



RÉFÉRENCES

1. Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 2001 ; 293 : 1159-63.
2. Mejia-Gervacio S, Collin T, Pouzat C, et al. Axonal speeding : Shaping synaptic potentials in small neurons by the axonal membrane compartment. *Neuron* 2007 ; 53 : 843-55.
3. Llano I, Tan Y, Caputo C. Spatial heterogeneity of intracellular Ca^{2+} signals in axons of basket cells from rat cerebellar slices. *J Physiol* 1997 ; 502 : 509-19.
4. Tan YP, Llano I. Modulation of K^+ channels of action potential-evoked intracellular Ca^{2+} concentrations rises in rat cerebellar basket cell axons. *J Physiol* 1999 ; 520 : 65-78.
5. Llano I, González J, Caputo C, et al. Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci* 2000 ; 3 : 1256-65.
6. Alle H, Geiger JR. Combined analog and action potential coding in hippocampal mossy fibers. *Science* 2006 ; 311 : 1290-3.
7. Shu Y, Hasenstaub A, Duque A, et al. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature* 2006 ; 441 : 761-5.
8. Fasano C, Niel JP, Tercé F, Miolan JP. Conduction nerveuse d'excitation sans potentiel d'action. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 1075-7.

NOUVELLE

Piéger le produit pour inhiber spécifiquement l'enzyme

Thibaut Crépin, Stephen Cusack

T. Crépin, S. Cusack : European Molecular Biology Laboratory, antenne de Grenoble, 6, rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France.

crepin@embl.fr

> L'interprétation de l'information génétique en protéine est l'un des processus fondamentaux de toute cellule vivante. La complexité de ce phénomène se traduit par l'implication d'un grand nombre de protagonistes. Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) constituent une famille d'enzymes isofonctionnelles indispensables à ce processus (pour revue [1]). Leur fonction principale consiste à catalyser la réaction d'aminocyclation, c'est-à-dire l'estérification des acides aminés sur l'(les) ARNt correspondant(s), aminoacyl-ARNt qui seront alors utilisés par le ribosome pour assurer la synthèse protéique. La réaction d'aminocyclation se déroule en deux étapes successives : (1) l'activation de l'acide aminé lors de la formation d'un complexe stable aminoacyl adénylate : aaRS suivie de (2) son transfert sur le groupement 2' ou 3' hydroxyle du ribose de l'adénosine située à l'extrémité 3' de l'ARNt. La précision de cette réaction conditionne la fidélité de la traduction de l'information génétique. En raison des similitudes qui existent entre certains acides aminés, certaines aaRS ont développé des mécanismes extrêmement précis de correction d'erreurs aboutissant à l'élimination des acides aminés mal activés (édition pré-transfert) et/ou des

ARNt mal aminoacylés (édition post-transfert). La leucyl-ARNt synthétase (LeuRS), une des aaRS les plus étudiées par notre groupe, possède ainsi à cette fin un domaine d'édition distant de plus de 30 Å du domaine catalytique [2, 3]. Ce domaine comprend notamment une cavité (site d'édition) bordée de

résidus hautement conservés, impliqués dans l'activité d'édition post-transfert [4, 5] (Figure 1).

Anacor Pharmaceuticals, une compagnie pharmaceutique californienne, travaille au développement de molécules dérivées du bore, un élément naturellement présent dans l'environ-

