

du cancer, la fondation nationale danoise de recherche (DNRF82), le conseil médical de recherche, la fondation Novo Nordisk et le FP7 Marie Curie actions ITN nucleosome4D. La recherche dans le laboratoire de Juri Rappsilber est soutenue par le Wellcome Trust (084229, 077707, 092076, 091020). C.A a bénéficié de bourses post doctorales EMBO, HFSP, du conseil médical de recherche danois et de l'ERC2011StG.

RÉFÉRENCES

- McKnight SL, Miller OL Jr. Electron microscopic analysis of chromatin replication in the cellular blastoderm *Drosophila melanogaster* embryo. *Cell* 1977 ; 12 : 795-804.
- Sogo JM, Stahl H, Koller T, Knippers R. Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol* 1986 ; 189 : 189-204.
- DePamphilis ML, Wassarman PM. Replication of eukaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork. *Annu Rev Biochem* 1980 ; 49 : 627-66.
- Taddei A, Roche D, Sibarita JB, et al. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 1999 ; 147 : 1153-66.
- Sobel RE, Cook RG, Perry CA, et al. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 1237-41.
- Seale RL. Assembly of DNA and protein during replication in HeLa cells. *Nature* 1975 ; 255 : 247-9.
- Alabert C, Groth A. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 153-67.
- Margueron R, Justin N, Ohno K, et al. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 2009 ; 461 : 762-7.
- Scharf AN, Barth TK, Imhof A. Establishment of histone modifications after chromatin assembly. *Nucleic Acids Res* 2009 ; 37 : 5032-40.
- Sirbu BM, Couch FB, Feigler JT, et al. Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 1320-7.
- Kliszczak AE, Rainey MD, Harhen B, et al. DNA mediated chromatin pull-down for the study of chromatin replication. *Sci Rep* 2011 ; 1 : 95.
- Alabert C, Bukowski-Wills JC, Lee SB, et al. Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components. *Nat Cell Biol* 2014 ; 16 : 281-93.
- Gilbert DM. Evaluating genome-scale approaches to eukaryotic DNA replication. *Nat Rev Genet* 2010 ; 11 : 673-84.
- Kustatscher G, Hégarat N, Wills KL, et al. Proteomics of a fuzzy organelle: interphase chromatin. *EMBO J* 2014 ; 33 : 648-64.
- Unger, S, Górna MW, Le Béhec A, et al. FAM111A mutations result in hypoparathyroidism and impaired skeletal development. *Am J Hum Genet* 2013 ; 92 : 990-5.
- Bertin A, Mangenot S. Structure et dynamique de la particule cœur de nucléosome. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 715-9.
- Émadali A, Gallagher-Gambarelli M. La protéomique quantitative par la méthode SILAC. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 835-42.

NOUVELLE

Régulation cinétique de l'épissage alternatif des pré-ARN messagers : attention au ralentissement

Gwendal Dujardin¹, Alberto R. Kornblihtt², Laurent Corcos³

► Chez les eucaryotes, l'épissage alternatif est un mécanisme finement régulé qui permet d'accroître la complexité du protéome à partir d'un nombre limité de gènes. En effet, le nombre de gènes chez les vertébrés n'est pas drastiquement différent de celui qui est retrouvé chez les invertébrés (23 000 gènes chez l'homme, 19 000 chez le ver *C. elegans*). La fréquence de l'épissage alternatif augmentant des eucaryotes unicellulaires aux eucaryotes multicellulaires, celui-ci joue donc un rôle primordial dans la complexité des organismes. Chez les mammifères, l'épissage alternatif affecte presque 95 % des gènes [1]. La raison principale qui fait que l'épissage

puisse être alternatif est la force des sites bornant les exons en 5' et en 3', dictée par leur similitude à la séquence consensus, qui va déterminer leur affinité pour des facteurs d'épissage et leur utilisation par la machinerie d'épissage. On parle alors de sites forts et de sites faibles et, en règle générale, lorsqu'un site d'épissage est fort, l'épissage est constitutif. La position relative de sites forts ou faibles va entraîner différents types d'épissage alternatif : inclusion/exclusion d'exon, exclusion mutuelle d'exons, site d'épissage alternatif en 3' ou en 5' ou rétention d'intron (les promoteurs multiples et les sites multiples de polyadénylation n'étant pas

