

Le tête à queue des poly A binding proteins

AAAAAAAAAAAAA... cette séquence nucléotidique ne suscite pas l'exaltation pour la recherche de motifs consensus ! Localisée parfois au sein d'un ARNm et le plus souvent à son extrémité 3' sous forme d'une queue poly(A), elle présente un attrait irrésistible pour les *poly A binding protein* ou PABP. Ces protéines, dont on avait d'abord pensé qu'elles protégeaient passivement la queue poly(A), jouent en fait un rôle important dans la dégradation et dans la traduction des ARNm. La première PABP a été identifiée à partir de lysats de réticulocytes de lapin, puis très rapidement, une trentaine de protéines analogues ont été mises en évidence chez la levure, chez différents micro-organismes, ainsi que chez de nombreuses espèces animales et végétales*. Yohn *et al.* ont même isolé une PABP (RB47) à partir de chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii* [1], un organite dont le métabolisme des ARNm est généralement assimilé à celui des cellules procaryotes, ce qui suggère que les PABP pourraient aussi jouer un rôle important dans des cellules n'ayant pas d'ARN polyadénylés.

Chez la majorité des espèces, il existe plusieurs isoformes de PABP. Ainsi, la levure exprime, à partir du même gène, une isoforme nucléaire et une isoforme cytoplasmique [2]. Chez l'homme, on trouve la PABP1 qui est ubiquitaire (70,67 kDa), une PABP spécifique du testicule (PABP3 – 70,12 kDa) et une PABP inducible (iPABP – 70,78 kDa) exprimée au cours de l'activation des lymphocytes T et des plaquettes. De plus, il existe au moins quatre pseudogènes humains des PABP. Ces gènes et pseudogènes ont été cartographiés [3] : les trois gènes fonctionnels sont situés en 8q22 (*PABP1*), 13q11-q12 (*PABP3*), 1p32-p36 (*iPABP*). Enfin une PABP nucléaire de nature différente, plus petite (32,75 kDa) et dont la séquence amino-terminale est différente de celle des autres PABP, intervient dans la régulation de la longueur de la séquence poly(A) durant le processus de polyadénylation (*3'-end processing*). L'altération de cette protéine est impliquée dans la dystrophie musculaire oculopharyngiale ([4], *m/s* 1995, n° 6/7, p. 925).

Structure des PABP

Deux éléments de la structure des PABP [5], situés respectivement dans les régions NH₂ et COOH-terminales ont été remarquablement conservés au cours de l'évolution (*figure 1*). Dans la région NH₂-terminale, quatre domaines consensus de liaison à l'ARNm, les *RNA-binding domains* (RBD) aussi appelés *RNA-recognition motifs* (RRM), sont des séquences répétées en tandem. Chaque RBD comprend 90 à 100 acides aminés et contient deux séquences extrêmement conservées, distantes de 25 à 35 résidus, appelées RNP (*ribonucleoprotein consensus sequences*): RNP1 est octamérique [(Lys/Arg)-Gly-(Phe/Tyr)-(Gly/Ala)-Phe-Val-X-(Phe/Tyr)], et RNP2 hexamérique [(Leu/Ile)-(Phe/Tyr)-(Val/Ile)-(Gly/Lys)-(Asn/Gly)-(Leu/Met)]. Si chaque motif RBD de liaison de l'ARNm est très conservé entre différentes espèces, l'homologie entre ces différents domaines au sein d'une même PABP est plus faible, ce qui suggère que chacun de ces motifs a une spécificité fonctionnelle [5]. Des

* Numéros d'accès des séquences de PABP: *Homo sapiens* PABP1 (Y00345); *Homo sapiens* iPABP (U33818); *Homo sapiens* PABP3 (U64662); PABP11 (L05109); *Saccharomyces cerevisiae* Pab1p cytoplasmique et nucléaire (M13371); *Schizosaccharomyces pombe* (M64603); *Emmericella nidulans* (U70731); *Chlamydomonas reinhardtii* (AF043297); *Anemia phyllitidis* (Z26042); *Triticum aestivum* (U81318); *Arabidopsis thaliana* (Pab1p (Y13176); Pab3p (Y12227); Pab5p (M97657)); *Leishmania major* (AF093062); *Trypanosoma brucei* (AF042190); *Trypanosoma cruzi* (U06070); *Mesembryanthemum crystallinum* (AF003126).

