

La poly (ADP-ribose) polymérase : un facteur de survie

F. Javier Oliver Pozo
Guadalupe de la Rubia Sanchez
Claude Niedergang
Josiane Ménissier-de Murcia
Gilbert de Murcia

Afin de préserver l'intégrité du message génétique, la cellule a développé un ensemble de réponses spécifiques aux stress génotoxiques mettant en œuvre, en particulier, la transactivation de nombreux gènes par le suppresseur de tumeur p53. A côté de ce processus transcriptionnel inducible figure un autre mécanisme, très conservé dans l'évolution, qui implique une modification post-traductionnelle immédiate induite par les cassures présentes dans l'ADN : la poly (ADP-ribosylation). La poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) qui catalyse cette réaction, détecte et signale les interruptions du squelette sucre-phosphate dans l'ADN, et participe activement à la réparation par excision de bases (BER). Si l'ADN est trop endommagé, le clivage de la PARP par les caspases, survenant en même temps que celui d'autres enzymes de réparation et de protéines structurales nucléaires, empêche une réparation futile et assure l'irréversibilité du programme de mort cellulaire par apoptose.

L'exposition de la cellule eucaryote aux agents génotoxiques déclenche un ensemble de réponses physiologiques qui vont lui permettre de survivre en réparant fidèlement (ou non) les lésions dans l'ADN ou, au contraire, vont aboutir à l'élimination des cellules trop endommagées en ouvrant le programme de mort cellulaire par apoptose. Dans une logique de préservation de fonctions et donc d'ensembles cellulaires, ces mécanismes permettent d'éviter la fixation de mutations et leur transmission à la descendance.

La poly (ADP-ribosylation), modification post-traductionnelle covalente et transitoire des protéines nucléaires, constitue une réponse instantanée de la cellule eucaryote aux interruptions du squelette sucre-phosphate de

l'ADN. Elle est induite par les agents génotoxiques : radiations ionisantes, agents alkylants monofonctionnels (DMS, diméthyl sulfoxyde ; MMS, méthylméthane sulfonate ; MNU, méthylnitroso-urée), agents antitumoraux (cisplatine, bléomycine, streptozotocine) et dommages oxydatifs (pour revues voir [1-3]) (figure 1A). Le rôle biologique de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP, 113 kDa), enzyme catalysant la synthèse de poly ADP-ribose à partir du NAD⁺, est associé à tout processus biologique mettant en jeu des coupures produites, directement par les agents génotoxiques, ou secondairement par la réparation de l'ADN par excision de bases (BER, *base excision repair*) (m/s 1995, n° 10, p. 1487). Le caractère immédiat et le coût énergétique de la poly (ADP-ribosylation) sont les deux caractéristiques

ADRESSES

F.J. Oliver Pozo : *chercheur postdoctoral*. G. de la Rubia Sanchez : *chercheur postdoctoral*. Université de Grenade, Espagne. C. Niedergang : *ingénieur de recherche* à l'Université Louis-Pasteur. J. Ménissier-de Murcia : *directeur de recherche au Cnrs*. G. de Murcia : *directeur de recherche au Cnrs*. Cnrs UPR 9003, Laboratoire conventionné avec le CEA, École supérieure de biotechnologie de Strasbourg, boulevard Sébastien-Brant, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