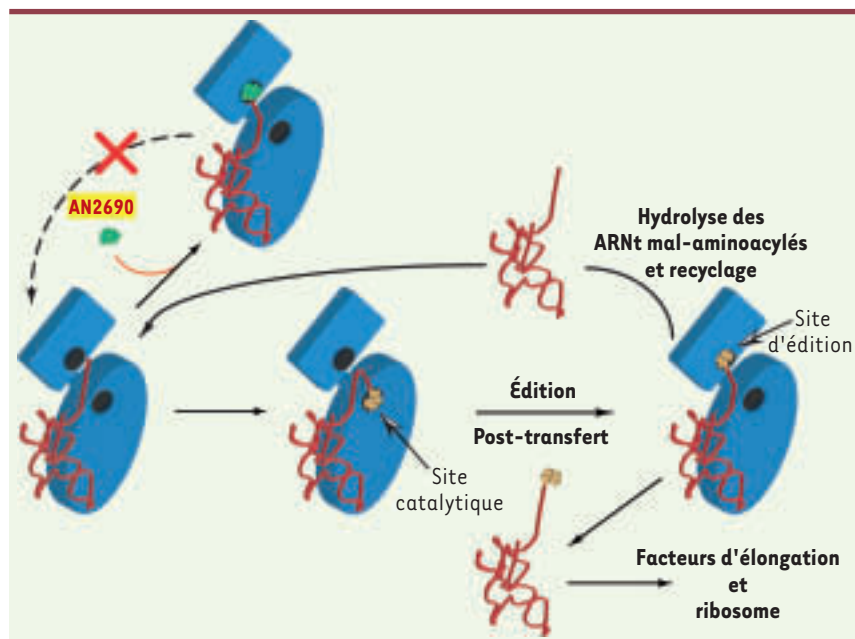


Figure 1. Mode d'action du AN2690. L'enzyme amino-acyl-ARNt synthétase est représentée en bleu, l'ARNt en rouge et l'acide aminé en jaune. L'ARNt synthétase est responsable de l'appariement correct d'un ARNt avec l'acide aminé correspondant (ici la leucine). Une première étape est la reconnaissance de l'acide aminé par le site catalytique, puis la vérification du produit d'adénylation dans le site d'édition. Le contrôle de qualité élimine les ARNt mal aminoacylés

nement mais peu employé en dépit de son ubiquité, dans l'optique de traiter différentes maladies inflammatoires et/ou infectieuses. Le AN2690 (5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole) fait partie de ce contingent de nouveaux composés. Il a récemment prouvé son efficacité dans le traitement de l'onychomycose, une infection fongique affectant principalement les ongles des pieds (*Figure 2A*) [6, 7, 9]. Des essais cliniques sont actuellement en cours en vue de sa potentielle mise sur le marché.

Pour identifier la cible de ce composé antifongique à large spectre d'action, des mutants de *Saccharomyces cerevisiae* résistant au AN2690 ont été isolés et caractérisés [8]. Leur séquençage a alors montré que la majorité des mutations, induites ou spontanées, affectaient spécifiquement le gène *CDC60* codant pour la LeuRS cytoplasmique, et plus particulièrement les régions très conservées du site d'édition post-transfert de l'enzyme. La cible étant identifiée, les mesures d'activité enzymatique en présence

du AN2690 ont permis d'amorcer la compréhension du mode d'action du composé. Ainsi le AN2690 supprime la capacité de la LeuRS à hydrolyser les ARNt^{Leu} mal aminocylés (c'est-à-dire Ile-ARNt^{Leu}) mais il inhibe également la réaction d'aminocyclation, bloquant de cette manière la synthèse protéique *in vivo*. Il apparaît cependant que l'effet inhibiteur du composé sur la réaction d'aminocyclation requiert uniquement la présence de l'ARNt^{Leu}, le AN2690 se comportant comme un inhibiteur non compétitif vis-à-vis de la leucine et de l'ATP, les substrats de la première étape de la réaction.

L'obtention de la structure cristallographique du complexe entre la LeuRS, l'ARNt^{Leu} et le AN2690 a permis d'élucider définitivement les bases moléculaires du mode d'action du composé (*Figure 2B*). La structure atomique du complexe a ainsi révélé que l'atome de bore présent dans le composé réagissait avec les deux groupements hydroxyles libres de l'adénosine terminale (A76) de l'ARNt, formant une structure spiroborate tétraédrique (*Figure 2C* et *2D*). Cette structure particulière est de plus fortement stabilisée dans le site d'édition de la LeuRS, notamment par les résidus strictement conservés décrits comme étant largement impliqués dans la réaction d'édition post-transfert [4, 5]. La comparaison de cette structure avec celle de la LeuRS complexée au Nva2aa, un analogue structural du substrat de la réaction d'édition post-transfert [3], montre une parfaite superposition entre la partie correspondant au « mauvais » acide aminé du Nva2aa d'une part et la partie benzoxaborole plane du AN2690 d'autre part.

Dans le passé, les molécules ciblant les aaRS se contentaient principalement d'interagir, avec une affinité plus ou moins forte, au niveau de leur domaine catalytique empêchant ainsi la réaction d'aminocyclation. Le AN2690 ouvre de nouvelles perspectives quant à la