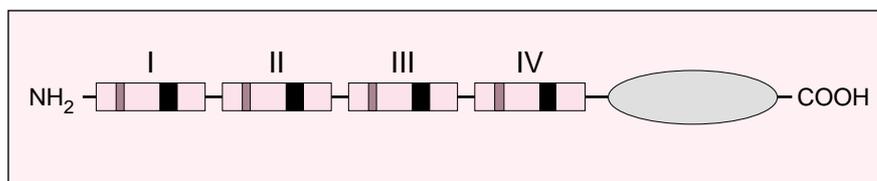


Figure 1. **Structure des poly A binding protein (PABP).** La région N-terminale contient quatre domaines de liaison à l'ARN appelés RRM (RNA-recognition motifs) ou RBD (RNA-binding domain) identifiés par un chiffre romain. Dans chaque domaine, la zone bistrée représente la séquence consensus RNP2 (ribonucleoprotein consensus sequence) et la zone colorée en noir la séquence consensus RNP1. La région riche en proline située dans la région C-terminale est représentée par un ovale.

expériences de digestion par la nucléase ont révélé qu'une molécule de PABP recouvre environ 25 résidus A [6]. L'activité de liaison à l'ARN d'une PABP tronquée, contenant uniquement les domaines RBDI et RBDII, est semblable à celle de la protéine entière (un RBD pour 12 A). La combinaison de ces deux premiers domaines crée une surface continue de reconnaissance de l'ARN, permettant une liaison spécifique et de forte affinité aux ARNm poly(A)⁺ [7]. Les deux autres domaines, RBDIII et RBDIV, peuvent également contribuer à l'affinité et à la spécificité de la liaison de la PABP *in vivo* [8]. La région COOH-terminale des PABP est riche en proline, elle intervient dans la multimérisation des PABP le long des ARNm poly(A)⁺ [8] ainsi que dans le recrutement d'autres protéines modulant le métabolisme des ARNm.

Régulation de l'expression des PABP

La régulation de l'expression des PABP fait intervenir plusieurs mécanismes. Tout d'abord, la distribution intracellulaire de leur ARNm varie selon les conditions de prolifération des cellules, entre les fractions polysomiques (traduction active), et subpolysomique (traduction réprimée). De plus, Hornstein *et al.* ont récemment identifié dans la région 5' non traduite (UTR) de la PABP1 humaine un motif oligopyrimidine 5' TOP (5' *terminal oligopyrimidine tract*) [9] qui favorise la traduction de la protéine lors de la croissance cellulaire. Les ARNm possédant un tel motif codent généralement pour des éléments de la machinerie traductionnelle comme les protéines ribosomiques (rps) ou les facteurs d'élongation (EF1 α et EF2). En 1992, Berger *et al.* évoquent la capacité de la PABP1 de réprimer la traduction de son propre messenger. Une telle régulation, démontrée *in vitro* à partir de lysats de réticulocytes de lapin, a été confirmée sur des cultures de cellules HeLa. En fait, la PABP1 se fixe sur une séquence riche en A de la région 5'UTR de son ARNm (nt 73-133 PABP1), appelée *adenine-rich sequence* ou *autoregulatory sequence* (ARS) [10]. La présence de cette

séquence, très conservée au cours de l'évolution, suggère que l'autorégulation de la traduction de l'ARNm des PABP est largement répandue chez les eucaryotes. Seule la PABP2 de testicule de souris, ne possédant pas de séquence ARS, échapperait à ce type de régulation. D'autres mécanismes d'autorégulation existent, mais sont moins bien caractérisés : ainsi la sur-expression de PABP exogène dans des cellules embryonnaires de rein humain, diminue l'abondance de son ARNm sans altérer l'efficacité de sa traduction [10].

