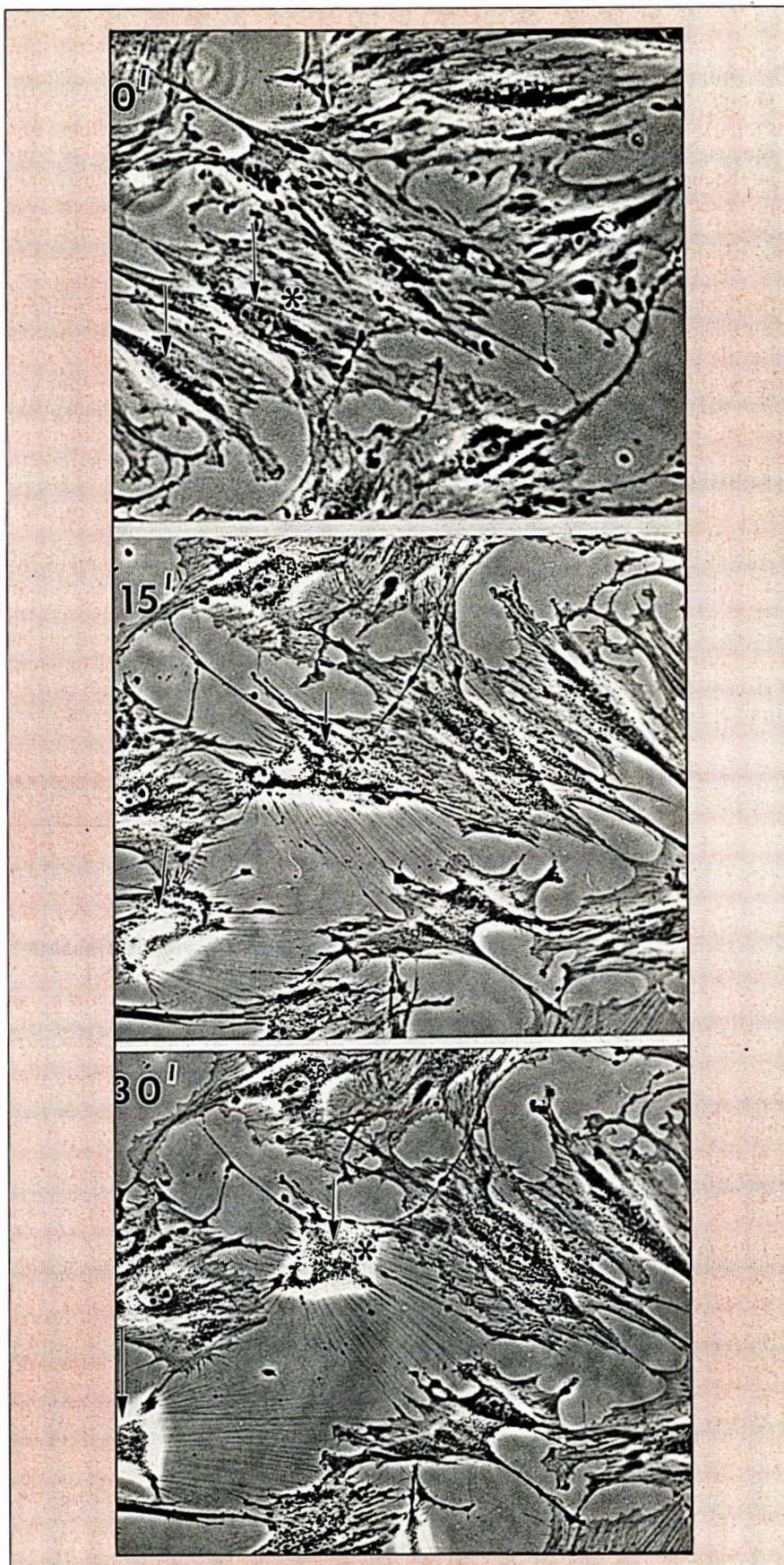


Figure 2. Changements morphologiques observés après micro-injection de la protéine kinase $p34^{cdc2}$ dans des fibroblastes de rat (REF-52) rendus synchrones par privation de sérum. Immédiatement après addition de sérum, les cellules sont micro-injectées par de la kinase purifiée à partir d'extrait d'étoile de mer en phase M. Les clichés montrent les microphotographies en contraste de phase 15 et 30 minutes après l'injection. Les cellules micro-injectées sont repérées par une flèche ; on constate qu'après 15 minutes les cellules s'arrondissent et deviennent plus réfringentes en perdant leur adhérence au substratum. Ces cellules miment le comportement d'une cellule non injectée en début de mitose. On peut noter que l'enveloppe nucléaire (étoile) des cellules injectées ne disparaît pas, contrairement au cas des ovocytes.

tion de p60^{c-src} qui entraîne une augmentation de son activité kinase. L'identité de la kinase phosphorylant p60^{c-src} était jusqu'à ces derniers temps inconnue. Cette kinase spécifique de la phase M a été identifiée par Shenoy *et al.* [21] en déterminant que les phosphorylations s'effectuaient à l'extrémité N-terminale sur les résidus thréonine 34,46 et sérine 72, dans un motif S/TPX basique (Ser/Thr-Pro-X-b) analogue au motif consensus des cibles de p34^{cdc2}. Les sites de phosphorylation déterminés *in vivo* sont identiques à ceux obtenus *in vitro* par phosphorylation de p60^{c-src} par un extrait purifié de MPF contenant la kinase p34^{cdc2} [22]. Ces résultats montrent que p60^{c-src} est une des cibles de p34^{cdc2} et suggèrent qu'une partie des phosphorylations et des changements structuraux qui ont lieu pendant la mitose pourraient être sous le contrôle de cette kinase.

Ces deux dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la connaissance, au niveau moléculaire,

de la nature du facteur MPF et de son activation cyclique. Une autre voie d'étude, celle de la mise en évidence du rôle de MPF sur les éléments structuraux de la cellule, commence à se développer et il est à prévoir que la liste des cibles de la kinase va encore s'allonger. Des points importants restent à élucider : — pourquoi la kinase p34^{cdc2} phosphoryle-t-elle tant de substrats ? — la kinase contrôle-t-elle indépendamment les changements structuraux ou agit-elle au niveau d'autres protéines kinases qui à leur tour participent à une cascade de phosphorylations conduisant à l'état mitotique ? Les phosphorylations de la caséine kinase II, de p60^{c-src} et de *c-Abl* par p34^{cdc2} sont des indications qui vont dans le sens d'une cascade.

La simplicité relative de la régulation de p34^{cdc2} fait ainsi progressivement place à la complexité des événements qui accompagnent la mitose et une grande partie des efforts de différents groupes est maintenant consacrée à l'étude de ces phénomènes ■

Summary

G₂ to M transition substrates of the M-phase specific kinase p34^{cdc2}

During mitosis, cells undergo extensive changes in structural organization and membrane transport between reticulum and plasma membrane is inhibited. The mitotic state is characterized by the activation of p34^{cdc2}, a M-phase specific protein kinase whose some *in vivo* targets have recently been identified such as microtubules, lamins, nuclear proteins, elongation factor EF-1 γ , product of oncogenes *c-abl*, *c-src*, *caldesmon*, myosin light chain during the transition interphase/metaphase.

TIRÉS A PART

J.-C. Cavadore.