¹ Centre for Genomic Regulation, carrer Doctor Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain ;

² Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, C1428EHA Buenos Aires, Argentine ;

³ Inserm U1078 - équipe ECLA, Faculté de médecine, 22, avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest Cedex 3, France.

gwendal.dujardin@crgeu

ark@fbmc.fcen.uba.ar

laurent.corcos@inserm.fr

des événements d'épissage alternatif au sens strict). L'utilisation d'un site faible d'épissage est influencée à la fois par des éléments de régulation en *cis* et des facteurs *trans* qui se lient aux séquences *cis*-régulatrices, actives ou inhibitrices de l'épissage. Cependant, le taux d'inclusion d'un exon ne dépend pas seulement de la force de ses sites d'épissage, de la présence de séquences *cis*-régulatrices ou de la concentration, ou des modifications

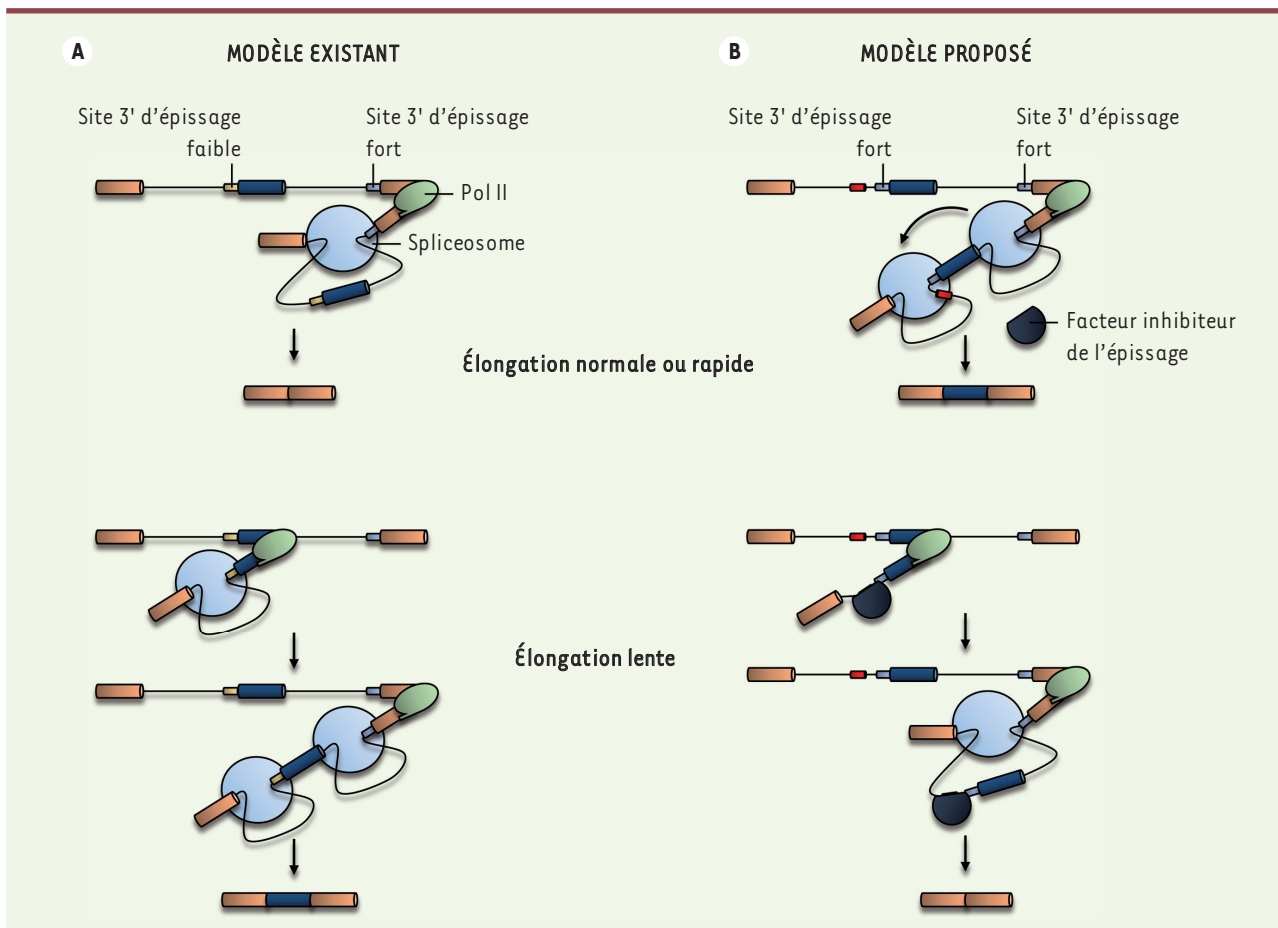


Figure 1. Effets opposés de l'élongation de la transcription sur l'épissage alternatif. **A.** Une élongation de la transcription rapide entraîne préférentiellement le recrutement de la machinerie d'épissage sur le site 3' d'épissage fort de l'intron en aval et non sur le site 3' d'épissage faible de l'intron en amont, induisant alors une exclusion de l'exon. Cependant, un ralentissement de l'élongation permet le recrutement du spliceosome au niveau du site 3' faible, permettant alors l'inclusion de l'exon. **B.** Lorsque les deux sites 3' d'épissage sont de force similaire et que l'intron en amont possède une séquence inhibitrice de l'épissage (en rouge), une élongation rapide entraîne un recrutement du spliceosome sur chacun des sites, suivant le modèle de la définition de l'exon, et l'inclusion de l'exon. Une élongation lente permettra au facteur d'épissage de reconnaître sa séquence cible avant que la définition de l'exon ait lieu, c'est-à-dire avant que la machinerie d'épissage ne soit recrutée au site 5' d'épissage entraînant une stabilisation du niveau du site 3' ; l'exon sera donc exclu.

post-traductionnelles d'un facteur d'épissage. En effet, l'épissage et l'épissage alternatif sont intimement couplés à la transcription. Ainsi des facteurs régulant la transcription peuvent également affecter l'épissage alternatif.

Couplage transcription-épissage

Les gènes codant pour les protéines sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II), donnant naissance aux pré-ARN messagers. Lors de l'élongation de la transcription, le pré-ARN messager en cours de synthèse est accessible à la machinerie d'épissage, ce dernier pou-