TIRÉS À PART

G. de Murcia.

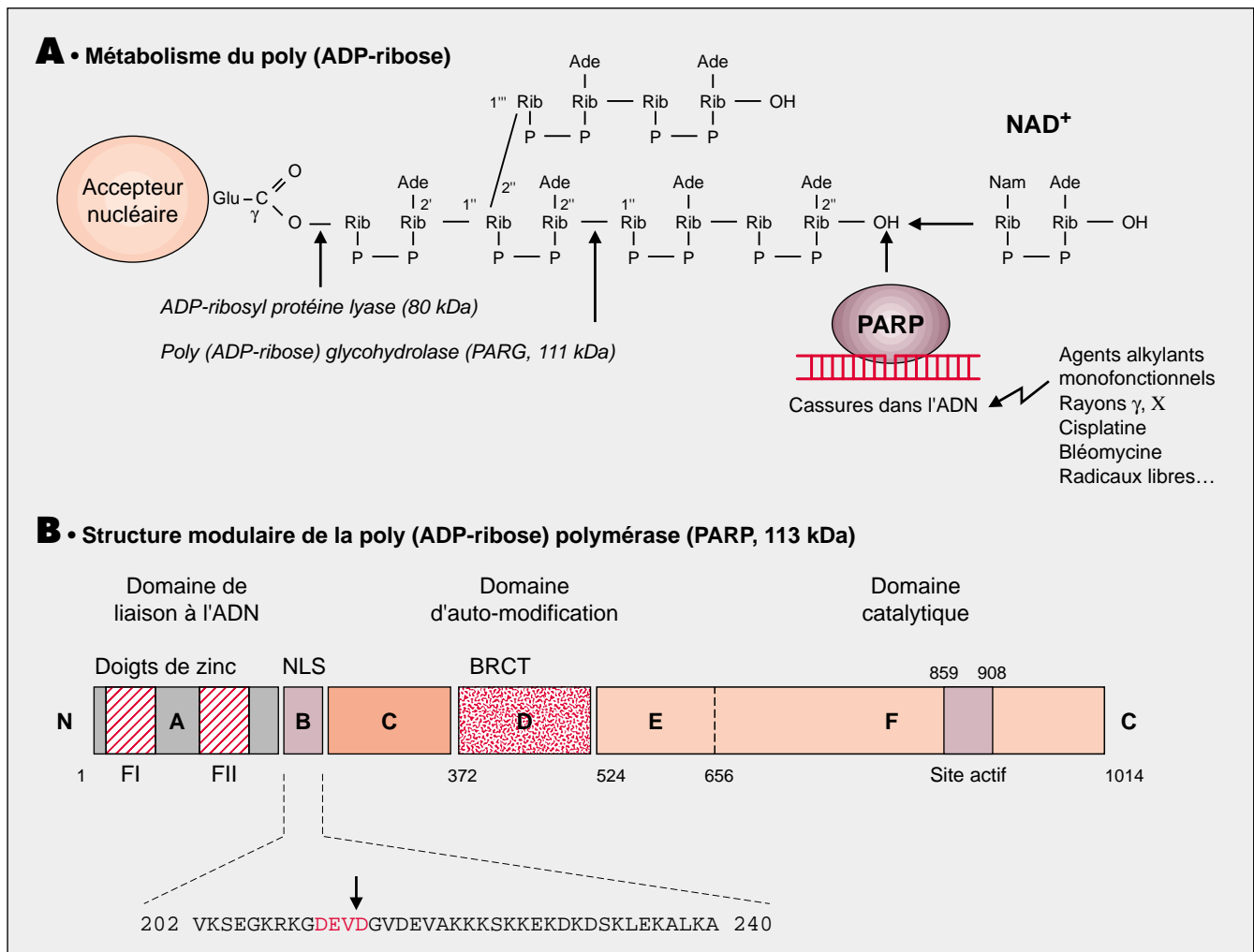


Figure 1. **Métabolisme du poly(ADP-ribose) et structure de la PARP, poly (ADP-ribose) polymérase humaine.** A. Synthèse et dégradation du poly (ADP-ribose) respectivement par la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) et la poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG), en réponse à l'introduction de cassures dans le génome par des agents génotoxiques. B. Représentation schématique des différents modules fonctionnels de la PARP humaine. Le signal de localisation nucléaire bipartite (acides aminés 202-240) contient le site de clivage 211DEV D214 de la PARP par la caspase-3.

fondamentales de cette réaction (*m/s* 1996, n° 11, p. 1269).

Ces dernières années, l'implication de la PARP dans la mort cellulaire par apoptose a suscité un très grand intérêt. Cet article fait la synthèse de nos connaissances actuelles sur l'implication de ce facteur de survie dans la réponse cellulaire aux *stress* génotoxiques.

La PARP, détecteur de cassures dans l'ADN

La PARP est une enzyme multifonctionnelle, dont l'activité s'exerce en présence de cassures dans l'ADN. Son abondance relative est liée à l'état prolifératif de la cellule. C'est une protéine basique de 113 kDa, associée

à la chromatine, très conservée au cours de l'évolution. Son étude structurale et fonctionnelle nous a permis d'identifier quatre modules, ayant chacun une fonction propre déjà répertoriée dans d'autres protéines multifonctionnelles [2] (*figure 1B*).

1. Le domaine amino-terminal, comprenant deux doigts de zinc (FI, FII), agit comme détecteur moléculaire d'interruptions simple brin dans l'ADN, quelle que soit la séquence nucléotidique [4]. Au niveau d'une cassure simple brin, la PARP induit une courbure dans l'ADN d'environ 100 degrés [5] permettant vraisemblablement la formation d'un dimère de PARP actif. La PARP partage avec l'ADN ligase III, enzyme impliquée

dans la voie de réparation BER, une homologie de séquence et une similitude de fonction (ciblage sur une cassure simple brin) contenue dans leurs régions amino-terminales respectives (acides aminés 1-97, doigt de zinc FI) (*figure 1B*).

2. Le module B contient un autre signal d'adressage: le signal de localisation nucléaire, bipartite [6] (acides aminés 202-240; *figure 1B*), renfermant en particulier la séquence consensus DXXD de reconnaissance des protéases apoptotiques et, en particulier, celui de la caspase-3 (*m/s* 1995, n° 10, p. 1487) (pour revue voir [7]).

3. Le domaine D contient les sites (acides glutamiques) d'autopoly (ADP-ribosylation) permettant une

régulation négative de l'activité PARP par automodification. En effet, la répulsion électrostatique qui s'exerce entre les charges négatives de l'ADN et celles du poly (ADP-ribose) entraîne le détachement de la PARP de l'ADN, et donc son inactivation. Ce domaine contient un motif BRCT (*breast cancer susceptibility protein, BRCA1, C-terminus*) décrit dans un nombre croissant d'enzymes et de facteurs impliqués dans la réparation, la réplication et le contrôle du cycle cellulaire [8]. Il joue ici un rôle essentiel dans la régulation des interactions entre la PARP et ses partenaires (hétéromodification).

4. La partie carboxy-terminale renferme le domaine catalytique (domaine F, 40 kDa) dont l'activité enzymatique basale (synthèse de polymères d'ADP-ribose) est stimulée (500 fois) après fixation de la PARP sur une cassure simple brin dans l'ADN. Le domaine catalytique – région la plus conservée au cours de l'évolution – qui contient en particulier une séquence (acides aminés 859-908) pratiquement identique de l'homme jusqu'à la plante *Arabidopsis thaliana*, constitue la crevasse catalytique (figure 1B). En effet, la résolution de la structure cristallographique du domaine F, en présence ou en l'absence d'un inhibiteur compétitif, a révélé que cette séquence, que l'on peut considérer maintenant comme « signature d'une activité PARP », contient la majeure partie du site actif (*m/s 1996, n° 11, p. 1269*) [9]. Il est constitué du motif structural: β - α -loop- β - α , et est en grande partie superposable au site actif des toxines à NAD⁺ qui catalysent la mono-ADP-ribosylation (toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae*, entérotoxine de *Escherichia coli*, exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, toxine pertussique de *Bordetella pertussis*). Ainsi donc, la PARP et les toxines catalysant la mono-ADP-ribosylation partagent un motif unique de liaison du NAD⁺, différent du *Rossmann fold* des déshydrogénases; elles constituent la superfamille des ADP-ribosyl transféras.

