

Un nouveau type de protéine phosphatase au cœur de la machinerie de transcription

L'action antagoniste de kinases et de phosphatases intervient dans la régulation de différents processus cellulaires. Ainsi, l'activité de nombreuses protéines de la machinerie de transcription de classe II est modulée par phosphorylation. C'est en particulier le cas de l'ARN polymérase II : le domaine carboxy-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité de cette enzyme présente une caractéristique remarquable : il est formé de nombreuses répétitions d'un heptapeptide de séquence consensus Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇ [1]. Cette particularité est conservée chez l'ensemble des eucaryotes ; seul le nombre de répétitions varie – on en compte 52 chez l'humain. Ce domaine est hautement phosphorylable et deux formes d'ARN polymérase II coexistent *in vivo* : une forme hypophosphorylée (IIA) et une forme hyperphosphorylée (IIO) au niveau du CTD. Seule la forme IIA peut être recrutée sur le promoteur au sein du complexe de démarrage de la transcription formé par les facteurs généraux de transcription autour de la boîte TATA. Lors du début de la transcription, puis de la phase d'élongation de la transcription, le CTD est phosphorylé par différentes CTD-kinases telles que CDK7 et CDK9, appartenant respectivement aux facteurs généraux TFIIF et P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*). Une fois les premiers nucléotides transcrits, seule la forme hyperphosphorylée IIO assure la poursuite de la transcription. En outre, le CTD phosphorylé recrute et stimule les complexes enzymatiques responsables de la maturation des ARN messagers. Une CTD-phosphatase est ensuite nécessaire pour régénérer la forme IIA de l'ARN polymé-

rase qui pourra alors être recrutée sur un promoteur dans un nouveau cycle de transcription. Alors que les différentes CTD-kinases font l'objet de nombreuses études, peu de laboratoires se sont intéressés jusqu'ici aux CTD-phosphatases.

Deux approches différentes ont cependant permis l'identification d'une unique CTD-phosphatase chez l'humain. Le groupe de M. Dahmus (*University of California, Davis, USA*) a, le premier, purifié une phosphatase spécifique du CTD phosphorylé [2, 3]. Curieusement, cette phosphatase n'agit que sur le CTD au sein de l'ARN polymérase II entière (constituée de ses 12 sous-unités chez l'humain) et est sans effet sur le CTD isolé. Le site d'ancrage de la phosphatase sur la polymérase serait donc en dehors du CTD. L'enzyme est un monomère de 150 kDa localisé dans le noyau [4]. L'activité de cette phosphatase est stimulée par le facteur général de transcription TFIIF, d'où son appellation : FCP1 (*TFIIF-dependent CTD phosphatase*). La même phosphatase a été identifiée indépendamment à l'issue d'un criblage de double hybride utilisant la sous-unité RAP74 du TFIIF comme appât [5]. L'orthologue de cette phosphatase chez la levure *S. cerevisiae* présente les mêmes caractéristiques biochimiques et la même spécificité de substrat [6, 7].

Un facteur essentiel au cycle transcriptionnel

L'intégration de FCP1 dans le métabolisme transcriptionnel ne fait aujourd'hui plus de doute (*figure 1*). FCP1 est stimulée par la sous-unité RAP74 du facteur général de transcription TFIIF, et le facteur TFIIB

s'oppose à cette stimulation [2]. En effet, RAP74 et TFIIB partagent un même motif peptidique de séquence KEFGK responsable à lui seul de l'interaction de ces facteurs avec le domaine carboxy-terminal de FCP1, et entreraient donc en compétition pour interagir avec la phosphatase [8]. L'action concertée de ces facteurs sur l'activité phosphatase est compatible avec le contrôle de la phosphorylation du CTD lors du début de la transcription : l'ARN polymérase II est associée au TFIIF avant d'être recrutée sur le promoteur, ce qui favorise sa déphosphorylation ; par la suite, la présence du TFIIB au sein du complexe de pré-initiation inhiberait la phosphatase, permettant ainsi l'hyperphosphorylation de la polymérase.

Par ailleurs, D. Reinberg *et al.* ont montré que FCP1 stimule l'élongation de la transcription *in vitro*, indépendamment de son activité catalytique [9]. Comme l'activité phosphatase de FCP1 est peu efficace vis-à-vis de l'ARN polymérase IIO lorsque celle-ci est en action [10, 11], ce n'est qu'après la terminaison des transcrits que FCP1 assurerait la déphosphorylation de la polymérase et permettrait alors son recyclage dans les complexes de pré-initiation sous une forme déphosphorylée, IIA [9].

