

PML Nuclear Bodies

Introduction

Les corps PML sont des domaines associés à la matrice qui recrutent une étonnante variété de protéines. Depuis leur découverte dans les années 1960, les corps PML ont fasciné les biologistes cellulaires de part leur beauté et leurs étroites relations avec les désordres cellulaires. L'identification de PML, un gène impliqué dans une translocation chromosomale oncogénique, est identifiée comme la clé organisant ces domaines. Les différents niveaux de la régulation des corps PML par une modification post-transcriptionnel spécifique, la sumoylation, a aussi augmenté le nombre d'interactions non découvertes. Fonctionnellement, les corps PML peuvent séquestrer, modifier ou dégrader les protéines partenaires, mais certaines fonctions des corps PML restent encore une énigme.

Les corps PML sont des sphères de 0.1 à 1.0 μ m de diamètre, présents dans la plupart des lignées cellulaires et dans plusieurs tissus. Ils appartiennent à la matrice nucléaire, une superstructure du noyau mal défini proposé pour fixer et réguler plusieurs fonctions nucléaires, incluant la réplication de l'ADN, la transcription ou l'« epigenetic silencing ». (Sturman et al. 1990). La protéine PML est la clé organisant ces domaines qui recrutent un grand nombre de protéines, qui ont la plupart du temps une fonction de sumoylation. Les corps nucléaires PML sont régulés par le stress cellulaire, comme par exemple, les infections virales (Everett 2006), les dommages à l'ADN, la transformation (Koken et al. 1995) et le stress oxydatif (Yamada et al. 2001). De plus, la transcription de PML et de plusieurs de ses protéines partenaires est augmentée en présence d'interférons. Les souris *pml*^{-/-}, qui ne peuvent donc pas assembler ces corps nucléaires, se développent et vivent normalement, démontrant que les corps PML ne sont pas indispensables dans les fonctions biologiques basiques.

Vue historique

Comme pour plusieurs autres corps nucléaires, les corps PML ont été visualisés pour la première fois par microscopie électronique. Des travaux de plusieurs pionniers en microscopie électronique dans les années 1960 ont noté la présence d'objets sphériques denses (de Thé et al. 1960). Les corps PML sont ensuite visualisés plus tard par immunofluorescence, en utilisant un sérum auto-immun. Ceci permet l'identification du premier partenaire protéique des corps PML, SP100 (Szostecki et al. 1990), ainsi qu'une caractérisation initiale de leurs structures. Les corps PML recrutent un nombre important de protéine cellulaire (maintenant de l'ordre de 100), et une des plus étudiée est DAXX, un potentiel répresseur de la transcription et un modulateur de l'apoptose. Parmi toutes ces protéines, une a une fonction particulière, une protéine ressemblant à l'ubiquitine appelée SUMO, qui joue un rôle critique dans le recrutement des partenaires de PML, sachant que beaucoup d'entre eux sont sumoylés. De récentes études se sont focalisées sur certaines issues biologiques, comme la dynamique de ces corps (Chen et al, 2008), la relation avec les autres composants nucléaires (Russell et al. 2009), le mode d'assemblage (Shen et al. 2006)...