La traduction de certains ARNm des PABP peut donc être contrôlée en *cis* par le motif 5' TOP (croissance cellulaire) et par la région ARS (autorégulation). Ce double contrôle permet l'adaptation du taux des PABP aux besoins de la cellule, évitant ainsi tout excès de protéines libres. La disponibilité de ces protéines dépend également de leur localisation dans la cellule. En effet, la PABP1 peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme [11]. Son entrée dans le noyau n'est pas associée à la présence d'une séquence consensus de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localization signal*), mais requiert la combinaison des deux motifs RBDI et RBDII comme signal minimal de localisation nucléaire. Ce transfert est inhibé à basse température ou par une déplétion en ATP. La PABP1 serait exportée du noyau au sein de complexes ARN-protéines appelés mRNP (*messenger ribonucleoprotein particles*).

Fonctions des PABP

Les premières expériences visant à déterminer le rôle physiologique des PABP ont été réalisées chez la levure. Ainsi, la délétion du gène *Pabp1* est létale pour la levure. Néanmoins, celle-ci peut être corrigée par un RBD unique [6]. Il a été établi depuis que les PABP interviennent dans : (1) la stabilisation des ARNm [12]; (2) la régulation de la dégradation des ARNm [13, 14]; et (3) le déclenchement de la traduction [15, 16].

La démonstration du rôle des PABP sur la stabilisation des ARNm polyadénylés repose sur l'étude de la dégradation des ARNm *in vitro*. Bern-

stein a ainsi montré que les ARNm polyadénylés sont dégradés 3 à 10 fois plus rapidement dans des extraits cellulaires humains déplétés en PABP que dans des extraits témoins [12], leur stabilité étant restaurée en ajoutant de la PABP. L'hypothèse serait que les PABP protègent les ARNm polyadénylés de leur dégradation par une 3'exonucléase.

En ce qui concerne la régulation de la dégradation des ARNm, les PABP ont la capacité d'activer leur désadénylation (*poly(A) shortening*), qui est l'étape préliminaire à leur dégradation. Cet effet est assez bien caractérisé chez les levures déficientes en PABP qui, dans certaines conditions expérimentales, sont viables mais ne peuvent désadényler leurs ARNm [13]. Sachs et Deardorff ont ainsi purifié une désadénylase de levure (*PAN-poly(A) ribonucléase*), sur sa capacité à ne dégrader une séquence poly(A) qu'en présence de PABP [17]. Quand la séquence poly(A) est réduite à une longueur de 12 à 25 nucléotides, la structure 5' m⁷G est éliminée (*decapping*), et le transcrit est alors exposé aux exonucléases 5'-3' permettant une dégradation complète.

Chez les eucaryotes supérieurs, la situation est plus complexe. La surexpression de la PABP1 dans les ovocytes de xénope protège les ARNm, ce qui suggère qu'une des fonctions de la PABP est d'inhiber la désadénylation [14]. Cela permet de contrôler la synthèse des protéines, mais cet effet n'a été démontré que dans les ovocytes et il n'est pas évident que les PABP inhibent aussi la désadénylation dans les cellules somatiques. En 1997, Körner et Whale ont purifié une 3' exoribonucléase de thymus de veau spécifique des séquences poly(A), la DAN (*deadenylating nuclease*) [18] qui présente certaines similitudes avec la PAN de levure. Cependant, quand elle est associée à la PABP, la DAN peut être soit stimulée soit inhibée selon les conditions expérimentales. Par ailleurs, il a été récemment montré que les PABP peuvent également faire partie du complexe AUF1 qui se fixe sur des éléments riches en AU (ARE) présents dans certains ARNm et favorise ainsi leur dégradation [19].