L'implication de FCP1 dans la transcription concerne la majorité des gènes : chez la levure, la transcription de 69 % des gènes requiert de manière absolue une protéine FCP1 active [12]. En outre, à température restrictive, les mutants thermosensibles du gène FCP1 présentent une diminution drastique de la transcription et une hyperphosphorylation de l'ensemble de l'ARN polymérase II cellulaire.

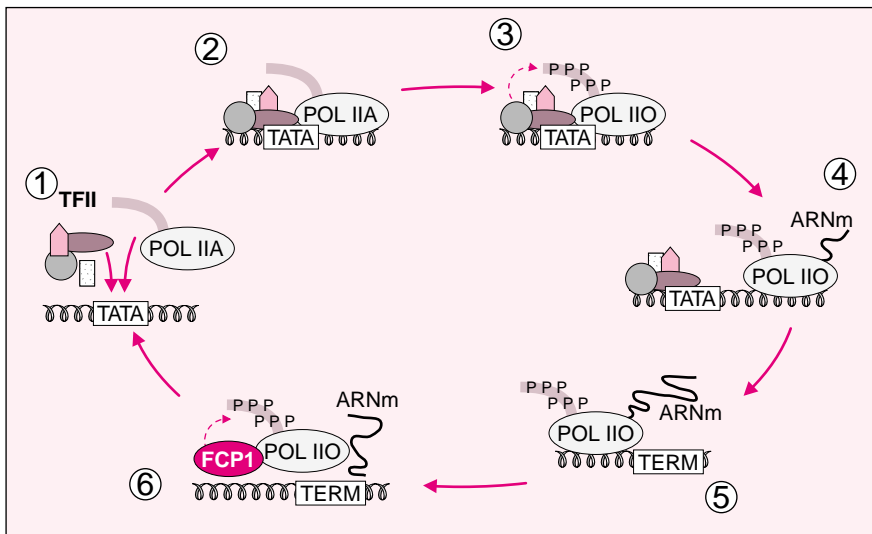


Figure 1. Mécanisme d'action de la CTD-phosphatase FCP1. Les facteurs généraux de transcription de classe II (TFII) recrutent l'ARN polymérase II hypophosphorylée sur le CTD (pol IIA) pour former un complexe de pré-initiation de la transcription autour de la séquence TATA du promoteur d'un gène (1, 2). Des CTD-kinases associées aux facteurs généraux de transcription hyperphosphorylent le CTD (3), ce qui aboutit au démarrage de la transcription : l'ARN polymérase IIO quitte le promoteur et catalyse la synthèse de l'ARN messager (4). La transcription s'achève lorsque l'ARN polymérase II rencontre un site de terminaison (TERM) en 3' du gène (5) ; la CTD-phosphatase FCP1 catalyse alors la déphosphorylation du CTD (6), ce qui permet de régénérer l'ARN polymérase II sous sa forme hypophosphorylée (IIA).

FCP1 est inactivée par la protéine Tat du VIH

Si la régulation de l'activité CTD-phosphatase est encore peu documentée, on sait, en revanche, que l'enzyme est inactivée lors de la transcription du VIH. L'hyperphosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II par la CTD-kinase CDK9 associée au facteur p-TEFb est un pré-requis absolu à la production de transcrits longs à partir du promoteur du VIH. L'entrée de p-TEFb dans le complexe de transcription utilise la protéine Tat. Cette protéine virale active la transcription du génome du VIH à différents niveaux : en s'associant à des histone-acétyltransférases, elle permet le déplacement des nucléosomes et en recrutant p-TEFb, elle stimule l'hyperphosphorylation du CTD (*m/s 1999, n° 10, p. 1173*). Une seconde propriété de Tat est d'inhiber directement l'activité CTD-phosphatase de FCP1 ; ce phénomène est corrélé à la transactivation du promoteur viral [13]. L'inactivation de FCP1 s'intégrerait donc dans la stra-

tégie de détournement de la machinerie cellulaire permettant au virus de bénéficier de formes d'ARN polymérase II hyperphosphorylées et d'optimiser sa propre transcription.

