

Sgs1 et Srs2: des hélicases au carrefour de la réplication et de la recombinaison ?

Les hélicases sont des enzymes ubiquitaires qui participent à tous les processus métaboliques impliquant l'ADN ou l'ARN. Leur rôle consiste à rompre les liaisons hydrogène qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN et, également, à défaire des structures secondaires qui peuvent s'établir le long d'une molécule d'ARN ou d'ADN simple brin. Elles sont donc essentielles au déroulement normal de la réplication, de la transcription et de la recombinaison, ce qui explique leur grande diversité et leur potentielle redondance dans la cellule. Au cours des dix dernières années, un nombre croissant de pathologies humaines rares liées au dysfonctionnement d'une hélicase a été identifié. Ces maladies sont en général liées à des mutations récessives portées par les autosomes. Par exemple, en présence de mutations dans les hélicases XPB et XPD, qui font partie du complexe TFIIH* responsable de l'engagement correct de la transcription par l'ARN polymérase II [1] et qui participent à la réparation de bases par excision – resynthèse, trois pathologies chevauchantes peuvent se manifester : le xeroderma pigmentosum (*m/s* 1998, n°11 p.1289), le syndrome de Cockayne (*m/s* 1997, n°3 p. 412) ou la trichothiodystrophie. Ces maladies sont caractérisées par une plus ou moins grande photosensibilité liée à un défaut de réparation de l'ADN par excision de nucléotides [2]. Des mutations dans les gènes *BLM* [3], *WRN* [4] et *RECQL4* [5], codant pour des hélicases apparentées, conduisent respectivement aux syndromes de Bloom (*m/s* 1996, n°3, p.403 ; 1998, n°12, p.1434), de Wer-

ner et de Rothmund-Thomson. Ces maladies sont caractérisées par une instabilité génétique et une susceptibilité accrue à l'apparition précoce de cancers, et, dans le cas des syndromes de Werner et de Rothmund-Thomson, à un vieillissement accéléré [6] (*m/s* 1998, n°11, p.1267).

Les gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN ont été le plus souvent conservés au cours de l'évolution des eucaryotes. De ce fait, les études sur les eucaryotes unicellulaires, telle la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*, ont souvent permis de comprendre la base de certaines pathologies humaines. Dans les travaux présentés ici, nous avons étudié la fonction de la protéine Sgs1 de *S. cerevisiae*, la seule hélicase de cet organisme présentant des similitudes de séquence avec les hélicases humaines Blm, Wrn et RECQL4. L'absence de Sgs1 confère aux levures certains phénotypes comparables à ceux des cellules humaines mutées dans les gènes *BLM*, *WRN* ou *RECQL4*, renforçant l'idée que Sgs1 est un homologue fonctionnel de ces hélicases humaines [7, 8]. Nos résultats montrent que Sgs1, en conjonction avec une autre hélicase Srs2, agit au cours de la réplication de l'ADN en prévenant la formation ou en permettant la maturation de structures de recombinaison anormales conduisant à la mort cellulaire. Une implication de Sgs1 dans la recombinaison induite par des radiolésions est également démontrée, renforçant l'idée que les phénotypes conférés par des mutations dans les orthologues humains sont reliés à la recombinaison.

Les levures mutées pour le gène *SGS1* présentent une instabilité génétique caractérisée notamment par