La PARP participe à la surveillance du génome

L'absence de lignées cellulaires et de syndrome humain associés à une

déficiance d'activité de poly-ADP-ribosylation a suscité le développement de plusieurs approches de génétique et de biologie moléculaire pour tenter de comprendre l'importance de cette fonction *in vivo*. Nous en rapportons brièvement ici les principales avancées (Tableau I).

1. L'expression d'ARN antisens du message de la PARP humaine dans des cellules HeLa, a montré que, lorsque l'on réduisait fortement le contenu cellulaire en PARP, la structure de la chromatine dans le noyau était affectée. De plus, la stabilité génomique et l'amplification de gènes augmentaient tandis que l'étape de ligation, au cours de la réparation de l'ADN induite par les agents alkylants, était fortement retardée [10].

2. Les deux fonctions de ciblage caractéristiques du domaine aminoterminal de la PARP, ciblage au noyau et détection de cassures dans l'ADN, ont été exploitées pour inhiber, dans des cellules en culture, la PARP endogène en surproduisant son propre domaine de liaison à l'ADN (régions A-C). Ce domaine exprimé dans des cellules HeLa ou CV-1 [11, 12] se comporte, dans des conditions de dommages, comme un mutant *trans*-dominant-négatif. Ces cellules traitées par des doses sublétales d'agents alkylants ou de radiation γ , présentent une forte réduction de la survie cellulaire, une

instabilité génomique (échanges de chromatides sœurs), un blocage du cycle cellulaire en G2/M et une induction de l'apoptose dans un contexte où p53 est non fonctionnelle (HeLa) [13]. Aucune sensibilisation n'est obtenue avec les UV-C. L'ensemble de ces résultats, souvent en accord avec ceux obtenus à l'aide d'inhibiteurs compétitifs comme le 3-aminobenzamide [14], indiquent que la PARP est un facteur important pour l'intégrité génomique lorsque la cellule subit des dommages intéressant la voie de réparation par excision de bases. La PARP a peu (ou pas) d'effet sur les mécanismes de réparation par excision de nucléotides (NER, *nucleotide excision repair*) qui, par ailleurs, ne l'activent pas.

La production, par recombinaison homologue, de souris déficientes en PARP a certainement représenté une étape décisive dans la compréhension de son rôle physiologique. Différentes stratégies d'inactivation du gène *PARP* ont été mis en œuvre chez la souris. Les souris *PARP*^{-/-} sont viables et fertiles; les premiers phénotypes décrits, obésité et hyperplasie de la peau [15], n'ont pas été vérifiés dans les deux autres constructions [16, 17]. Quoiqu'il en soit, un consensus semble se dégager depuis peu [18] pour reconnaître l'extrême sensibilité des souris *PARP*^{-/-} aux radiations γ (figure 3). Elles présentent en particulier une très forte radio-

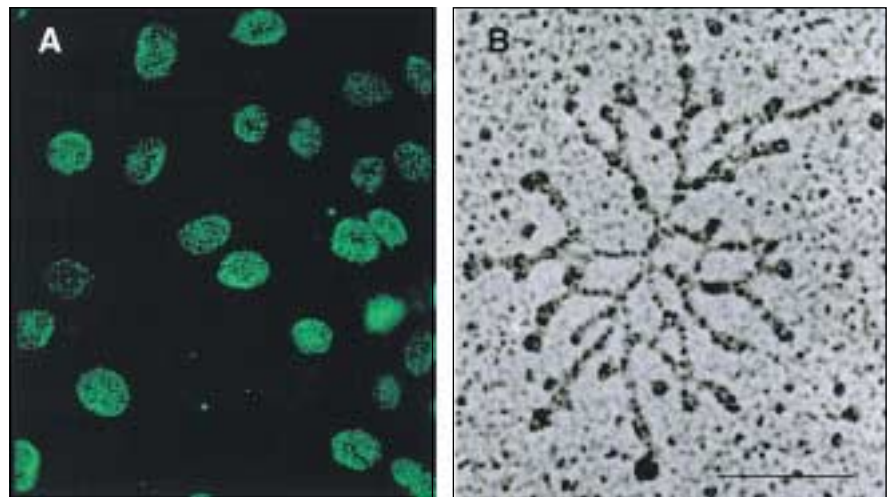


Figure 2. La poly-ADP-ribosylation est une réponse cellulaire immédiate aux dommages dans l'ADN. A. Visualisation par immunofluorescence de la synthèse de poly (ADP-ribose) induite par l'exposition de cellules Cos7 à 0,7 mM H₂O₂ pendant 10 minutes. B. Visualisation par microscopie électronique de la structure branchée du poly-ADP-ribose, après automodification *in vitro* de la PARP purifiée. La barre représente 100 nm.

