

Quelles sont les ADN polymérases requises pour la réplication et la réparation de l'ADN chez les eucaryotes ?

Françoise Dantzer
Gilbert de Murcia

Lors de la synthèse d'ADN, la polymérisation de désoxyribonucléotides s'effectue grâce à des enzymes spécifiques : les ADN polymérases. Cinq ADN polymérases ont été identifiées chez les eucaryotes supérieurs : les ADN polymérases α , β , δ , ε et γ . Une sixième ADN polymérase a été identifiée très récemment chez la levure : l'ADN polymérase ζ . Ces enzymes jouent un rôle majeur dans la réplication et/ou dans la réparation de l'ADN. Les quatre premières sont essentielles à la réplication de l'ADN chromosomique, la réparation par excision de bases, la réparation par excision de nucléotides et la réparation des mésappariements ; l'ADN polymérase γ est requise pour la réplication et la réparation de l'ADN mitochondrial ; l'ADN polymérase ζ de levure est responsable du franchissement des lésions de l'ADN lors de la réplication induisant ainsi des mutations spontanées dans l'ADN.

La polymérisation de nucléotides lors des processus de métabolisme de l'ADN (réplication, réparation, recombinaison, réarrangements chromosomiques...) est réalisée par des ADN polymérases spécifiques. Ce sont des enzymes qui catalysent le transfert d'unités 5'-désoxynucléotidyle d'un désoxynucléoside 5'-triphosphate au groupe hydroxyle 3' d'une chaîne d'ADN. Ces enzymes exigent une amorce comme accepteur de désoxynucléotidyle et une matrice spécifiant le nucléotide à ajouter. Malgré cette propriété cataly-

tique commune, cinq ADN polymérases différentes ont été isolées à partir de cellules de mammifères : α , β , δ et ε ont une localisation nucléaire, γ est mitochondriale. Les caractéristiques physiques, la localisation cellulaire et les propriétés fonctionnelles qui différencient chacune de ces enzymes sont résumées dans le *Tableau I*. Nous nous proposons, dans cet article, de réaliser une synthèse du rôle spécifique de chacune de ces polymérases dans la réplication et la réparation de l'ADN chez les eucaryotes. Une attention particulière sera portée sur le rôle de ces enzymes

ADRESSES

F. Dantzer : étudiante en thèse. G. de Murcia : directeur de recherche au Cnrs. École supérieure de biotechnologie de Strasbourg, Cnrs UPR 9003, Cancérogenèse et mutagenèse moléculaire et structurale, Laboratoire correspondant du CEA n° 14, boulevard Sébastien-Brant, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Tableau I
PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES ADN POLYMÉRASES EUCARYOTES

| Propriétés | ADN polymérases | | | | | |
|-----------------------------------|---|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| | α | β | δ | ϵ | γ | ζ (<i>S. cerevisiae</i>) |
| Nombre de sous-unités (su) | 4 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| Poids moléculaire des sous-unités | 180 kDa ADN polymérase 70 kDa rôle structural 60 kDa fonction inconnue 50 kDa ARN polymérase | 39 kDa | 125 kDa su catalytique 50 kDa* | 255 kDa su catalytique 55 kDa* | 125-145 kDa | Rev 7 : 29 kDa Rev 3 : 173 kDa |
| Localisation chromosomique | Xq21.3-q22.1 | 8p11-p12 | 19q13.3-q13.4 | 12q24.3 | 15q24 | Rev 3 : 16 Rev 7 : 9 |
| Homologue chez la levure | Pol I | Pol IV | Pol III | Pol II | mitochondriale | - |
| Localisation cellulaire | nucléaire | nucléaire | nucléaire | nucléaire | mitochondriale | - |
| Fonction | réplication | BER | réplication BER, NER | réplication BER, NER | réplication réparation | synthèse à travers la lésion |
| Fonction exonucléase 3'-5' | non | non | oui | oui | oui | non |
| Processivité | faible | faible | élevée (+ PCNA) | élevée | élevée | faible |
| Fidélité | élevée | faible | élevée | élevée | élevée | - |

* Le rôle des sous-unités 50 kDa et 55 kDa est inconnu.

dans la réparation de l'ADN par excision de bases (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER) et le système de réparation des mésappariements. Nous discuterons également les dernières connaissances concernant l'ADN polymérase ζ identifiée récemment chez *S. cerevisiae* et son rôle dans le franchissement des dommages lors du processus répliatif.