FCP1, une protéine phosphatase atypique

L'activité de FCP1 requiert des cations magnésium (Mg^{2+}) et résiste à l'acide okadaïque, au vanadate et à la microcystine [3]. Ces propriétés rapprochent FCP1 des phosphatases de type 2C, PP2C (*m/s 1998, n° 3, p. 259*). Elle s'en distingue cependant par sa capacité à déphosphoryler les sérines phosphorylées qui possèdent une proline du côté carboxy-terminal dans les heptapeptides de l'ARN polymérase IIO, alors que les PP2C ont une préférence pour les thréonines phosphorylées, sans proline du côté C-terminal. En outre, FCP1 ne présente aucune homologie de séquence avec les protéines phosphatases identifiées.

M. Kobor *et al.* [12] ont remarqué que la protéine FCP1 de levure pré-

sentait dans sa région amino-terminale, dite « domaine FCP1 » car conservée chez les différentes espèces, un motif caractéristique du site catalytique d'une famille de phosphotransférases et phosphohydrolases admettant pour substrat de petites molécules. Cette famille comprend des enzymes telles que la phosphomannomutase, la L-phosphosérine phosphatase, la glycérol 3-phosphate phosphatase, la parani-trophénylphosphatase, et plusieurs ATPases, mais ne compte pas à ce jour de protéine phosphatase. La mutation d'un résidu aspartate unique présent dans ce motif abolit totalement l'activité CTD-phosphatase de la protéine FCP1, ce qui confirme son appartenance à cette nouvelle famille d'enzymes.

FCP1 est la seule enzyme décrite à ce jour capable de déphosphoryler l'ARN polymérase II. Les banques de données de séquences contiennent plusieurs protéines apparentées à FCP1. Certaines d'entre elles représentent probablement les orthologues de FCP1 chez la levure de fission *S. pombe*, le nématode *C. elegans*, la drosophile, le xénope ou l'arabette *A. thaliana*. Ceci suggère une conservation de l'enzyme chez l'ensemble des eucaryotes, en parallèle avec la remarquable conservation du CTD. D'autres séquences, plus éloignées, présentent des homologies avec FCP1, non restreintes au site catalytique [12]. C'est le cas chez l'humain du gène suppresseur de tumeur HYA22 et du gène OS4, fréquemment amplifié dans des sarcomes. Ces différentes protéines pourraient constituer avec FCP1 une nouvelle famille de protéines phosphatases fondamentales pour le métabolisme et la prolifération cellulaires.

**Benoît Palancade
Olivier Bensaude**

Génétique moléculaire, UMR 8541 Cnrs, École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.

1. Bensaude O, Bellier S, Dubois MF. Le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II: un pivot des ARN messagers en général et du VIH en particulier. *Med Sci* 1998; 14: 167-74.

2. Chambers RS, Wang BQ, Burton ZF, Dahmus ME. The activity of COOH-terminal domain phosphatase is regulated by a docking site on RNA polymerase II and by the general transcription factors IIF and IIB. *J Biol Chem* 1995; 270: 14962-9.

3. Chambers RS, Dahmus ME. Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells that dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1994; 269: 26243-8.

4. Dubois MF, Marshall NF, Nguyen VT, *et al*. Heat shock of HeLa cells inactivates a nuclear protein phosphatase specific for dephosphorylation of the C-terminal domain (CTD) of RNA Polymerase II. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 1338-44.

5. Archambault J, Pan G, Dahmus GK, *et al*. FCP1, the RAP74-interacting subunit of a human protein phosphatase that dephosphorylates the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1998; 273: 27593-601.

6. Archambault J, Chambers R, Kobor MS, *et al*. An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor TFIIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14300-5.

7. Chambers RS, Kane CM. Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast. *J Biol Chem* 1996; 271: 24498-504.

8. Kobor MS, Simon LD, Omichinski J, Zhong G, Archambault J, Greenblatt J. A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7438-49.

9. Cho H, Kim TK, Mancebo H, Lane WS, Flores

O, Reinberg D. A protein phosphatase functions to recycle RNA polymerase II. *Genes Dev* 1999; 13: 1540-52.

10. Lehman AL, Dahmus ME. The sensitivity of RNA polymerase II in elongation complexes to C-terminal domain phosphatase. *J Biol Chem* 2000; 275: 14923-32.

11. Marshall NF, Dahmus ME. C-terminal domain phosphatase sensitivity of RNA polymerase II in early elongation complexes on the HIV-1 and adenovirus 2 major late templates. *J Biol Chem* 2000; 275: 32430-7.

12. Kobor MS, Archambault J, Lester W, *et al*. An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 1999; 4: 55-62.

13. Marshall NF, Dahmus GK, Dahmus ME. Regulation of CTD phosphatase by HIV-1 Tat protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 31726-30.