des fréquences élevées d'échanges entre chromatides sœurs (phénotype partagé avec les cellules « Bloom ») et par une ségrégation anormale des chromosomes homologues [9, 10]. Par ailleurs, les données montrant que l'expression de *SGS1* est maximale en phase S [11] et que la protéine se complexe avec des topoisomérases [9,12] impliquées notamment dans la décaténation de molécules d'ADN répliquées, plaident en faveur d'un rôle de la protéine Sgs1 dans la réplication de l'ADN. Une autre hélicase de levure, Srs2, qui ne possède pas d'orthologue connu dans les cellules de mammifères, est également impliquée dans le maintien de la stabilité du génome. Plusieurs observations suggèrent que le gène *SRS2* pourrait également être impliqué pendant la phase de réplication de l'ADN : les mutants *srs2* présentent des taux élevés de recombinaison spontanée [12]; tout comme *SGS1*, *SRS2* est fortement exprimé en phase S [14], et la protéine possède de fortes homologies de séquence avec Rep [15], une hélicase bactérienne elle-même impliquée dans la réplication. *In vitro*, il a été montré que les hélicases Sgs1 et Srs2 possèdent la même polarité 3' → 5' [16, 17], il était donc tentant de spéculer que les activités de ces protéines puissent au moins partiellement se substituer l'une à l'autre. Afin de tester une éventuelle redondance de fonction, des double-mutants *sgs1 srs2* ont été construits en croisant des simple-mutants de signe sexuel opposé. Les cellules diploïdes sont mises à sporuler, et les tétrades sont disséquées (figure 1A). Parmi les spores haploïdes, certaines portent les délétions de *SGS1* et de *SRS2*. Ces cellules double-mutantes présentent

* Voir Dernière heure p. 1145 de ce numéro.

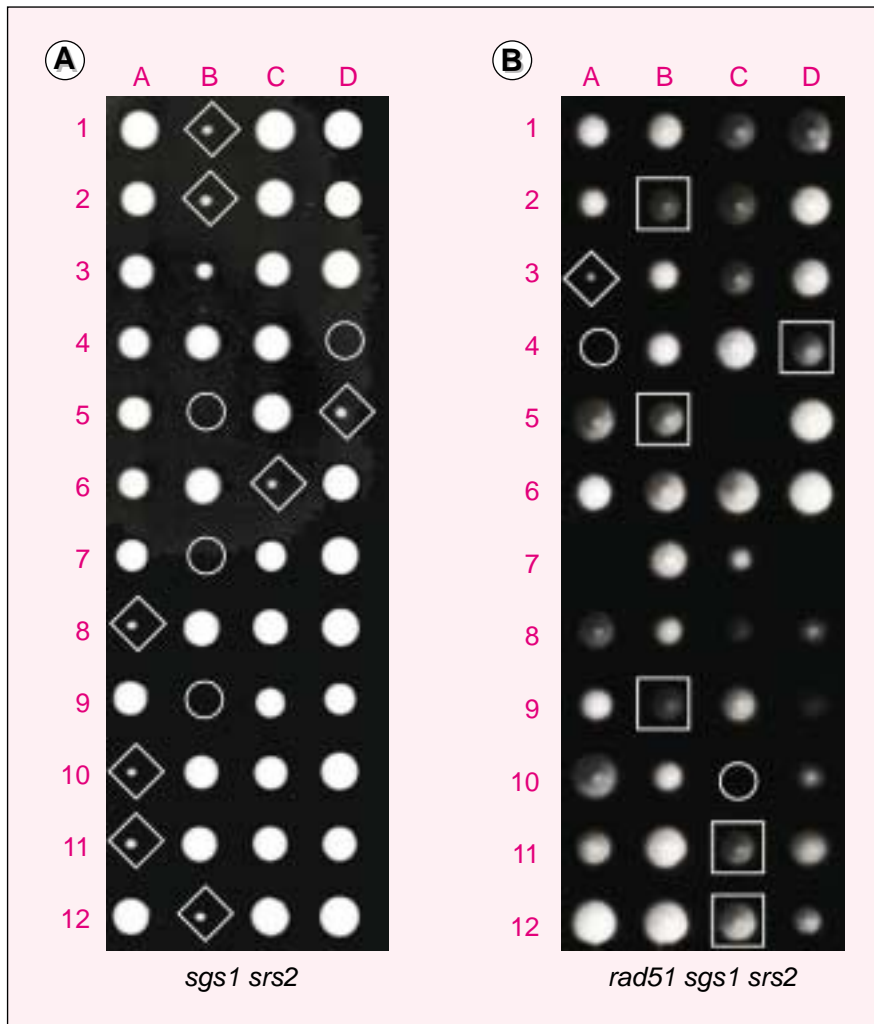


Figure 1. **Dissection de tétrades.** Sur chaque ligne, les 4 spores d'une tétrade ont été déposées. (A) Souche diploïde hétérozygote pour *sgs1* et *srs2*, ou (B) souche hétérozygote pour *sgs1*, *srs2* et *rad51*. Les cercles correspondent à l'emplacement de spores dont le génotype inféré est double-mutant. Les losanges entourent les spores double-mutantes viables, et les carrés les spores triple-mutantes. L'absence de RAD51 permet à toutes les spores mutées pour SGS1 et SRS2 de survivre et de se développer normalement.