La réplication

La réplication *in vitro* de l'ADN, contenant l'origine de réplication de SV40 et catalysée par des extraits de cellules de mammifères, a permis l'identification des protéines cellulaires de la réplication [1, 2]. Parmi celles-ci, les ADN polymérases α , δ

et/ou ϵ sont les polymérases requises pour la réplication de l'ADN chromosomique (figure 1). Dans le modèle de réplication de SV40, un double hexamère formé par l'antigène T de SV40 (hélicase) se fixe sur une séquence palindromique spécifique de l'origine de réplication du génome de SV40 et en présence de la protéine auxiliaire RPA (protéine de réplication A), déroule l'ADN double-brin. Une fois l'origine de la réplication localement dénaturée, le complexe ADN polymérase- α -primase se fixe sur le complexe ADN-antigène T-RPA. L'ADN polymérase α -primase est formée de quatre sous-unités (Tableau I). Les deux plus petites sous-unités du complexe (de 60 et 50 kDa) forment la primase (ou oligoribonucléotide polymérase).

L'activité de synthèse d'oligoribonucléotides (2 à 12 nucléotides de long) est portée par la sous-unité de 50 kDa (p50). Le rôle de la sous-unité de 60 kDa (p60) est jusqu'alors inconnu. Ces courts fragments d'ARN sont ensuite allongés par la sous-unité de 180 kDa (p180) qui synthétise un fragment d'ADN adjacent de 20 à 40 nucléotides de long. Une amorce ARN-ADN est ainsi créée; elle va permettre la synthèse du premier fragment d'Okazaki [3]. Le mécanisme par lequel l'ADN polymérase α -primase passe de l'activité primase à l'activité polymérase n'est pas encore établi. La sous-unité p180 interagit avec la sous-unité de 70 kDa (p70) dont le rôle pourrait être purement structural dans l'assemblage des sous-unités du complexe ADN polymérase

