

L'ADN topo-isomérase I : vers une fonction dans l'épissage des ARN pré-messagers

L'ADN topo-isomérase I, connue pour son aptitude à relâcher la sur-tension de l'ADN [1, 2], a une autre activité importante, celle de phosphoryler de façon spécifique les protéines SR*, ainsi nommées parce que le motif sérine/arginine est répété plusieurs fois dans une région donnée de leur séquence. Ainsi, l'ADN topo-isomérase I a-t-elle le pouvoir inattendu d'influencer l'épissage des ARN pré-messagers, puisque plusieurs des protéines qui prennent en charge cette opération sont des protéines SR. Cette découverte vient d'être tout récemment publiée par la revue *Nature* [3].

Qu'est-ce que l'épissage? C'est une suite de deux réactions de transestérification qui se produisent sur l'ARN nouvellement transcrit et qui ont pour effet de ligaturer les séquences porteuses d'information (exons) après excision des séquences intercalaires (introns) présentes dans la très grande majorité des gènes eucaryotes (*m/s n° 3, vol. 1, p. 158*). L'épissage est en fait une réaction chimique simple mais l'édifice ribonucléoprotéique qui est construit autour de l'ARN substrat est rendu extrêmement complexe par le nombre des partenaires mis en jeu et la variété des interactions que ces derniers développent entre eux. Cet édifice multifactoriel est le *spliceosome* [4], une structure qu'il est aisé de reconstituer *in vitro* par simple introduction d'un ARN pré-messager de synthèse dans un extrait nucléaire de cellules humaines HeLa contenant l'ensemble des facteurs d'épissage. L'assemblage du *spliceosome* et l'épis-

sage résultent de l'action coordonnée de quatre particules ribonucléoprotéiques, les snRNP U1, U2, U5 et U4/U6 et de plusieurs protéines auxiliaires dont le nombre est encore incertain [5]. Notons aussi que la réaction dans son ensemble ne peut avoir lieu sans ATP. Le mécanisme conduisant à l'excision d'un intron comprend, nous l'avons dit, deux réactions de transestérification. Il est, sur le plan de la chimie, rigoureusement identique à celui mis en œuvre pour l'excision des introns dits du groupe II, rencontrés dans certains ARN pré-messagers de champignons et dans des ARN mitochondriaux de cellules végétales. Dans les deux cas, en effet, on trouve les mêmes intermédiaires et les mêmes produits avec, notamment, la formation d'un intermédiaire branché donnant à l'intron en cours d'excision la forme d'un lasso (*m/s n° 3, vol. 1, p. 158*). Les introns du groupe II présentent la particularité de pouvoir être excisés *in vitro* de manière autocatalytique grâce à un ensemble de motifs très conservés leur permettant d'adopter une structure tridimensionnelle typique, indépendamment de la présence de tout facteur protéique et de tout apport d'ATP. Puisqu'il y a similitude chimique entre les mécanismes donnant lieu à l'excision de ces deux types d'introns et puisqu'il est prouvé que les introns du groupe II sont autocatalytiques, on admet, même si ce n'est pas encore directement démontré, que l'excision des introns des ARN pré-messagers nucléaires ne peut être engendrée que par de l'ARN, excluant ainsi la participation de protéines enzymatiques au niveau de la réaction d'épissage proprement dite. Ce qui est certain, c'est que les cinq snARN (U1, U2, U4, U5 et U6), introduits dans le *spliceosome*