vant alors avoir lieu avant la terminaison de la transcription, donnant la possibilité d'un épissage co-transcriptionnel. La première démonstration d'un épissage co-transcriptionnel est venue des travaux de Beyer et Osheim, qui ont montré, par microscopie électronique, l'assemblage du spliceosome - un complexe multi-protéique orchestrant les réactions d'épissage - et le *looping* des introns sur le pré-ARN messager en cours de synthèse [2]. Depuis, de nombreuses études ont montré que l'épissage est essentiellement co-transcriptionnel, aussi bien chez la levure [3] que chez l'homme [4].

Plus que deux événements indépendants se déroulant au même instant et au même endroit, la transcription et l'épissage sont intimement coordonnés, l'un étant capable d'influer sur l'autre. Nous n'allons cependant discuter ici que du rôle de la transcription sur l'épissage, bien qu'il existe de plus en plus de preuves d'un rôle de l'épissage sur la transcription [5, 6]. Un des premiers et plus directs arguments mettant en lumière un rôle de la transcription sur l'épissage est venu de l'utilisation de différents promoteurs qui, placés en amont d'un même gène au sein d'un

plasmide, induisaient des profils d'épissage différents [7]. Depuis, outre la nature du promoteur, il a été montré que des facteurs de transcription, des co-activateurs et des *enhancers* transcriptionnels, des facteurs de remodelage de la chromatine ou des facteurs qui affectent la structure de la chromatine, pouvaient également modifier l'épissage alternatif [8]. Pour expliquer ce mécanisme de couplage entre la transcription par la Pol II et l'épissage alternatif, deux modèles, différents mais non exclusifs, ont été proposés : le modèle du recrutement de facteurs et le modèle cinétique.

Le modèle du recrutement

Dans ce premier modèle, le domaine carboxy-terminal (ou CTD) de la Pol II joue le rôle d'une plate-forme fixant des facteurs d'épissage, permettant alors une augmentation de la concentration de ces facteurs aux sites d'épissage, et influençant les décisions d'épissage. C'est notamment le cas de SRSF3 (*serine/arginine-rich splicing factor 3*, précédemment connu sous le nom de SRp20) qui, en raison de son interaction avec le CTD, peut moduler l'inclusion de l'exon 33 (ou EDI) du gène de la fibronectine [9].