Tableau I

LES DIFFÉRENTES APPROCHES EXPÉRIMENTALES
UTILISÉES POUR L'ÉTUDE FONCTIONNELLE
DE LA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMÉRISE

| Approche expérimentale | Résultats | Références |
|---|---|------------|
| Expression d'ARN antisens <i>dans les cellules HeLa</i> | Morphologie cellulaire et structure de la chromatine altérées. Après traitement par MMS (méthylméthane sulfonate), délai de séparation des cassures dans l'ADN, survie cellulaire réduite organisation de la chromatine altérée. | [10] |
| Mutant <i>trans</i>-dominant négatif <i>(DNA binding domain)</i> | Survie réduite après irradiation γ et traitement par le MNNG (N'-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). Augmentation de l'amplification de l'ADN de SV40 induite par MNNG. | [11] |
| <i>Expression transitoire ou constitutive dans des cellules de mammifères</i> | Inhibition de la réparation par excision de bases (BER) induite par les alkylants. Pas d'effet sur la réparation par excision de nucléotides (NER) induite par les UV. | [12] |
| <i>Expression transitoire ou constitutive dans des cellules de mammifères</i> | Hypersensibilité au MNNG, temps de doublement augmenté, survie cellulaire réduite, induction de l'apoptose, échanges de chromatides sœurs (SCE) augmentés, accumulation en phase G2/M. Absence de sensibilité aux UV. | [13] |
| Lignées cellulaires déficientes en activité PARP (mutagenèse au hasard) <i>Lignées cellulaires de hamster</i> | Temps de doublement prolongé, SCE spontanés augmentés. Survie réduite aux agents alkylants. | [33, 34] |
| <i>Lignées cellulaires de souris</i> | Temps de doublement prolongé et thermosensibilité augmentée. | [35] |
| Souris PARP knock-out <i>KO1 (interruption de l'exon 2)</i> | Obésité chez 50% des femelles <i>PARP</i> ^{-/-} , hyperplasie de la peau. Diminution de la prolifération des fibroblastes et des thymocytes après irradiation γ . BER et NER non affectés. | [15] |
| | SCE augmentés, formation de micronoyaux après traitement par MMC (mitomycine C) et irradiation γ . Apoptose induite par Fas et TNF- α non affectée. | [18] |
| <i>KO2 (interruption de l'exon 4)</i> | Hypersensibilité et instabilité génomique après exposition au MNU (N-méthyl-N-nitroso-urée), rayonnement γ et camptothécine. Radiotoxicité aiguë au niveau du duodénum. Sensibilité des splénocytes <i>PARP</i> ^{-/-} aux alkylants, accumulation en G2/M, forte induction de l'apoptose par les alkylants MNU (méthyl-nitroso-urée), MMS (méthylméthanesulfonate). | [16] |
| | Retard de la croissance cellulaire, instabilité chromosomique et sévère défaut dans la réparation de l'ADN dans les fibroblastes embryonnaires de souris traitées par le MMS. Formation de micronoyaux après traitement par MMS. Apoptose induite par Fas et TNF- α non affectée. | [36] |
| <i>KO3 (interruption de l'exon 1)</i> | Survie réduite de cellules ES <i>PARP</i> ^{-/-} après traitement par MMS (méthylméthane sulfonate) et irradiation γ . | [17] |

sensibilité du tractus gastro-intestinal (duodénum) et meurent 3 à 5 jours après une irradiation totale de 8 Gy. Notre équipe a pu également démontrer une hypersensibilité des souris

PARP^{-/-} aux agents alkylants monofonctionnels [16].

Au niveau cellulaire, on retrouve une forte instabilité génomique (échanges de chromatides sœurs – SCE, *sister*

chromatid exchange – cassures chromosomiques et chromatidiennes) induite par les agents alkylants et radiations γ , reflétant un profond défaut de réparation comme le démontre incontestablement

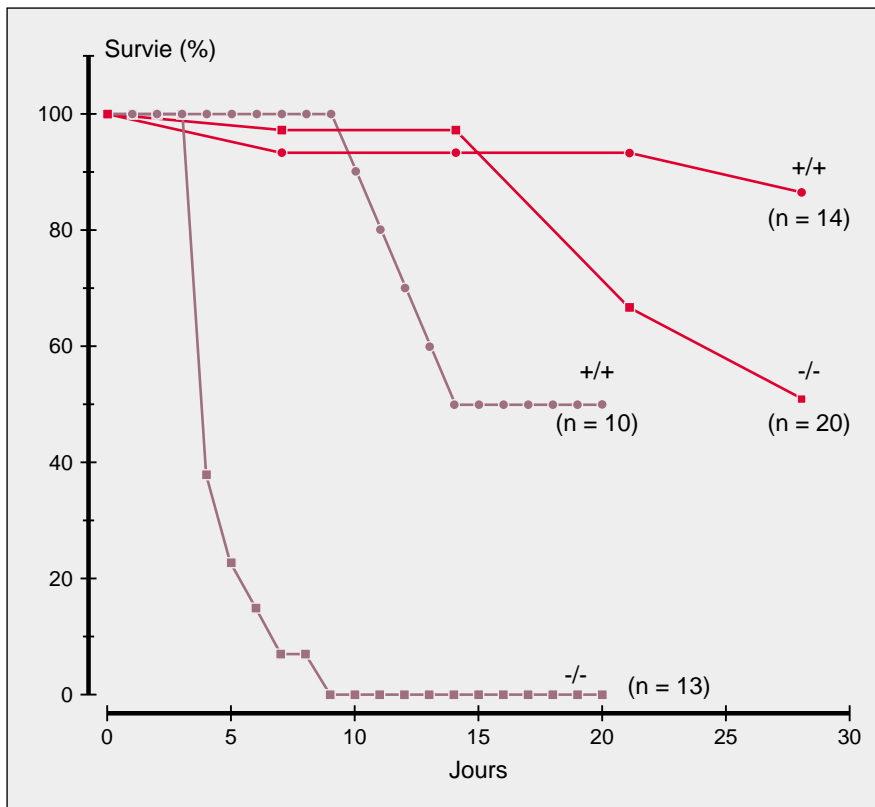


Figure 3. **Radiosensibilité des souris PARP^{-/-}.** Survie des souris PARP^{+/+} (cercles) et PARP^{-/-} (carrés) après une irradiation totale au rayonnement γ de 8 Gy à l'âge de 6-8 semaines (courbes bistres) ou après une irradiation à 4 Gy à l'âge de 6 jours (courbes rouges).

blement l'essai « Comète », mesurant les cassures dans l'ADN dans des fibroblastes embryonnaires dérivés des souris PARP^{-/-}, traités par un agent alkylant monofonctionnel (MMS) [36]. La déficience (apparente) dans l'étape de ligation pourrait elle-même refléter un défaut important dans la synthèse réparatrice de l'ADN. Cela reste maintenant à démontrer.