sous la forme de ribonucléoprotéines (snRNP), forment entre eux et avec l'ARN pré-messager des structures qui rappellent celles identifiées dans les introns du groupe II [6]. On en déduit donc que la finalité de ces interactions ARN-ARN est de former une structure autocatalytique de type ribozyme et on considère que les snARN sont les descendants d'un ARN ancestral qui auraient évolué pour accommoder des introns de tailles et de séquences très variables. S'il semble évident aujourd'hui que l'excision des introns des ARN pré-messagers est due à de l'ARN, il n'en reste pas moins vrai que des activités enzymatiques sont nécessaires pour édifier la structure catalytiquement active qui ne peut se faire spontanément, comme dans le cas des introns du groupe II. En effet, l'assemblage du *spliceosome* est un processus comportant plusieurs étapes durant lesquelles de multiples interactions (ARN-ARN, ARN-protéine, protéine-protéine) s'établissent et se défont jusqu'à l'accomplissement de l'acte catalytique. Globalement, la fonction première des « enzymes de l'épissage » pourrait être d'assurer la dynamique du système en modulant les différentes interactions entre les divers constituants du *spliceosome*. Elles agissent au niveau des facteurs non-snRNP mais aussi au niveau des protéines des snRNP et des snARN eux-mêmes. Des ATPases dépendantes de l'ARN ont été identifiées, essentiellement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [7]. Par ailleurs, des travaux ont montré que la phosphorylation de facteurs de l'épissage est nécessaire pour l'assemblage du *spliceosome*, et qu'une déphosphorylation au moins partielle de ces mêmes facteurs doit intervenir juste avant ou pendant l'acte catalytique [8-11].

* Pour des raisons historiques, les protéines contenant un motif Ser et Arg répétés plusieurs fois dans leur séquence sont appelées protéines SR alors que les domaines riches en ces mêmes acides aminés sont désignés par l'abréviation R/S.