Le modèle cinétique

Le second mécanisme par lequel la machinerie transcriptionnelle influence l'épissage alternatif est le modèle cinétique. Dans ce modèle, la vitesse d'élongation de la transcription par la Pol II va influencer les décisions d'épissage alternatif en modifiant la vitesse à laquelle les sites d'épissage, ainsi que les séquences régulatrices du pré-ARN messenger, vont être exposés à la machinerie d'épissage durant la transcription. Il a ainsi été démontré que des séquences induisant un ralentissement de la Pol II ou l'usage de molécules inhibant ou activant l'élongation de la transcription, entraînaient une modification de l'épissage alternatif [8]. Néanmoins, la preuve la plus tangible vient de l'utilisation d'un mutant

de la Pol II ayant une vitesse d'élongation réduite, à la fois *in vitro* et *in vivo*, due à une mutation au niveau du domaine catalytique. La transcription par ce mutant induit une augmentation de l'inclusion de l'exon EDI du gène codant pour la fibronectine [10]. Le site 3' d'épissage de cet exon étant faible, au contraire de celui de l'exon suivant, l'hypothèse émise afin d'expliquer ce phénomène est la suivante : lors d'une élongation normale ou rapide, les deux sites 3' d'épissage sont présentés simultanément à la machinerie d'épissage qui va préférentiellement « choisir » le site fort, ce qui entraînera une exclusion de l'exon alternatif. Au contraire, si l'élongation est lente, le site faible sera présenté avant le site fort et l'exon alternatif sera donc inclus (Figure 1). Il est aussi important de noter qu'une fois le site 3' d'épissage reconnu en tant que tel par la machinerie d'épissage, l'exon sera toujours inclus dans l'ARN mature ; peu importe l'ordre d'élimination des introns.

Augmentation de l'exclusion d'exons lors du ralentissement de la transcription : une extension du modèle cinétique

Par ailleurs, des molécules connues pour inhiber globalement l'élongation de la transcription, comme le DRB ou la camptothécine, ont été utilisées pour réaliser des études à haut débit de l'épissage alternatif [11]. Il a ainsi été montré qu'une majorité des exons alternatifs répondaient au modèle cinétique, mais également qu'une partie non négligeable d'exons se comportaient de manière opposée, l'usage de ces molécules induisant une augmentation de leur exclusion. Un lien direct entre cet effet sur l'épissage alternatif et le mécanisme d'action de ces molécules n'ayant pas été validé, nous avons cherché à savoir si un ralentissement de l'élongation pouvait effectivement induire une augmentation de l'exclusion d'exons alternatifs, et par quel mécanisme [12]. Ainsi, nous avons identifié

l'exon 9 du gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), dont les mutations sont associées à la mucoviscidose, comme un exon dont l'exclusion était augmentée lors d'un ralentissement de l'élongation. Cet exon nous a alors servi de modèle pour déchiffrer le mécanisme moléculaire mis en jeu. L'épissage de cet exon alternatif est sous le contrôle d'un polymorphisme en 3' de l'intron 8 qui est capable de recruter des facteurs inhibiteurs de l'épissage, induisant ainsi son exclusion de l'ARN mature. Nous avons montré qu'un ralentissement de l'élongation induisait un plus fort recrutement d'un de ces inhibiteurs, la protéine ETR-3, expliquant l'augmentation de l'exclusion de l'exon (Figure 1). Un ralentissement dans la synthèse du pré-ARN messenger entraînant un délai dans la stabilisation de la machinerie d'épissage de part et d'autre de l'exon (aussi appelée définition de l'exon), l'inhibiteur possédait alors plus de temps pour se fixer sur sa cible (la machinerie d'épissage et le facteur inhibant l'épissage étant en compétition).

Ce mécanisme s'applique à une nouvelle classe d'exons. En cela, il ne contredit pas le modèle cinétique, mais il en constitue une extension particulière. L'exclusion de l'exon 9 du gène *CFTR* est associée à une manifestation pathologique. La possibilité que d'autres exons essentiels soient soumis à une régulation de même nature mérite certainement de nouvelles investigations. ♦

Kinetic regulation of pre-messenger RNA alternative splicing

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Barash Y, Calarco JA, Gao W, et al. Deciphering the splicing code. *Nature* 2010 ; 465 : 53-9.
2. Beyer AL, Osheim YN. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev* 1988 ; 2 : 754-65.
3. Carrillo Oesterreich F, Preibisch S, Neugebauer KM. Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol Cell* 2010 ; 40 : 571-81.