On le voit donc, le modèle murin PARP^{-/-} récapitule une grande partie des phénotypes déjà observés au cours des diverses approches décrites plus haut. Il permet de démontrer pour la première fois, et de façon non ambiguë, l'implication de cette enzyme dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision de bases.

Les partenaires de la PARP participent à la réparation par excision de bases et à la réplication de l'ADN

Pour mieux comprendre le rôle de la PARP *in vivo*, nous avons recher-

ché ses partenaires à l'aide du crible génétique du double hybride chez la levure *S. cerevisiae*. L'un des partenaires identifié, XRCC1, était déjà connu comme facteur de correction de l'instabilité génomique (échanges de chromatides sœurs) dans les cellules de rongeur EM9 [19]. L'interface d'interaction avec la PARP se fait par les acides aminés 314-403 de XRCC1, région renfermant un motif BRCT [8]. Réciproquement, XRCC1 interagit avec le domaine A et le domaine D de la PARP, ce dernier contenant également un module BRCT (figure 1B). Cette interaction règle négativement l'activité PARP *in vitro* et *in vivo* [37]. De plus, XRCC1 interagit avec deux autres partenaires essentiels de la voie de réparation par excision de bases: (1) l'ADN ligase III; dans ce cas, l'interaction entre les deux protéines est également relayée par des modules BRCT situés dans leurs régions carboxy-terminales respectives [20]; (2) l'ADN polymérase β , le contact se faisant par la région

amino-terminale de XRCC1. Des travaux récents indiquent que XRCC1 limite le déplacement de brin excessif dans la réaction de resynthèse au cours de la réparation BER [21]. En interagissant avec trois partenaires, PARP, ADN polymérase β et ADN ligase III, XRCC1 apparaît capable de coordonner la fonction des différents acteurs essentiels du BER. Il est important de souligner que deux d'entre eux, XRCC1 et ADN polymérase β , sont des enzymes essentielles au développement embryonnaire.

Dans ce complexe multi-enzymatique, la PARP jouant le rôle de détecteur de cassures dans l'ADN pourrait recruter immédiatement XRCC1, d'une part pour protéger les extrémités du brin d'ADN interrompu et, d'autre part, pour attirer sur le site même du dommage les autres partenaires (l'ADN polymérase β puis l'ADN ligase III) – essentiels pour achever la réaction de réparation. Par le jeu des motifs de ciblage (doigts de zinc) et des interactions entre partenaires (modules BRCT), ce complexe aurait ainsi une grande efficacité d'intervention, de recrutement et de coordination dans une des voies de réparation de l'ADN, BER [22].

Par ailleurs, une association directe entre PARP et la sous-unité catalytique p180 de l'ADN polymérase α primase a également été observée par plusieurs laboratoires. Cette interaction, relayée par le domaine amino-terminal de la PARP (doigts de zinc), est maximale au cours de la phase S. Elle suggère que l'appareil répliatif des eucaryotes supérieurs s'est doté d'un mécanisme de détection de cassures dans la matrice en cours de réplication, permettant d'arrêter sa progression en cas de dommages et de procéder à leur nécessaire réparation [23]. La PARP, interagissant par ailleurs avec les composants du BER, accroîtrait ainsi la cinétique de réparation avant que la machinerie de réplication, en attente, ne se désassemble. Ce scénario expliquerait l'abondance relative de la PARP au cours de la phase S et dans les cellules qui prolifèrent. En accord avec ce modèle, il faut remarquer que la capacité de réplication des cellules PARP^{-/-} endommagées est diminuée par rapport à celle des cellules de type sauvage [23].

Quelle est la signification biologique du clivage de la PARP lors de l'apoptose ?

Les diverses approches expérimentales, développées ces dernières années pour tenter de comprendre le rôle biologique de la PARP, ont conduit invariablement les recherches vers le concept d'élément du réseau de surveillance du génome couplé à la division cellulaire. La PARP répond en effet aux caractéristiques d'une protéine participant au « point de contrôle » (*checkpoint protein*) du passage S → M. Ayant une structure modulaire, elle possède un élément de détection de cassures dans l'ADN, et un système d'amplification/signalisation de ces cassures. On peut en effet considérer que la synthèse de poly (ADP-ribose) traduit et amplifie un signal émanant d'une interruption dans l'ADN signifiant à la cellule la persistance de régions non répliquées (car non réparées). Ce message pourrait être transmis au régulateur-clé de la mitose, le complexe MPF (*mitose promoting factor*) via une cascade impliquant un jeu de kinases et de phosphatases (*wee1*, *cdc25*) aboutissant finalement à l'inhibition de la kinase dépendante de la cycline B $p34^{cdc2}$ interdisant la mitose [24], tant que le signal (synthèse de poly ADP-ribose) est émis. Un arrêt prolongé du programme de division cellulaire déclencherait l'apoptose à partir de ce point de blocage du cycle. A l'appui de ce modèle, il faut remarquer que l'abondance (naturelle) du polymère, de même que l'activité de la glycohydrolase, sont maximales au cours de la phase G2/M du cycle.