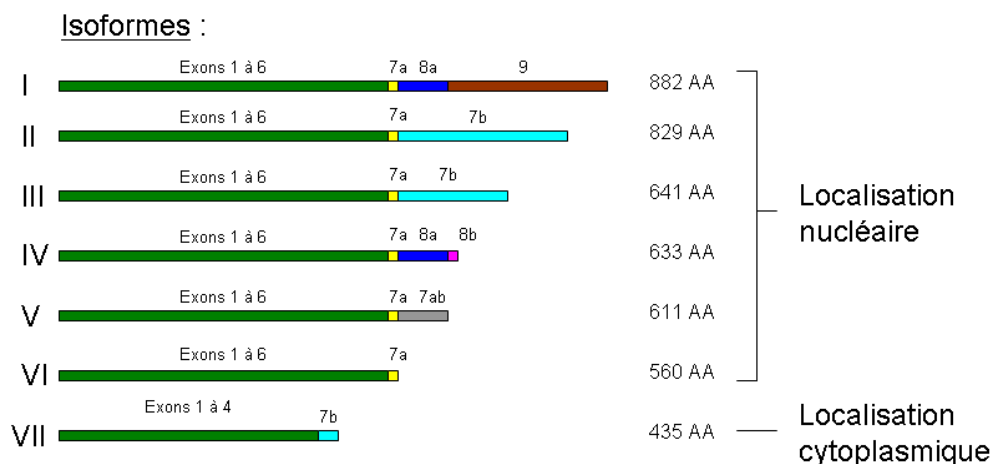
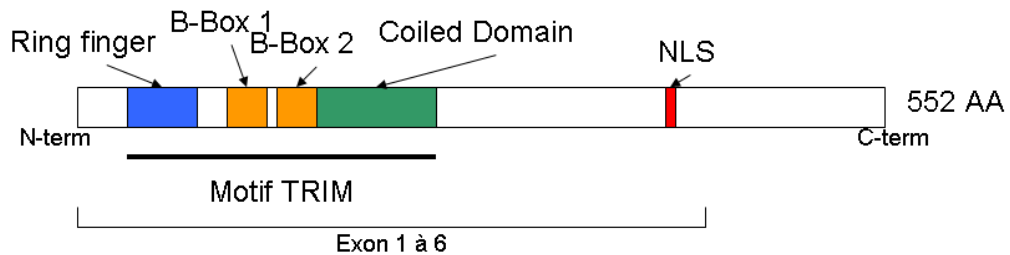
La protéine PML

PML est un membre de la famille protéique TRIM/RBCC, dont beaucoup des membres ont une ubiquitine ligase permettant la génération de structure sous-cellulaire auto-assemblé (Reymond et al. 2001). La transcription du gène *PML* est étroitement contrôlé par les interférons α/β ou γ , mais

Isoformes de PML	Localisation spécifique dans les cellules <i>pml</i> ^{-/-}
PML I	Nucléaire sous l'effet du stress, cytoplasmique
PML II	Fibrillaire/enveloppe nucléaire (lamine ?)
PML IV	Nucléaire sous l'effet du stress
PML V	Matrice nucléaire
PML VII	Cytoplasmique, endosomes précoces

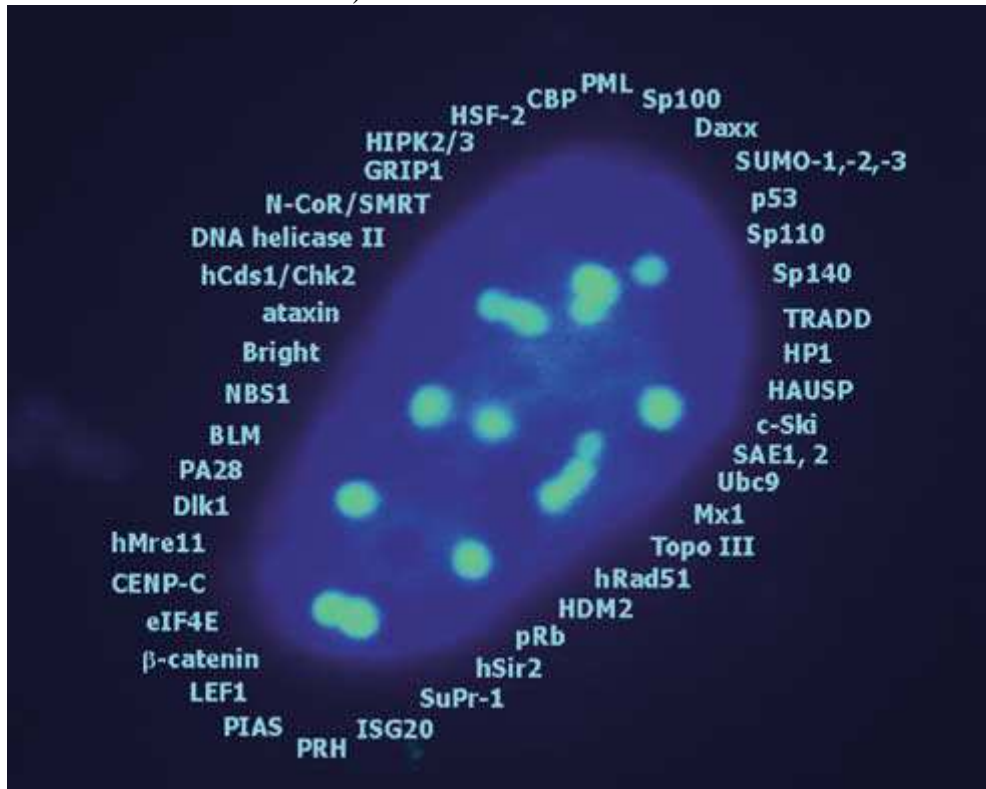
aussi par p53 (de Stanchina et al. 2004), lequel peut grandement augmenter le nombre et la taille des corps PML. Au niveau N-terminal se présente un doigt RING, qui se lie directement à SUMO E2 ligase UBC9 (Duprez et al. 1999), deux domaines semblables au RING, une B-Boxes et une bobine enroulée permettant une homodimérisation. La partie C-terminal de PML est soumise à un épissage alternatif générant différents isoformes (Jensen et al. 2001) (tableau). L'isoforme le plus abondant, PML I, arbore un domaine exonucléase III. En plus du signal de localisation nucléaire (NLS) présent sur tout les isoformes de PML, PML I possède un signal d'exportation nucléaire (NES), ce qui permet la navette de tout les isoformes de PML entre les deux compartiments via la formation d'hétérodimères (Condemine et al. 2006). L'isoforme le plus étudié est PML IV, qui induit la sénescence dans les fibroblastes primaires humain et l'apoptose dans beaucoup de ligné cellulaire, bien sur via l'activation de p53 (Guo et al. 2000).