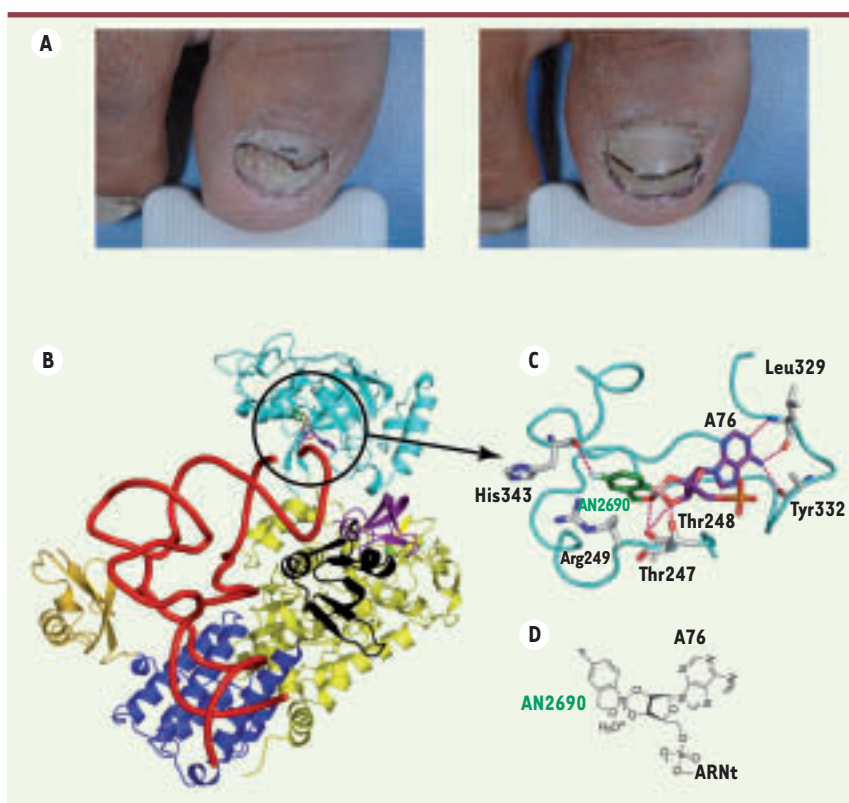


Figure 2. Le AN2690, effets thérapeutiques et mécanisme moléculaire. **A.** Effet du AN2690 sur le traitement de l'onychomycose. Le sujet présenté a bénéficié de l'application journalière d'une pommade contenant 7,5 % AN2690 pendant une période de six mois. Les photos montrent un ongle avant traitement (partie gauche) et 90 jours après le début du traitement (source [9]). **B.** Structure tridimensionnelle du complexe entre la LeuRS de *T. thermophilus*, l'ARNt^{Leu} et le AN2690 (cerclé de noir). Le domaine d'édition post-transfert est représenté en cyan, le domaine catalytique en jaune avec le domaine de liaison du zinc en magenta et le domaine leucyl-spécifique en noir, le domaine de liaison à l'anticodon en bleu, le domaine C-terminal en jaune doré et l'ARNt en rouge. **C.** Détails de la stabilisation du produit résultant de la réaction entre le AN2690 et l'adénosine terminale (A76) de l'ARNt^{Leu} dans le site d'édition de la LeuRS. Les résidus impliqués sont représentés en gris, l'adénosine terminale en violet et le AN2690 en vert. **D.** Formule topologique du produit.



conception de molécules inhibitrices ciblant ces enzymes. Interagissant avec le site d'édition post-transfert, ce composé présente la particularité d'inhiber la LeuRS en réagissant spécifiquement avec l'ARNt^{Leu}, l'un de ses substrats, formant alors un complexe indissociable, dont la demi-vie a été estimée à plus de 7 heures dans le cas de l'enzyme de levure (Figure 1). L'atome de bore, constituant majeur du cycle oxaborole, requiert alors la présence des deux groupements hydroxyles libres uniquement présents sur l'adénosine terminale. Cela implique que seul l'ARNt^{Leu} non aminoacylé peut être piégé par le AN2690, démontrant ainsi la grande spécificité de ce composé. Ainsi, grâce à l'utilisation de molécules appropriées, ce mécanisme visant à piéger spécifi-

quement les ARNt pourrait être employé pour inhiber d'autres aaRS possédant une activité d'édition post-transfert. Ces résultats démontrent de plus le potentiel que constitue l'incorporation du bore, un élément naturel majeur peu utilisé jusqu'à maintenant, dans des inhibiteurs d'enzyme rationnellement conçus. ♦