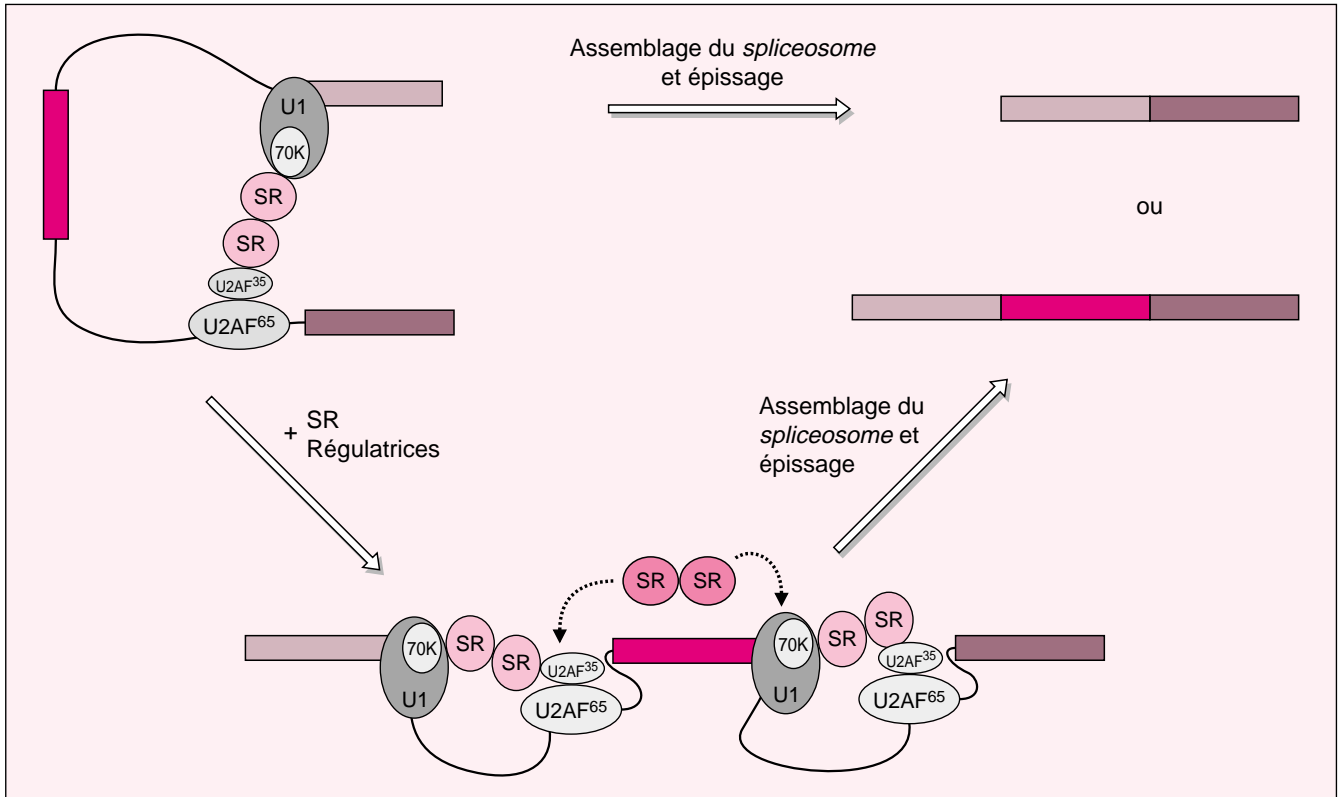


Figure 1. **Un modèle de sélection des sites de l'épissage fondé sur un réseau d'interactions entre des protéines à domaine R/S.** Deux facteurs sont requis dès les premières étapes de la formation du spliceosome : le premier est la snRNP U1 composée d'un snARN appelé U1 et de plusieurs protéines dont une (70K) possède un domaine R/S ; le second est le facteur auxiliaire de la snRNP U2 (U2AF), un hétérodimère formé de deux protéines (65 et 35 kDa) possédant chacune un domaine R/S. Ces deux facteurs interagissent directement avec l'ARN prémessager : au niveau du site d'épissage 5' pour le premier et au niveau d'un bloc de pyrimidines situé à une distance de 20-30 nucléotides en amont du site d'épissage 3' pour le second. D'autres facteurs appartenant à la famille des protéines SR sont chargés de stabiliser ces interactions. Selon le modèle simplifié présenté ici, ces derniers sont capables d'interagir entre eux et avec les autres facteurs, permettant ainsi de connecter un site d'épissage 5' à un site 3'. Le domaine R/S de tous ces facteurs joue un rôle prépondérant dans l'établissement de ces interactions. Certaines protéines SR (appelées ici régulatrices) peuvent interagir directement ou indirectement avec des séquences exoniques et, de ce fait, favoriser un épissage alternatif, par exemple l'inclusion d'un exon dans le cas présent. Les rectangles représentent les exons ; les introns sont matérialisés par des traits fins.

Les étapes précoces de l'assemblage du *spliceosome* nécessitent la contribution de plusieurs protéines possédant un motif R/S*. Parmi celles-ci, citons la protéine 70K de la snRNP U1, le facteur auxiliaire de la snRNP U2 (U2AF) et des protéines appartenant à la famille des protéines SR [12] phosphorylables par l'ADN topo-isomérase I. Toutes ces protéines se caractérisent par la présence d'un ou deux motifs de liaison à

l'ARN (RNP-CS) en plus du motif R/S. Sur la base d'expériences montrant que des interactions sont possibles entre protéines SR, un modèle a été proposé selon lequel les protéines SR mises en jeu pour l'épissage sont impliquées dans le rapprochement des sites d'épissage 5' et 3' dès les premières phases de l'assemblage du *spliceosome* [12]. Dans le même ordre d'idée, il a été montré que les protéines à domaine R/S permettent le choix alternatif des sites d'épissage et sont à l'origine de

l'engagement de l'ARN prémessager vers la voie de l'épissage [12]. Comprendre le fonctionnement des protéines SR et savoir comment leur activité est réglée apparaissent aujourd'hui comme une étape obligée vers l'explication définitive du mécanisme de l'épissage.