PML subit de nombreuses modifications post-traductionnel, notamment des phosphorylations et des sumoylations. La sumoylation des PML a été mise en évidence dans la morphologie des corps nucléaires. Les kinases de dommage à l'ADN ou de stress comme ATM, ATR, CHK2, HIPK2, CK2 ou ERK phosphorylent les PML, pouvant ainsi réguler leur stabilité, leur biogénèse et les associations avec ses partenaires (Gresko et al. 2009), et contribuer à la réparation de l'ADN ou au contrôle de l'apoptose.



Plus qu'un simple corps !

Il est généralement assumé que les corps nucléaires PML désignent un objet unique. Cependant, il est évident que les corps PML sont divers. En effet, PML s'agrège sur différents sites pour créer un répertoire non suspecté de domaines en réponse à une variété de stress. Il faut aussi soulever le fait qu'environ 90% de PML est sous forme diffuse dans le noyau (Lallemand-Breitenbach et al. 2001).



Structure d'un corps PML classique

Le corps PML classique est un objet sphérique avec un diamètre de 0.1 à 1µm, lequel peut ou pas avoir un centre micro granuleux. Ces corps, de 5 à 15 par cellules, sont principalement de nature protéique et ne contiennent pas d'ARN ou d'ADN en général (Boisvert et al. 2000). PML forme l'extérieur du corps, et ses partenaires sont généralement à l'intérieur. Comme plusieurs autres corps, les PML se situent dans l'espace interchromosomique, expliquant ainsi le fait qu'ils se trouvent près des autres corps nucléaires (Russell et al. 2009). Bien que dépourvu d'ADN, les corps PML peuvent être associés avec quelques régions chromosomales spécifiques, comme la région du gène du CMH de classe 1, pour lequel PML est proposé pour moduler la structure de la chromatine et la transcription (Kumar et al. 2007). La structure des corps PML est profondément modifiée par la plupart des infections par virus. Ils peuvent par exemple accumuler les génomes viraux à leur périphérie ou en leur centre durant l'infection de cellules quiescentes (Everett et al. 2007).

Corps nucléaire PML, télomères et dommage à l'ADN

L'alternatif allongement des télomères (ALT-) associé aux corps nucléaires (APBs) est une large structure observée dans les lignées cellulaires qui n'expriment pas la télomérase et qui maintient la longueur des télomères par recombinaison homologue. APBs contient deux types de systèmes de réparation de l'ADN double brin et de facteurs de recombinaisons

homologues, le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 et Rad51/Rad52, avec en plus avec le facteur de réplication A (RPA), l'hélicase BLM et les facteurs liant les répétitions télomériques TRF1 et TRF2 (Wu et al. 2000 et 2003). Toutes ces protéines sont sumoylées, et PML est soupçonné de faciliter la sumoylation de tous ces facteurs.