Ce rôle de la PARP, facteur de survie et garant de l'intégrité du génome, apparaît donc totalement incompatible avec le processus de dégradation de l'ADN par les nucléases apoptotiques. L'implication de la PARP dans l'apoptose a fait l'objet de nombreuses controverses. Le débat a porté en particulier sur son rôle, passif ou actif, précoce ou tardif, dans le déroulement du processus de mort cellulaire. De plus, la consommation de NAD^+ (et donc d'ATP) accompagnant la dégradation de l'ADN génomique est supposée contribuer à la mort cellulaire [25]. Le clivage par les caspases [26], coupant la PARP au milieu de son signal de

localisation nucléaire, est sensé produire deux fragments, non nucléaires (de 23 kDa et 85 kDa), ayant respectivement conservé leur activité propre de liaison à l'ADN et de synthèse de polymère d'ADP-ribose (niveau basal).

Le modèle murin déficient en PARP nous a permis d'évaluer l'importance de l'activité PARP dans le processus apoptotique. Comme le montre la *figure 4A*, l'hypersensibilité aux agents alkylants de cellules de la moelle osseuse (mais aussi de thymocytes ou de splénocytes) dérivés des souris $PARP^{-/-}$ s'accompagne d'une apoptose massive, spécifique des agents endommageant l'ADN et activant la voie BER. L'accumulation de p53 traduit ici la persistance de dommages non réparés (*figure 4B*). Cette expérience démontre que l'accumulation de p53 est indépendante de la présence de la PARP et/ou

de son activité; de plus, l'apoptose massive observée dans les cellules $PARP^{-/-}$ après dommages, a lieu ici sans consommation de NAD^+ puisque, par définition, la PARP est absente dans ce contexte. Ajoutons, enfin, que les cellules $PARP^{+/+}$ et $PARP^{-/-}$ sont, de manière équivalente, sensibles à d'autres effecteurs d'apoptose comme l'anticorps anti-CD95 (Fas/Apo-1), le $TNF\alpha$ ou la dexaméthasone. Pour évaluer l'importance du clivage de la PARP qui survient dans la phase exécutoire du programme de mort cellulaire, nous avons construit, et surproduit transitoirement dans des fibroblastes $PARP^{-/-}$, un mutant non clivable portant la mutation D214A. L'ADNc codant pour la PARP de type sauvage (wt) a été transfecté à l'aide du même vecteur d'expression dans ces cellules, comme témoin. L'apoptose est alors

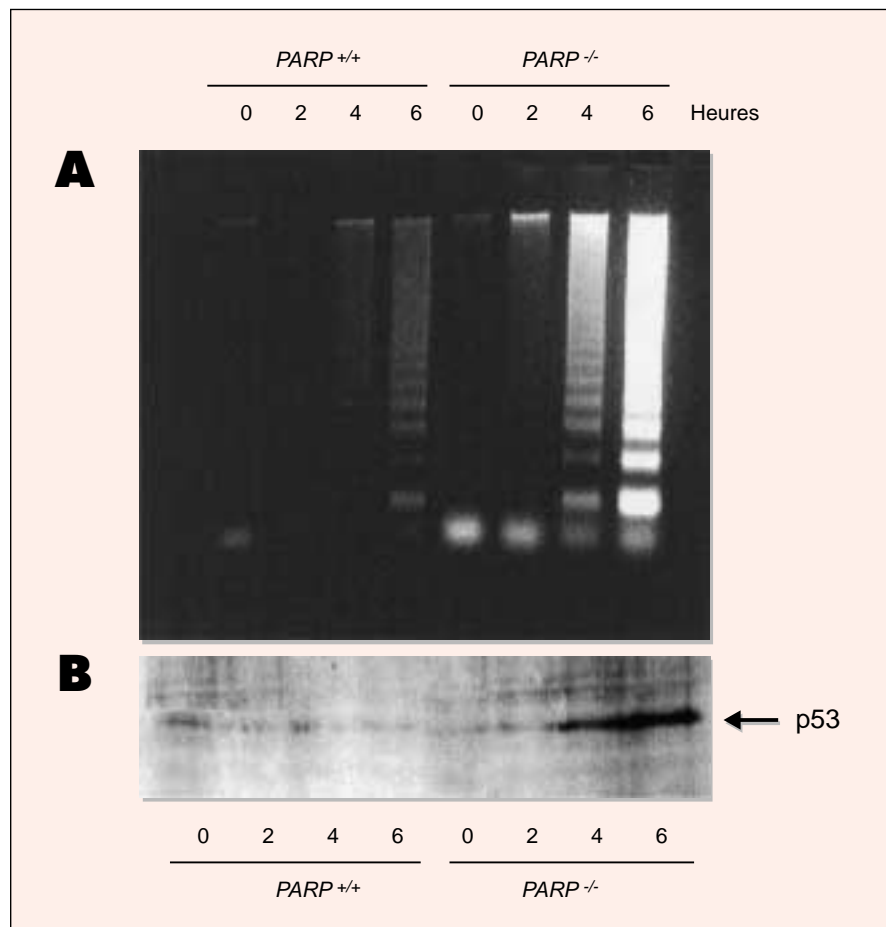


Figure 4. L'absence de PARP sensibilise la cellule aux agents génotoxiques. **A.** Réponse apoptotique induite (relevée par une « échelle d'ADN ») dans les mastocytes provenant des souris $PARP^{+/+}$ et $PARP^{-/-}$ traités par 2 mM de méthylnitroso-urée. **B.** Accumulation de p53 dans ces mêmes cellules traitées par le même agent alkylant.