une faible vitesse de croissance liée à une mort stochastique des cellules [6], un résultat en accord avec un rôle compensatoire de ces deux hélicases lors de la réplication. Se pose alors la question du rôle exact de ces hélicases. Plusieurs possibilités coexistent. Elles pourraient : (1) ouvrir l'hélice en amont de la fourche de réplication; (2) jouer un rôle dans la terminaison de la réplication en interaction éventuelle avec des topoisomérases; (3) empêcher la formation de structures secondaires

de l'ADN qui bloqueraient la réplication; (4) avoir un rôle dans la réinitialisation de la synthèse après un arrêt de la réplication; (5) être impliquées dans les événements de recombinaison formés au cours de la réplication.

Nous avons exploré génétiquement les relations pouvant exister entre la recombinaison homologue et les fonctions de Sgs1 et de Srs2. L'hypothèse d'une activité délétère des protéines de recombinaison chez le double mutant *sgs1 srs2* était en effet

suggérée par certaines propriétés des mutants *srs2* indiquant qu'une fonction du gène *SRS2* consisterait à empêcher la formation de structures de recombinaison qui, pour des raisons encore inconnues, conduisent à une létalité [18]. Si le même type de phénomène intervient lors de la réplication chez les double-mutants *sgs1 srs2*, l'élimination de la capacité des cellules d'initier la recombinaison homologue devrait permettre aux levures mutées pour *SRS2* et *SGS1* de se développer normalement. Cette expérience est possible chez la levure étant donné que la recombinaison homologue n'est pas essentielle à la croissance végétative. Nous avons observé que l'abolition du gène *RAD51* qui gouverne les étapes précoces de la recombinaison homologue et qui possède des orthologues humains, permet non seulement la survie de tous les triple mutants (figure 1B), mais restaure également des vitesses de croissance identiques à celles des cellules délétées uniquement pour *RAD51* (Tableau I). Des résultats identiques sont observés avec les gènes *RAD55* ou *RAD57* homologues à *RAD51*. Ceci montre que le rôle des hélicases Sgs1 et Srs2

Souches	Temps de doublement (minutes)	Efficacité d'étalement (%)
WT (témoin)	90	90
<i>sgs</i>	100	70
<i>srs2</i>	90	80
<i>rad51</i>	115	70
<i>sgs1 srs2</i>	185	35
<i>sgs srs2 rad51</i>	115	70

L'absence de RAD51 permet aux cellules dépourvues de SGS1 et de SRS2 de se développer aussi rapidement que les cellules mutées seulement pour RAD51. D'autre part, l'efficacité d'étalement (le nombre de cellules formant des colonies pour 100 cellules comptées) augmente jusqu'à la valeur mesurée chez le mutant *rad51*, ce qui suggère que la croissance ralentie des double-mutants *sgs1 srs2* résulte d'une mortalité liée à la recombinaison homologue.

est lié à la recombinaison et non pas directement à un rôle essentiel dans la transcription de l'ARN ribosomique ou dans la réplication de l'ADN, comme il avait été précédemment suggéré [19]. En effet, dans cette hypothèse, l'élimination de la recombinaison dans les cellules *sgs1 srs2* ne restaurerait pas une croissance normale.