Le rôle exact de PML dans les différents types de réparation de l'ADN reste flou. PML est soupçonné de recruter plusieurs protéines comme BLM, le complexe Mre11, WRN ou TOPBP1. Plusieurs de ces protéines sont localisées avec les PML lorsque la cellule n'est pas en condition de stress, tandis que d'autres le sont seulement lorsque l'ADN subit des dommages. De plus les cellules *pml*^{-/-} ont un taux très élevé d'échange de chromatine sœur, impliquant que PML régule quelques aspects de la recombinaison homologue (Zhong et al. 1999).

PML cytoplasmique

Tous les isoformes de PML possèdent un signal NLS. Cependant, parce que PML-I possède un signal d'exportation nucléaire, il se forme quelques corps cytoplasmique avec du PML. Les PML cytoplasmiques sont proposés pour réguler la signalisation de TGFβ en contrôlant l'association de Smad2/3 avec SARA ainsi que l'accumulation de SARA et du récepteur TGFβ dans les endosomes précoces (Lin et al. 2004).

Dynamique des corps nucléaire

Au niveau basal

Il a été montré que PML est un composant stable de ces corps, et que les partenaires protéiques sont plus mobiles, bien qu'ils soient transitoirement retenus par ces corps nucléaires. Les corps eux même ne sont pas très mobiles, bien que des phénomènes de fission et de fusion puissent être observés suivant la progression du cycle cellulaire. Sp100 fusionné à la GFP permet de mettre en évidence la présence de multiple autres corps, plus petits et mobiles que les corps PML (Muratani et al, 2002). Il a aussi été remarqué que les télomères vont rapidement à l'intérieur ou à l'extérieur des APBs, alors que le système PML reste immobile. Il faut cependant garder à l'esprit que ces expériences ont été réalisées en condition de transfection, et que tout les partenaires protéiques ne sont pas forcément connus, causé par les modifications post-traductionnel.

Analyse lors du cycle cellulaire

L'analyse du comportement de ces corps nucléaire met en évidence leur duplication par un mécanisme de fission lors de la phase S, ainsi que leur reformation lors de la transition de la phase M/G1. Lors de la mitose, les protéines PML restent agrégées, mais sont phosphorylées, deviennent de-sumoylées et libèrent leurs partenaires protéiques (Everett et al, 1999). Avant que la membrane nucléaire ne soit brisée lors de la pro-métaphase les corps PML perdent leur liaison avec la chromatine, ce qui augmente leur mobilité. Les PML sont associés avec la membrane nucléaire et la nucléosporine lors de la mitose, facilitant la formation de l'enveloppe nucléaire lors de la transition télophase/G1 (Jul-Larsen et al. 2009).

Est-ce que SUMO est la glue permettant la cohésion des corps PML ?

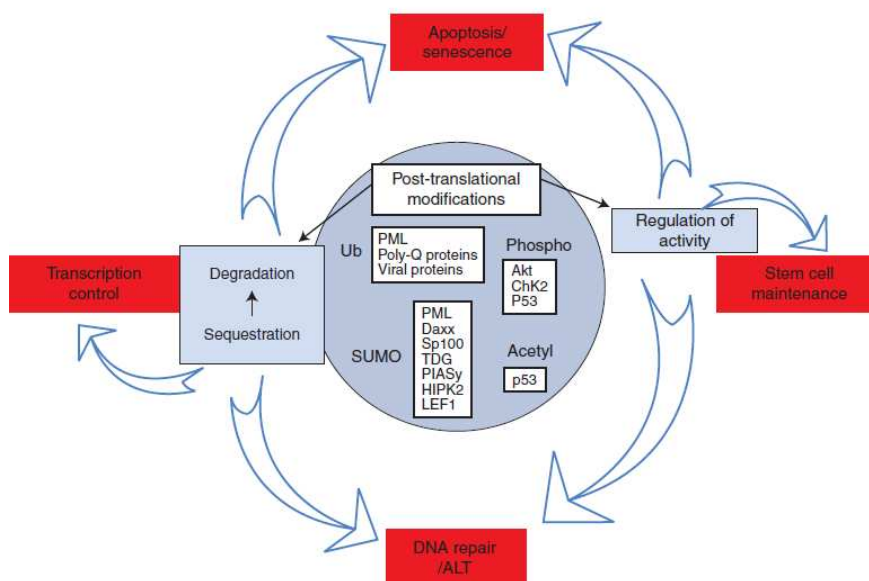
SUMO est conjugué aux protéines cibles à côté des chaînes de résidus de lysine, créant une branche de peptides, et changeant significativement les propriétés de liaison de la protéine. SUMO est aussi impliqué dans différentes voies de signalisation, principalement comme régulateur des interactions protéiques. SUMO conjugué peut interagir avec un petit motif, connu comme le motif d'interaction SUMO (SIM) (Hecker et al. 2006). SUMO-1 a été le premier identifié comme un partenaire des PML par un screen double hybride. PML est connu pour être sumoylé sur trois lysines (K) : la K65 sur le « doigt » RING, K160 dans la B1 Box et K490 dans le NLS. Les cellules déficientes en sumoylation (*Ubc9*^{-/-}) montrent un défaut de NB PML. De plus, parce que beaucoup de partenaires protéiques associés aux corps PML classiques sont sumoylés et que beaucoup d'entre eux contiennent aussi un motif SIM, l'interaction SIM/SUMO peut aussi tenir en compte, aussi bien pour le recrutement de partenaires que pour leur séquestration.