A l'inverse, Wang *et al.* ont montré que, dans la région 3'UTR de l'ARNm de la globine alpha, les protéines α CP1 et α CP2 (*polycitidylate-binding protein*) peuvent interagir avec la partie carboxy-terminale de la PABP pour former un complexe stabilisateur qui inhibe la désadénylation [20]. Ainsi, l'implication des PABP dans le processus de désadénylation des ARNm demeure encore très controversé. Si ce rôle chez la levure a été établi au moins *in vitro*, il doit encore être clarifié chez les vertébrés.

La troisième fonction des PABP est de favoriser l'amorçage de la traduction dépendante ou indépendante de la coiffe en interagissant avec les facteurs d'initiation de la synthèse protéique. Dans le cas de l'amorçage de la traduction dépendante de la coiffe, la liaison de la sous-unité ribosomique 40S à la coiffe (extrémité 5' m⁷G-CAP) de l'ARNm se fait par l'intermédiaire du complexe eIF3 qui s'associe à eIF-4F (figure 2). Chez les eucaryotes, eIF-4F est composé de eIF-4G, protéine adaptatrice sur laquelle se fixent eIF-4E (la protéine de liaison à la coiffe) et eIF-4A (l'ATPase dépendante de l'ARN). La

protéine eIF-4A, stimulée par eIF-4B, permettrait la suppression des structures secondaires de la région 5'UTR. La PABP liée à la queue poly(A) peut interagir avec ce complexe de différentes façons.

Chez des levures dont la Pab1p n'est pas fonctionnelle (par mutation ou par immunodéplétion), on observe un déficit de la traduction due à l'absence de liaison de la sous-unité 40S à l'ARNm [21]. En fait, la Pab1p de levure interagit avec eIF-4G [22], ce qui permet le recrutement de la sous-unité 40S *in vitro*. Cette interaction eIF-4G avec la PABP se fait par l'intermédiaire du motif RBDII. La liaison simultanée de eIF-4G à eIF-4E et Pab1p provoque la circularisation de l'ARNm (figure 2) [23]. Chez la levure, ce mécanisme favorise la traduction dépendante de la coiffe et de la séquence poly(A). Récemment, Otero *et al.* [24] ont montré que cette circularisation n'est en fait pas indispensable: en effet la PABP, non liée à la queue poly(A), peut interagir par l'intermédiaire d'une autre région de son RBDII avec un élément encore non identifié de la machinerie cellulaire. Cette interaction stimule aussi la traduction de

façon dépendante de la coiffe mais indépendante de la séquence poly(A).

L'interaction entre PABP et eIF-4G a également été mise en évidence chez les plantes [25] et surtout chez les mammifères. Chez l'homme, l'interaction de la partie amino-terminale de eIF-4G I et eIF-4G II avec la PABP prend une importance toute particulière lors des infections virales par les rotavirus ou les poliovirus. En effet, les ARNm du rotavirus contiennent un site de liaison spécifique pour la protéine virale NSP3 (*non-structural-protein 3*). Celle-ci entre en compétition avec la PABP pour se lier à eIF-4G, ce qui provoque une chute de l'efficacité de la traduction des protéines de l'hôte, et une forte stimulation de celle des protéines virales [26]. Quant aux poliovirus, ils produisent une protéase qui clive le facteur eIF-4G, ce qui inhibe la traduction, ainsi que la PABP, entraînant un arrêt rapide de la traduction dépendante de la coiffe des protéines de l'hôte (figure 2) [27].