RÉFÉRENCES

4. Ameur A, Zaghlool A, Halvardson J, *et al.* Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 1435-40.
5. Alexander RD, Innocente SA, Barrass JD, Beggs JD. Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Mol Cell* 2010 ; 40 : 582-93.
6. De Almeida SF, Grosso AR, Koch F, *et al.* Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 977-83.
7. Cramer P, Pesce CG, Baralle FE, Kornblihtt AR. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 11456-60.
8. Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, *et al.* Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013 ; 14 : 153-65.
9. de la Mata M, Kornblihtt AR. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat Struct Mol Biol* 2006 ; 13 : 973-80.
10. de la Mata M, Alonso CR, Kadener S, *et al.* A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 525-32.
11. Dutertre M, Sanchez G, De Cian MC, *et al.* Cotranscriptional exon skipping in the genotoxic stress response. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 1358-66.
12. Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, *et al.* How slow RNA polymerase II elongation favors alternative exon skipping. *Mol Cell* 2014 ; 54 : 683-90.

NOUVELLE

Comportement de peur : rôle des interneurons exprimant la parvalbumine du cortex préfrontal médian

Julien Courtin, Cyril Dejean, Cyril Herry

Inserm U862, neurocentre Magendie,
146, rue Léo Saignat, 33077 Bordeaux Cedex,
France.
cyril.herry@inserm.fr

► Les troubles anxieux représentent les pathologies psychiatriques les plus fréquentes avec une prévalence de l'ordre de 16 % dans la population mondiale [1]. D'un point de vue clinique, il est fondamental de mieux comprendre les circuits neuronaux et les mécanismes impliqués dans la régulation de ces pathologies dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Expérimentalement, les troubles anxieux - et en particulier les réponses émotionnelles de peur - peuvent être facilement modélisés chez le rongeur par l'utilisation du conditionnement auditif de peur ; celui-ci consiste à associer un stimulus sonore (le stimulus conditionnel) à un choc électrique léger délivré aux pattes de l'animal (le stimulus inconditionnel). Au cours du conditionnement, les animaux apprennent que le son est prédictif de l'occurrence du choc électrique. Par la suite, la présentation du seul son induit chez les animaux conditionnés un ensemble de réponses dont une réponse d'immobilisation (le *freezing*), qui est un indice de

la peur de l'animal et qui, de plus, est facilement quantifiable.

Circuits neuronaux impliqués dans les réponses émotionnelles de peur

Le modèle canonique des circuits neuronaux impliqués dans la régulation des réponses émotionnelles de peur indique que l'amygdale, une structure du lobe temporal médian, joue un rôle clé dans l'apprentissage du conditionnement de peur [2, 3]. Au contraire, le cortex préfrontal médian, et en particulier l'aire prélimbique, semble jouer un rôle fondamental dans l'expression de ces réponses à la suite de l'apprentissage [4]. En particulier, des lésions ou des inactivations de l'aire prélimbique bloquent l'expression des réponses émotionnelles de peur, et des modifications d'activité de certains neurones de cette aire, fortement corrélées à ces réponses comportementales, sont observées [4, 5]. Alors que le rôle de l'aire prélimbique dans l'expression des réponses comportementales de peur est bien établi, celui des différents types de neurones de

cette région, ainsi que les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'expression des réponses de peur, restent largement inconnus. Le cortex est composé de deux types principaux de cellules nerveuses, des cellules excitatrices de projection dont le neurotransmetteur principal est le glutamate, et des cellules inhibitrices, appelées interneurons, qui utilisent l'acide γ -aminobutyrique ou GABA comme neurotransmetteur. Les cellules excitatrices de projection contactent des régions distantes et vont permettre la transmission de l'information nerveuse à grande échelle. Les interneurons inhibiteurs, quant à eux, permettent notamment de réguler précisément l'activité de sortie des cellules excitatrices. De multiples classes d'interneurons inhibiteurs existent, dont les fonctions sont très diverses [6]. Parmi ces populations interneuronales, on distingue notamment des interneurons exprimant la parvalbumine (interneurons PV), qui contactent les cellules de projection excitatrices au niveau du corps cellulaire ou du segment initial de l'axone