**Trap the product
to specifically inhibit the enzyme**

RÉFÉRENCES

1. Ibba M, Francklyn C, Cusack S (eds). *The aminoacyl-tRNA synthetases*. Georgetown, Texas, USA : Landes Bioscience/Eurekah.com, 2005 : 78626.
2. Cusack S, Yaremchuk A, Tkalalo M. The 2 Å crystal structure of leucyl-tRNA synthetase and its complex with a leucyl-adenylate analogue. *EMBO J* 2000 ; 19 : 2351-61.
3. Lincecum TL, Tkalalo M, Yaremchuk A, et al. Structural and mechanistic basis of pre- and posttransfer editing by leucyl-tRNA synthetase. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 951-63.
4. Mursinna RS, Lincecum TL, Martinis SA. A conserved threonine within *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase prevents hydrolytic editing of leucyl-tRNA^{Leu}. *Biochemistry* 2001 ; 40 : 5376-81.
5. Zhai Y, Martinis SA. Two conserved threonines collaborate in the *Escherichia coli* leucyl-tRNA synthetase amino acid editing mechanism. *Biochemistry* 2005 ; 44 : 15437-43.
6. Baker SJ, Zhang YK, Akama T, et al. Discovery of a new boron-containing antifungal agent, 5-fluoro-1,3-dihydro-1-hydroxy-2,1-benzoxaborole (AN2690), for the potential treatment of onychomycosis. *J Med Chem* 2006 ; 49 : 4447-50.
7. Alley MR, Baker SJ, Beutner KR, Plattner J. Recent progress on the topical therapy of onychomycosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2007 ; 16 : 157-67.
8. Rock FL, Mao W, Yaremchuk A, et al. An antifungal agent inhibits an aminoacyl-tRNA synthetase by trapping tRNA in the editing site. *Science* 2007 ; 316 : 1759-61.
9. Beutner K, Toledo-Bahena M, Barbosa-Alanis H, et al. Interim results of a multi-center study to evaluate the safety and efficacy of topically applied AN2690 5.0% and 7.5% solutions for the treatment of onychomycosis of the great toe nail. Washington : 65^e Meeting annuel de l'American Academy of Dermatology, 2007. 1802 (poster).

NOUVELLE

p27^{Kip1}, suppresseur de tumeur... et oncogène ?

Arnaud Besson

Le rôle classique de p27 dans le noyau : inhibiteur des complexes cycline/CDK

p27^{Kip1} (p27) est un inhibiteur du cycle cellulaire et peut entraîner un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire en réponse à des signaux anti-mitotiques [1, 11]. p27 exerce son activité anti-proliférative en inhibant les complexes cyclines/CDK (*cyclin-dependent kinase*) dont l'activité kinase est requise pour la progression dans le cycle cellulaire. La partie amino-terminale de p27 contient des domaines d'interaction spécifiques pour les cyclines et CDK, et la liaison de p27 d'une part occulte un domaine d'interaction entre la cycline et son substrat, et d'autre part empêche la liaison de l'ATP au site catalytique de la CDK [1]. L'importance de p27 dans le contrôle du cycle cellu-

laire est soulignée par les phénotypes des souris p27^{-/-}, dont la taille est augmentée d'environ 30 %, divers organes sont hyperplasiques, et les épithéliums sensoriels de la rétine et de l'oreille interne sont désorganisés [2]. Tous ces phénotypes sont attribués à une augmentation globale de la prolifération en l'absence de p27.

p27 est également un suppresseur de tumeur, puisque dans les souris p27^{-/-}, l'absence de la protéine entraîne des tumeurs spontanées de l'hypophyse et augmente la sensibilité des animaux à la tumorigenèse induite par des carcinogènes ou par une irradiation [2, 3]. De plus, chez la souris, la perte de p27 augmente la prédisposition à la tumorigenèse causée par la perte d'autres suppresseurs de tumeurs (comme PTEN, APC, ou p18^{INK4c}). La perte de l'expres-

LBCMCP - CNRS UMR 5088,
Université Paul Sabatier,
118, Route de Narbonne, Batiment 4R3b1,
31062 Toulouse Cedex 09, France.
abesson@cict.fr

sion nucléaire de p27 est communément observée dans de nombreux types de cancers chez l'homme (dont sein, côlon, prostate, ovaire, poumon, cerveau, estomac...) et la diminution du niveau de p27 est un facteur pronostic négatif, souvent associée à des tumeurs agressives [4].

Un rôle nouveau, oncogénique, de la forme cytoplasmique de p27

Cependant, un certain nombre de données expérimentales indiquent que le rôle de p27 au cours de la tumorigenèse n'est pas aussi simple qu'initialement anticipé et pourrait s'étendre au-delà de l'inhibition des complexes cycline/CDK et du contrôle de la prolifération. Tout d'abord, p27 est un suppresseur de tumeurs atypique puisque les mutations du gène de p27 dans les tumeurs sont