On comprend donc tout l'intérêt que représente la découverte que l'ADN topo-isomérase I est aussi une protéine kinase phosphorylant les protéines SR, et cela d'autant plus que les sites atteints pourraient bien être diffé-

* Voir note, p. 1029.

rents de ceux reconnus par d'autres kinases précédemment identifiées [12]. En effet, le traitement de cellules par des inhibiteurs de l'ADN topo-isomérase I n'abolit pas complètement la phosphorylation des protéines SR, mais touche aux seuls sites reconnus par l'ADN topo-isomérase I [3]. Une étude fondée sur des expériences de mutagenèse doit maintenant être entreprise pour identifier les sites R/S accessibles à l'ADN topo-isomérase I. Des résultats non encore publiés indiquent qu'ils ne sont pas reconnus dans le contexte d'une séquence, mais plutôt dans celui d'une structure particulière que prendrait la protéine phosphorylable. Sur un plan plus général, le fait que la camptothécine et ses dérivés, des inhibiteurs de l'activité de relaxation de l'ADN topo-isomérase I utilisés en chimiothérapie anticancéreuse [2], soient également inhibiteurs de l'activité protéine kinase, et cela en dépit de l'observation que les centres actifs pour ces deux types d'activité sont distincts, est également extrêmement intéressant. On peut en effet espérer mieux comprendre le mécanisme d'action de ces médicaments et peut être en trouver de nouveaux qui n'affecteraient que l'activité protéine

kinase de l'ADN topo-isomérase I. Puisque l'acquisition d'un phénotype tumoral résulte de l'altération ou du dérèglement de gènes impliqués dans la croissance et/ou la division cellulaire et puisque ce dérèglement peut être lié à l'expression aberrante de protéines impliquées dans la transmission du signal par épissage différentiel, il ne semble pas déraisonnable d'imaginer que l'on pourra, avec de tels composés, agir sur l'activité protéine kinase de l'ADN topo-isomérase I pour stopper ou freiner la production incontrôlée de ces protéines. Il faut enfin retenir l'idée que l'ADN topo-isomérase I pourrait bien exercer son activité de protéine kinase dans d'autres processus biologiques que celui conduisant à l'épissage. Il est un fait que l'ADN topo-isomérase I phosphoryle toutes les protéines SR connues et que les protéines SR ne sont pas toutes des facteurs d'épissage.

F.R.
E.L.
T.F.
E.A.
I.G.
G.C.
C.B.
J.T.

1. Gupta M, Fujimori A, Pommier Y. Eukaryotic DNA topo-isomérase I. *Biochim Biophys Acta* 1995 ; 1262 : 1-14.
2. Duguet M, Riou J. De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 962-72.
3. Rossi F, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topo-isomérase I. *Nature* 1996 ; 381 : 80-2.
4. Moore MJ, Query CC, Sharp PA. Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In: Gestland R, Atkins J, eds. *The RNA world. Plainview*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992 : 303-58.
5. Lygerou Z, Kandelslewis S, Séraphin B. Le rôle des snRNP dans l'épissage des ARN prémessagers. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 165-70.
6. Nilsen TW. RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell* 1994 ; 78 : 1-4.
7. Umen JG, Guthrie C. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. *RNA* 1995 ; 1 : 869-85.
8. Tazi J, Daugeron MC, Cathala G, Brunel C, Jeanteur P. Adenosine phosphorothioates (AT-PoS and ATPoS) differentially affect the two steps of mammalian pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 4322-6.
9. Tazi J, Kornstädt U, Rossi F, Jeanteur P, Cathala G, Brunel C, Lührmann R. Thiophosphorylation of U1-70K protein inhibits pre-mRNA splicing. *Nature* 1993 ; 363 : 283-6.
10. Mermoud JE, Cohen PTW, Lamond AI. Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 1992 ; 20 : 5263-9.
11. Mermoud JE, Cohen PTW, Lamond AI. Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBO J* 1994 ; 13 : 5679-88.
12. Fu XD. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 1995 ; 1 : 663-80.