induite en traitant ces cellules, soit par un agent alkylant (MMS), soit par un anticorps anti-CD95 (n'activant pas la PARP). Les résultats obtenus indiquent que l'on peut restaurer la viabilité des cellules *PARP*^{-/-} traitées par un alkylant, en réintroduisant la PARP wt. De la même manière, le mutant PARP non clivable, D214A, corrige l'hypersensibilité, mais introduit un léger délai dans le déroulement du programme de mort cellulaire. Dans le cas où l'inducteur d'apoptose est l'anti-CD95 la réintroduction de la PARP wt ne restaure pas la viabilité. En revanche, le mutant D214A retarde la mort cellulaire. Ces expériences démontrent clairement que : (1) dans les cellules déficientes en PARP, la mort cellulaire spécifiquement induite par les agents endommageant l'ADN est bien due à l'absence de PARP ; (2) ce processus, dépendant de p53, ne met pas en jeu une consommation de NAD⁺ ; (3) le non-clivage de la PARP procure un gain de survie, apparent seulement, mais n'empêche pas l'apoptose d'aller à son terme. Le délai important observé (près de 10 heures) éclaire de manière inattendue l'importance de la PARP dans l'organisation de la chromatine dans le noyau [23]. Un tel délai dans l'apoptose a déjà été noté après introduction d'un mutant non clivable de la lamine A ou B [27], la lamine B étant précisément l'une des protéines ADP-ribosylées *in vivo*.

Conclusions et perspectives

En résumé, la PARP ne semble pas prendre une part active dans le processus apoptotique qui est déclenché, dans le cas d'agents génotoxiques, non pas par une déplétion en énergie, mais sans doute par la persistance de lésions non réparées. La PARP est un facteur de survie clivé par les caspases, en même temps que bien d'autres « victimes » participant à la maintenance de l'intégrité du génome, à sa réplication (ADN-PKc, Rb, RF-C, *replication factor C*), ou à l'architecture du noyau (lamines A, B₁, B₂, C). Il est clair que ce clivage rend irréversible la phase d'exécution de l'apoptose [28] (figure 5).

Un tout autre scénario semble prévaloir dans des situations lésionnelles aiguës (ischémie cérébrale, ischémie cardiaque, choc septique, inflammation) lors desquelles le cycle cyto-

toxique déclenché par la production massive de NO par la NO synthase inductible (iNOS), conduisant à la formation d'un oxydant puissant, le per-oxy-nitrite (ONOO⁻), va, en particulier, induire des cassures dans l'ADN et donc suractiver la PARP. Dans ces conditions, la consommation excessive de NAD⁺ et d'ATP engendre la mort cellulaire par nécrose. Le processus de clivage de la PARP au cours de la nécrose diffère totalement de celui observé lors de l'apoptose. De plus, le temps au cours duquel l'enzyme reste active (car intacte) semble être plus long (3 h-48 h) [29], entraînant sans doute une amplification dramatique du mécanisme. Une série d'articles récents des groupes de Snyder [30], Moskowitz [31] et Szabo [32] indiquent clairement que l'invalidation du gène codant pour la PARP ou l'inhibition pharmacologique de son activité par le 3-aminobenzamide, permettent de limiter de façon spectaculaire les effets liés à l'inflammation. Il y aurait donc maintenant au moins deux « bonnes » raisons d'investir dans la génération d'inhibiteurs spécifiques de l'activité PARP : (1) dans le

traitement de cellules tumorales par chimio- ou radiothérapies, on connaît depuis longtemps l'effet de potentialisation des analogues du nicotinamide sur la cytotoxicité des agents antitumoraux, activateurs de la PARP [14] ; (2) dans les maladies entraînant une réponse inflammatoire aiguë, les auteurs anticipent sur l'effet « protecteur » immédiat de ces inhibiteurs pour limiter, par exemple, les conséquences à long terme de l'ischémie focale cérébrale et des dommages neurologiques qui en résultent. Mais comment être sûr que, dans ce cas, le bénéfice immédiat l'emportera systématiquement sur le développement d'un éventuel cancer ? ■

Remerciements

Nous remercions toute l'équipe PARP : V. Rolli, C. Trucco, F. Dantzer, M. Masson, E. Flatter et V. Schreiber dont les travaux ont permis d'illustrer certains aspects de cet article. Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'Association pour la recherche contre le Cancer, la Ligue contre le Cancer, Électricité de France, le Commissariat à l'Énergie Atomique, le Cnrs (ACC-SV Radiations ionisantes) et la Fondation pour la Recherche Médicale.