La PABP peut également participer à la régulation de la traduction indépendante de la coiffe. Ainsi la PABP1 humaine peut se lier à la *PABP-interacting protein* (PAIP-1) (figure 3) [16], qui présente des homologies de séquence avec la région centrale de eIF-4G. PAIP-1 interagit directement avec eIF-4A, mais ne possède pas de site de liaison pour eIF-4E. Le complexe formé par PABP, PAIP-1 et eIF-4A jouerait ainsi le rôle de coactivateur traductionnel et pourrait favoriser le redémarrage de la traduction par une voie indépendante de la coiffe, même pour des ARNm possédant une coiffe.

Conclusions

Les PABP avaient été initialement décrites comme de simples constituants des ribonucléoprotéines se fixant à l'extrémité poly(A) des ARNm pour les stabiliser. Il est maintenant clair qu'elles ne jouent pas uniquement ce rôle passif. Elles ont un rôle actif de contrôle sur les ARNm, elles participent à leur dégradation et, en se fixant sur la queue poly A, elles témoignent de l'intégrité du message. D'une manière

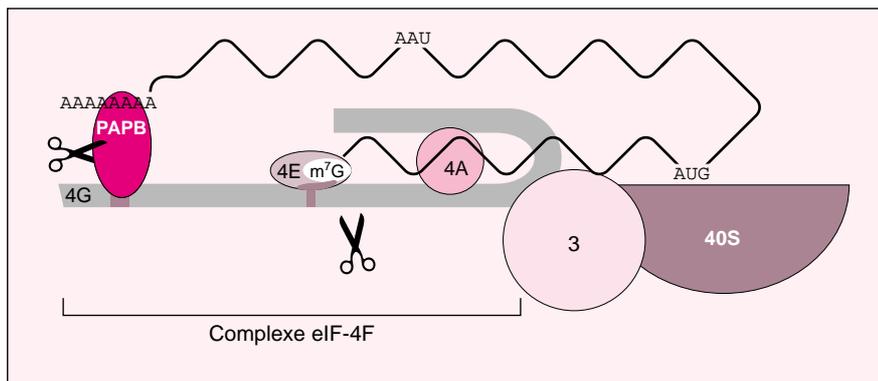


Figure 2. **Interaction de la PABP avec les facteurs de déclenchement de la traduction.** L'ARNm lie différentes protéines du complexe responsable du démarrage de la traduction. Le complexe eIF-4F comprend trois protéines: eIF-4E (4E) qui reconnaît la coiffe (m⁷G) et interagit avec la partie centrale du facteur eIF-4G (4G); l'hélicase eIF-4A (4A) qui possède deux sites de liaison avec la région C-terminale de eIF-4G. Le complexe multiprotéique eIF3 (3) sert de lien entre eIF-4G et la sous-unité ribosomique 40S. La PABP reconnaît la queue poly (A) de l'ARNm et possède également un site de liaison avec la région N-terminale de eIF-4G. L'interaction des complexes polyA/PABP et coiffe/ eIF-4E, par l'intermédiaire de eIF-4G, permet une circularisation de l'ARNm et favorise le déclenchement de la traduction. Les ciseaux représentent des protéases virales qui ont la capacité de cliver eIF-4G (poliovirus, rhinovirus...) ou la PABP (poliovirus).

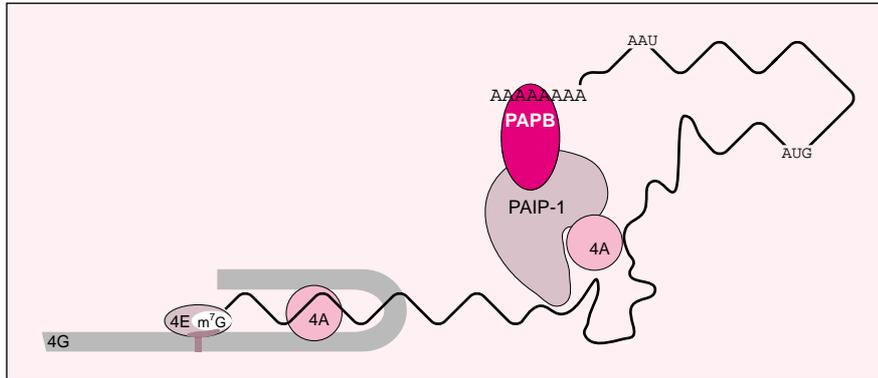


Figure 3. **Activation de la traduction par PABP indépendante de la coiffe.** La PABP liée à la queue poly(A) peut interagir avec le facteur eIF-4A par l'intermédiaire de la protéine PAIP-1 (PABP interacting protein) et activer ainsi la traduction indépendante de la coiffe.