Deux hypothèses non exclusives peuvent rendre compte de l'effet délétère de la recombinaison dans les double-mutants: (1) les produits des gènes *SGS1* et *SRS2* contribuent à la progression normale d'une fourche de réplication en empêchant l'accès aux protéines de recombinaison; (2) les protéines Sgs1 et Srs2 sont directement impliquées dans la maturation des intermédiaires de recombinaison qui se forment spontanément au cours de la réplication. Dans ce cas, la suppression du phénotype mutant

sgs1 srs2 par la délétion de gènes gouvernant les étapes précoces de la recombinaison suggère un rôle tardif de ces hélicases, à un stade faisant suite à l'envahissement des brins.

Dans cette dernière hypothèse, que nous avons étudiée pour l'hélicase Sgs1, le rôle de cette protéine ne serait pas restreint aux événements spontanés débutant en phase S, et les mutants devraient présenter une sensibilité particulière aux radiations ionisantes. Les rayons γ induisent dans l'ADN des cassures double-brin qui ne sont efficacement réparées chez la levure que par recombinaison homologue. Cette dernière s'effectue entre chromatides sœurs dans les cellules haploïdes et entre chromatides sœurs et chromosomes homologues dans les cellules diploïdes. En ce qui concerne les cellules haploïdes, l'effet des rayons γ est létal aussi bien pour les simples mutants *sgs1* que

pour les sauvages. Seule la sous-population de cellules en phase S/G2, qui peuvent réparer les cassures de l'ADN par recombinaison entre chromatides sœurs, est résistante, et la mutation *sgs1* n'affecte pas cette réparation. En revanche, les cellules diploïdes mutées sont très sensibles à ces radiations, ce qui pourrait bien refléter une diminution de l'efficacité de recombinaison entre chromosomes homologues (figure 2A). Ce défaut est confirmé par la forte diminution de recombinaison intragénique provoquée par les rayons γ (figure 2B). Ainsi, après une irradiation, Sgs1 participe d'une manière directe ou indirecte à la formation de molécules recombinantes, mais seulement lorsque les chromosomes homologues sont impliqués. Ce résultat n'est pas en contradiction avec le fait que l'absence de Sgs1 augmente les taux spontanés de recombinaison probablement déclenchés au cours de la phase S, alors qu'après irradiation, les événements sont déclenchés dans toutes les phases du cycle cellulaire. Cela illustre la complexité du rôle de Sgs1 dont l'absence peut, selon les cas, augmenter ou réduire les taux de recombinaison.

L'ensemble de ces résultats permet de penser que les effets des mutations dans les gènes humains orthologues de *SGS1* sont reliés à la recombinaison. Il est possible qu'au cours de l'évolution, *SGS1* ait été dupliqué et que les différents gènes de cette famille aient acquis des spécificités de fonction, par exemple: recombinaison spontanée ou induite par des lésions, rôle spécifique sur des domaines chromosomiques comme les régions télomériques, recombinaison spécialisée et programmée au cours du développement, recombinaison dans différents organes. Ces spécificités pourraient refléter les différences de pathologies associées aux mutations dans Blm, Wrn ou RecQL4.

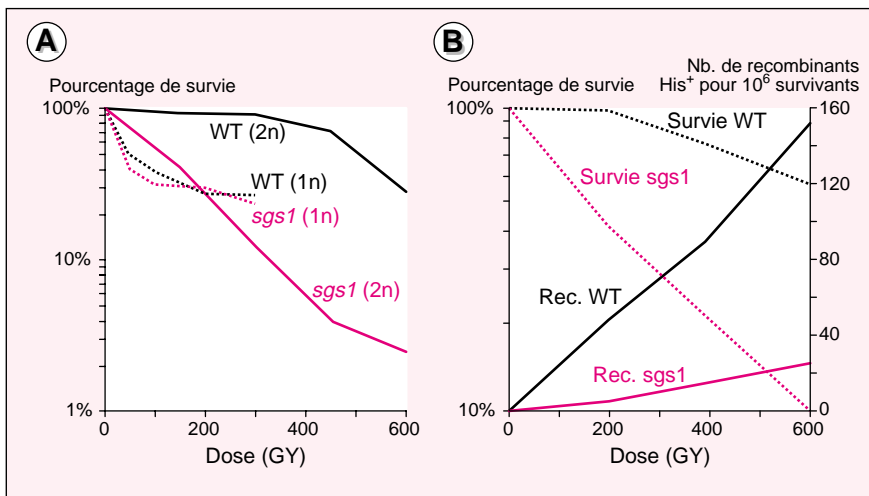


Figure 2. **Effet des radiations γ sur la survie et la recombinaison intragénique.**

A. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont irradiées au ^{137}Cs . Les survies sont déterminées par rapport aux cellules non traitées. Dans les souches haploïdes, les cellules en phase G1 meurent à cause de l'absence d'une molécule homologue à partir de laquelle une cassure double brin peut-être réparée. Les cellules en phase S/G2 sont résistantes, puisque la présence de la chromatide sœur permet la réparation des cassures par recombinaison. L'absence de Sgs1 n'affecte pas ce processus. Les cellules diploïdes sauvages sont, quant à elles, résistantes même en G1, car le chromosome homologue est présent à tout moment. En revanche, en l'absence de Sgs1, les cellules deviennent hypersensibles à l'irradiation. Ceci suggère un rôle de Sgs1 dans les événements de recombinaison qui impliquent des chromosomes homologues.

B. La recombinaison intragénique (qui implique deux allèles d'un même gène portant chacun une mutation différente) et la survie sont mesurées dans des souches diploïdes suite à une irradiation similaire à celle décrite en (A). En l'absence de Sgs1, la recombinaison induite est fortement diminuée.

1. Coin F, Egly JM. Formation du complexe d'initiation de la transcription : des facteurs généraux aux complexes qui déstabilisent la chromatine. *Med Sci* 2000 ; 16 : 593-601

2. Chu G, Mayne L. Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the diseases? *Trends Genet* 1996 ; 12 : 187-92.

3. Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon

DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. *Cell* 1995; 83 : 655-66.

4. Yu CE, Oshima J, Fu YH, *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272 : 258-62.

5. Kitao S, Shimamoto A, Goto M, *et al.* Mutations in *RECQL4* cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 1999; 22 : 82-4.

6. Gangloff S, Soustelle C, Fabre F. Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet* 2000; 25 : 192-4.

7. Rothstein R, Gangloff S. Hyper-recombination and Bloom's syndrome : microbes again provide clues about cancer. *Genome Res* 1995; 5 : 421-6.

8. Yamagata K, Kato J, Shimamoto A, Goto M, Furuichi Y, Ikeda H. Bloom's and Werner's syndrome genes suppress hyperrecombination in yeast *sgs1* mutant: implication for genomic instability in human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 : 8733-8.

9. Gangloff S, McDonald JP, Bendixen C, Arthur L, Rothstein R, Gangloff, S. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 1994; 14 : 8391-8.

10. Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Louis EJ. SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's

syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1996; 144 : 935-45.

11. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 1998; 9 : 3273-97.

12. Watt PM, Louis EJ, Borts RH, Hickson ID. Sgs1: a eukaryotic homolog of *E. coli* RecQ that interacts with topoisomerase II *in vivo* and is required for faithful chromosome segregation. *Cell* 1995; 81 : 253-60.

13. Rong L, Palladino F, Aguilera A, Klein HL. The hyper-gene conversion *hpr5-1* mutation of *Saccharomyces cerevisiae* is an allele of the *SRS2/RADH* gene. *Genetics* 1991; 127 : 75-85.

14. Heude M, Chanet R, Fabre F. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase during the mitotic cell cycle, meiosis and after irradiation. *Mol Gen Genet* 1995; 248 : 59-68.

15. Aboussekhra A, Chanet R, Zgaga Z, Cassier-Chauvat C, Heude M, Fabre F. *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics

of *radH* mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17 : 7211-9.

16. Lu J, Mullen JR, Brill SJ, Kleff S, Romeo AM, Sternglanz R. Human homologues of yeast helicase. *Nature* 1996; 383 : 678-9.

17. Rong L, Klein HL. Purification and characterization of the SRS2 DNA helicase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268 : 1252-9.