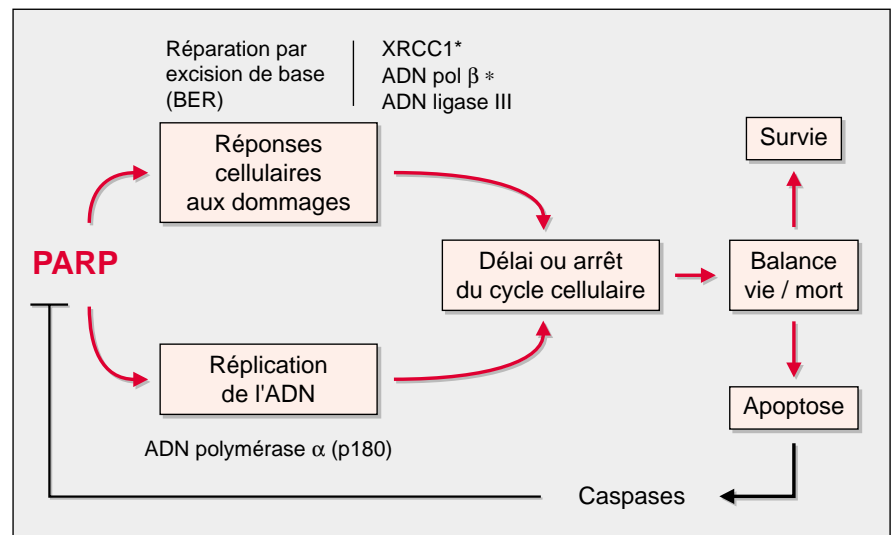


Figure 5. **La PARP relie le réseau de surveillance du génome à l'appareil réplcatif.** La connexion de la PARP avec les enzymes de la voie de réparation par excision de bases (BER), d'une part, et avec l'appareil réplcatif (ADN polymérase α-primase), d'autre part, fait dépendre l'avancement de la fourche de réplication de la résolution de dommages présents dans la matrice. Un délai ou un arrêt prolongé de la réplication va affecter la progression dans le cycle cellulaire qui à son tour va influencer le devenir de la cellule : (1) la survie est possible après que le génome a été réparé ; (2) la cellule étant trop endommagée, l'option qui s'impose alors est l'apoptose, elle s'accompagne du clivage par les caspases, de la PARP et d'autres enzymes de réparation, empêchant ainsi toute réparation futile et rendant irréversible la phase d'exécution de l'apoptose.

RÉFÉRENCES

- Althaus FR, Richter C. ADP-ribosylation of proteins. *Enzymology and biological significance. Mol Biol Biochem Biophys* 1987; 37: 12-37.
- De Murcia G, Menissier-de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 172-6.
- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M. The role of poly ADP-ribosylation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1997; 131: 4135-7.
- Ménissier-de Murcia J, Molinete M, Gradwohl G, Simonin F, de Murcia G. Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase participates in the recognition of single strand breaks in DNA. *J Mol Biol* 1989; 210: 229-33.
- Le Cam E, Fack F, Ménissier-de Murcia J, et al. Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *J Mol Biol* 1994; 235: 1062-71.
- Schreiber V, Molinete M, Bœuf H, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J* 1992; 11: 3263-9.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53: 3976-85.
- Callebaut I, Mornon JP. From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Lett* 1997; 400: 25-30.
- Ruf A, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE. Structure of the catalytic fragment of poly (ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7481-5.
- Ding R, Pommier Y, Kang V, Smulson M. Depletion of poly (ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. *J Biol Chem* 1992; 267: 12804-12.
- Küpper JH, Müller M, Jacobson M, et al. Trans-dominant inhibition of poly (ADP-ribosylation) sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3154-63.
- Molinete M, Vermeulen W, Burkle A, et al. Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J* 1993; 12: 2109-17.
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, et al. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery and chromosome stability following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 11: 4753-7.
- Shall S. ADP-ribose in DNA repair: a new component of DNA excision repair. *Adv Rad Biol* 1984; 11: 1-69.
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 1995; 9: 509-20.
- Menissier-de Murcia J, Niedergang C, Trucco C, et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7303-7.
- Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, et al. Function of poly (ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* 1998 (sous presse).
- Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 1997; 11: 2347-58.
- Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA, Carrano AV. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6160-71.
- Nash RA, Caldecott K, Barnes DE, Lindahl T. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 1997; 36: 5207-11.
- Kubota Y, Nash RA, Klungland A, et al. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J* 1996; 15: 6662-70.
- Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 391-7.
- Dantzer F, Nasheuer HP, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase α -primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1891-8.
- Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 1994; 79: 547-50.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687-9.
- Earnshaw WC. Apoptosis: lessons from *in vitro* systems. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 217-9.
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996; 135: 1441-55.
- Casciola-Rosen L, Nicholson D, Chong T, et al. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996; 183: 1957-64.
- Shah GM, Rashmani GS, Poirier G. Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 838-44.
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir A, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 1997; 3: 1089-95.
- Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 1143-51.
- Szabo C, Virag L, Cuzzocrea S, et al. Protection against peroxynitrite-induced fibroblasts injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3867-72.
- Chatterjee S, Petzold SJ, Berger SJ, Berger NA. Strategy for selection of cell variants deficient in poly(ADP-ribose) polymerase. *Exp Cell Res* 1987; 172: 245-57.
- Witmer M, Aboul-Ela N, Jacobson M, Stamato T. Increased sensitivity to DNA-alkylating agents in CHO mutants with decreased poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Mut Res* 1994; 314: 249-60.
- Yoshihara K, Itaya A, Hironaka T, et al. Poly ADP-ribose polymerase-defective mutant cell clone of mouse L1210 cells. *Exp Cell Res* 1992; 200: 126-34.
- Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. DNA repair defect in deficient cell-lines poly (ADP-ribose polymerase) *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2644-9.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Ménissier de Murcia J, de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3563-71.

Summary

Poly (ADP-ribose) polymerase : a survival factor

To protect their genome from the deleterious consequences of accumulation of unrepaired or misrepaired lesions, cells have developed an intricate DNA damage surveillance network. Besides the transcriptionally inducible p53 response triggered by DNA strand breaks leading to cell cycle arrest and DNA repair or apoptosis, poly(ADP-ribosylation), an immediate post-translational modification of nuclear proteins induced by DNA strand breaks, is essential for the cellular response to DNA damaging agents. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), a molecular nick-sensor, is the oldest victim of caspases, the apoptotic proteases. PARP cleavage, as well as the cleavage of many other DNA repair enzymes and of proteins involved in nuclear structure during apoptosis, simultaneously to DNA laddering, ensure the rapid irreversibility of cell death induced by saturating levels of DNA damage.