générale, la PABP associée à la queue poly(A), en favorisant la circularisation de l'ARNm, facilite la traduction d'un messager de bonne qualité (CAP⁺/poly(A)⁺), indispensable pour le fonctionnement de la cellule ■

Chloé Féral

Inserm U. 99, Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny, 94010 Créteil, France.

RÉFÉRENCES

1. Yohn CB, Cohen A, Danon A, Mayfield SP. A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2238-43.
2. Sachs AB, Bond MW, Kornberg RD. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* 1986; 45: 827-35.
3. Féral C, Mattei MG, Pawlak A, Guellaen G. Chromosomal localization of three human poly(A)-binding protein genes and four related pseudogenes. *Hum Genet* 1999; 105: 347-53.
4. Brais B, Bouchard JP, Xie YG, et al. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy [published erratum appears in *Nat Genet* 1998; 19: 404]. *Nat Genet* 1998; 18: 164-7.
5. Gorchach M, Burd CG, Dreyfuss G. The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* 1994; 211: 400-7.
6. Sachs AB, Davis RW, Kornberg RD. A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 3268-76.

7. Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 1999; 98: 835-45.
8. Kuhn U, Pieler T. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J Mol Biol* 1996; 256: 20-30.
9. Hornstein E, Git A, Braunstein I, Avni D, Meyuhas O. The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. *J Biol Chem* 1999; 274: 1708-14.
10. Hornstein E, Harel H, Levy G, Meyuhas O. Overexpression of poly(A)-binding protein down-regulates the translation or the abundance of its own mRNA. *FEBS Lett* 1999; 457: 209-13.
11. Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 1998; 273: 13015-21.
12. Bernstein P, Ross J. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci* 1989; 14: 373-7.
13. Sachs AB, Davis RW. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* 1989; 58: 857-67.
14. Wormington M, Searfoss AM, Hurney CA. Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in Xenopus oocytes. *EMBO J* 1996; 15: 900-9.
15. Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 1997; 89: 831-8.

16. Craig AW, Haghghat A, Yu AT, Sonenberg N. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 1998; 392: 520-3.

17. Sachs AB, Deardorff JA. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 1992; 70: 961-73.

18. Korner CG, Wahle E. Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem* 1997; 272: 10448-56.

19. Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1999; 284: 499-502.

20. Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4552-60.

21. Tarun SZ, Jr., Sachs AB. A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* 1995; 9: 2997-3007.

22. Tarun SZ, Jr., Sachs AB. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF4G. *EMBO J* 1996; 15: 7168-77.

23. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 1998; 2: 135-40.

24. Otero LJ, Ashe MP, Sachs AB. The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates *in vitro* poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *EMBO J* 1999; 18: 3153-63.

25. Bi X, Goss DJ. Wheat Germ Poly(A) Binding Protein Increases the ATPase Activity and the RNA helicase activity of the translation initiation factor complex formed by eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* 2000; 275: 17740-6.

26. Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 1998; 17: 5811-21.

27. Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU, Rhoads RE. Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease *in vitro* and *in vivo*: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* 1999; 73: 709-17.

Remerciements

Je remercie A. Pawlak, G. Guellaën, et Y. Laperche pour leur lecture critique de ce manuscrit. Ce travail a reçu le soutien du ministère de l'Éducation nationale, de la Recherche et de la Technologie.

TIRÉS À PART

C. Féral.