18. Chanet R, Heude M, Adjiri A, Maloisel L, Fabre F. Semidominant mutations in the yeast Rad51 protein and their relationships with the Srs2 helicase. *Mol Cell Biol* 1996; 16 : 4782-9.

19. Lee SK, Johnson RE, Yu SL, Prakash L, Prakash S. Requirement of yeast *SGS1* and *SRS2* genes for replication and transcription. *Science* 1999; 286 : 2339-42.

Serge Gangloff
Christine Soustelle
Francis Fabre

CEA de Fontenay-aux-Roses, UMR 217
CNRS, CEA/DSV/DRR/LEA, BP 6,
92265 Fontenay-aux-Roses, France.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Les sauts, qualitatifs, du tissu élastique.** La clinique du pseudoxanthome élastique (PXE) est multiforme. Les papules qui apparaissent dans les régions cervicales, axillaires et inguinales sont pathognomoniques, mais les atteintes ophtalmologiques (stries angioïdes) et artérielles (calcifications, obstructions) sont des éléments essentiels dans l'évolution de la maladie, en raison des hémorragies rétinienne et des complications cardiovasculaires (hypertension, lésions endocardiques) qu'elles entraînent. Souvent sporadique, le PXE peut être transmis en récessivité ou en dominance. Des analyses de ségrégation familiale ont permis de situer le locus en 16p13.1, puis la région candidate fut réduite à un segment d'ADN de 820 kb. C'est dans ce segment (où se trouvaient au moins six gènes) que tout récemment, et de façon indépendante, trois équipes ont identifié le gène en cause [1-3]. Des mutations très variées (faux-sens, non-sens, sur site d'épissage, insertions, délétions) ont été observées aussi bien dans des cas sporadiques que dans des familles avec transmission dominante ou réces-

sive. Ce gène code pour un transporteur à *ATP binding cassette* (ABC). Cette superfamille ABC est bien connue des lecteurs de *médecine/sciences* [4]. Il s'agit de gènes codant pour des protéines de membrane dont la surexpression peut conférer à certaines cellules tumorales une résistance croisée à des médicaments (d'où le nom de *multidrug resistance-associated protein* ou MRP, et de *multidrug resistance* ou MDR, donné à certaines d'entre elles). Sur le chromosome 16, à 9 kb de distance, se trouvent les gènes *MRP* et *ARA* (pour: associé à la résistance à l'anthracycline), transcrits dans des directions opposées. C'est ce gène *ARA* ou *MRP6* ou encore (de préférence) *ABCC6*, de la sous-famille C qui comporte aussi le gène *CFTR*, qui est impliqué dans le PXE. La protéine déduite contient 17 domaines transmembranaires, une terminaison NH₂ extracellulaire et une terminaison COOH intracellulaire, avec deux sites de liaison à l'ATP. L'expression d'*ABCC6* est détectée dans la rétine, la peau, et les parois vasculaires, mais elle est surtout très forte dans le foie et le rein (où la pro-

téine *ABCC6* pourrait être synthétisée). L'implication d'*ABCC6* dans le pseudoxanthome élastique soulève bien des questions. Pourquoi une même mutation peut-elle être associée aux différentes formes de PXE: sporadiques, dominantes ou récessives? *ABCC6* agit-elle par détoxification? Dans certains cas d'insuffisance rénale chronique, des changements cutanés et parfois oculaires et artériels de type PXE apparaissent chez des malades. Une atteinte de la protéine *ABCC6* pourrait modifier le transport de molécules essentielles pour l'assemblage ou la réparation du tissu élastique. Après les progrès obtenus dans la compréhension des maladies d'Elhers-Danlos, voici un pas de plus dans la connaissance des pathologies du tissu élastique.

[1. Ringfeil F, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 : 6001-6.]

[2. Bergen AAB, *et al.* *Nat Genet* 2000; 25 : 228-31.]

[3. Le Saux O, *et al.* *Nat Genet* 2000; 25 : 223-7.]

[4. Mourez M, *et al.* *Med Sci* 2000; 16 : 386-94.]