L'interaction SUMO/SIM était initialement proposée d'être à la base de la formation des PML et du recrutement de ces partenaires. Cependant, ce modèle a été mis à rude épreuve. En effet, il a mis en évidence que des isoformes spécifiques de PML ne possèdent pas le motif SIM dans les corps normaux (Weidtkamp-Peters et al. 2008). De plus, l'analyse de différentes protéines partenaires a montré que leur motif SIM est essentiel, alors que leur sumoylation est dispensable (non-indispensable) pour cibler les corps nucléaires (Cho et al, 2009). Pris ensemble, SIM/SUMO ne semble pas jouer un rôle fondamental dans l'agrégation des corps PML, mais pourrait jouer un rôle critique dans le recrutement des partenaires.

Quelles sont les fonctions des corps nucléaires ?

PML influence ou régule des processus clés comme la transcription, l'apoptose, la sénescence, la réponse aux dommages de l'ADN ou la résistance aux micro-organismes. Deux nouveautés ont émergé : le rôle protecteur de PML, DAXX et SP100 contre beaucoup d'infections virales, dans le cas où il n'y a pas de protéines virales qui perturbent les corps PML (Everett et al. 2006) et le rôle de PML dans les cellules normales ou cancéreuses (Regad et al, 2009).

Quelles sont les fonctions actuellement connues des PML ? Le modèle le plus couramment



accepté est que PML sert de glue : sa fonction majeure est de recruter et séquestrer ses partenaires à l'intérieur des corps nucléaires. Le recrutement de partenaires protéiques avec des enzymes, peut en principe, augmenter les modifications post-traductionnelles, activer la dégradation ou la séquestration.

Modifications post-traductionnel des partenaires

Bien sur, les modifications post-transcriptionnel les plus étudiées ont lieu sur le suppresseur de tumeur p53. Une belle découverte a été que les enzymes modifiant p53 (CBP, HDM2, HIPK2 et HAUPS) sont concentrées à l'intérieur des corps PML. L'augmentation de l'acétylation, sumoylation et phosphorylation à l'intérieur des corps PML apparaissent tous augmenter les fonctions de p53. Ce qui est cohérent avec le fait que les cellules *pml*^{-/-} présentent des déficiences à entrer en sénescence, alors que la surexpression de PML-IV déclenche la sénescence par une voie impliquant p53 et Rb (Bischof et al. 2005). La complexité des multiples mécanismes par lesquelles PML augmente la fonction de p53 reste encore non-clair, principalement parce que certaines études se contredisent.

Séquestration des partenaires

La séquestration ou « dépôt » était la première fonction proposée pour les corps PML (en 2001). Cette séquestration est rendue évidente par la relative accumulation des partenaires nucléoplasmique et associé au corps-PML, laquelle varie significativement entre les partenaires individuels et le niveau d'expression de PML, ainsi que par le niveau de sumoylation. Un partenaire bien étudié est DAXX, un répresseur puissant qui est réparti entre plusieurs protéines sumoylées, inclut PML et beaucoup de protéines de transcription. Dans tout les cas, DAXX, qui exerce des fonctions pro- ou anti-apoptotique, est un partenaire critique de PML impliqué dans beaucoup de ses propriétés (Maul et al, 2000).

Dégradation des partenaires

Plusieurs protéines instables ont été localisées dans les corps PML, où les protéines qui sont affaiblis s'agrègent avec PML, SUMO et l'ubiquitine (Yamada et al. 2001).