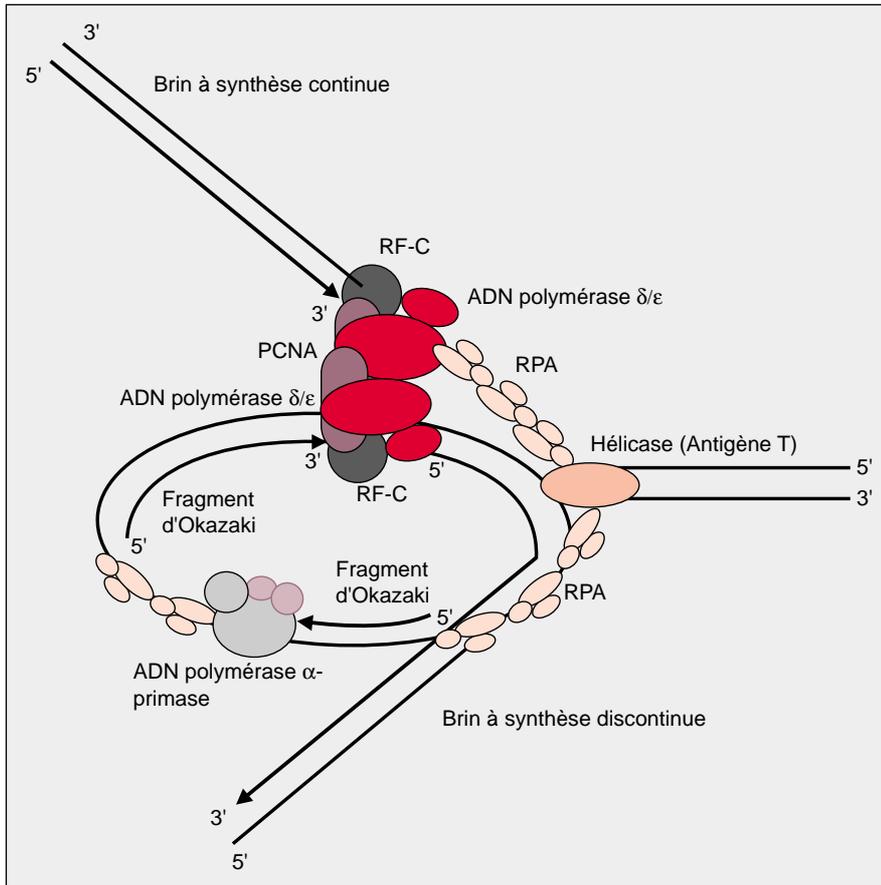


Figure 1. **Synthèse d'ADN semi-conservative.** La synthèse des deux brins d'ADN du chromosome eucaryote est liée dans l'espace et dans le temps grâce à une machinerie de réplication complexe et très bien organisée. L'hélicase (antigène T chez SV40) déroule l'ADN double-brin. RPA facilite le déroulement de l'ADN et protège l'ADN simple brin formé. Au cours de l'initiation, la première amorce ARN-ADN est synthétisée par l'ADN polymérase α -primase. La synthèse continue est réalisée par le complexe processif ADN pol δ /PCNA ou ADN pol ϵ /PCNA. La synthèse discontinue est plus complexe : l'ADN polymérase α -primase engendre des amorces d'ARN-ADN ensuite prolongées en fragments d'Okazaki par l'ADN polymérase δ et/ou ϵ puis le complexe ADN pol δ /PCNA ou ADN pol ϵ /PCNA complète la synthèse jusqu'au fragment d'Okazaki suivant, le fragment d'ARN étant dégradé progressivement par la nucléase FEN-1 et/ou la RNase H1. La liaison des fragments d'ADN formés est réalisée par l'ADN ligase I. (D'après [1].)

α -primase ou entre p180 et l'antigène T de SV40 [4, 5]. Un complexe RF-C/PCNA (facteur de réplication C-antigène nucléaire de prolifération cellulaire) se fixe sur l'extrémité 3' OH de cette amorce ARN/ADN néosynthétisée, dissocie l'ADN polymérase α de la matrice d'ADN, laissant la place à l'ADN polymérase δ et/ou ϵ qui reconnaît le complexe RF-C/PCNA et sera responsable de la synthèse du brin continu. Dans ce complexe, l'hétéropentamère RF-C permet de charger la protéine PCNA sur l'ADN [6] et PCNA interagit

directement avec l'ADN polymérase δ pour augmenter son efficacité [6]. Sur le brin à synthèse discontinue, l'ADN polymérase α -primase préalablement dissociée remet en route la synthèse d'une nouvelle amorce d'ARN/ADN. L'ADN polymérase α -primase est ensuite remplacée par l'ADN polymérase δ qui complète la synthèse pour former un fragment d'Okazaki de 300 nucléotides de long. Des fragments d'Okazaki sont ainsi synthétisés de manière discontinue et joints entre eux par l'ADN polymérase δ dans le système de

réplication de SV40 et/ou l'ADN polymérase ϵ dans la réplication de l'ADN chromosomique. Il a été récemment établi que l'ADN polymérase ϵ n'est en aucun cas nécessaire à la synthèse discontinue lors de la réplication de l'ADN de SV40 mais reste essentielle pour la réplication de l'ADN chromosomique [7]. L'amorce d'ARN est progressivement dégradée par la nucléase FEN-1 et/ou la RNase H1 et la lacune est comblée par l'ADN polymérase δ et/ou ϵ .

L'ADN polymérase II de levure (équivalent de l'ADN polymérase ϵ de mammifères) possède, dans sa partie carboxy-terminale, un domaine impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, et contenant un doigt de zinc pouvant être impliqué dans la détection des dommages dans l'ADN. Elle pourrait ainsi jouer un rôle de détecteur de dommages lors de la réplication coordonnant l'avancement de la fourche de réplication avec le cycle cellulaire [8]. Par analogie avec ce système, on pourrait aussi attribuer à l'ADN polymérase ϵ de mammifères un rôle similaire.

La réparation par excision de bases (BER)

Les lésions réparées par le système BER regroupent des dépurinations spontanées de l'ADN, des désaminations de cytosine et méthylcytosine, des produits de réaction avec les radicaux libres, des méthylations de l'ADN [9, 10]. La caractérisation des protéines impliquées dans le système BER et la reconstitution *in vitro* de ce système avec les protéines purifiées a permis de définir les principales étapes de ce mécanisme de réparation (figure 2A). La liaison N-glycosylique reliant la base endommagée à la chaîne de désoxyribose-phosphate est hydrolysée par une ADN-glycosylase créant ainsi un site AP (apurique ou apyrimidique). L'AP-endonucléase (HAP-1 chez l'homme) réalise alors une coupure à l'extrémité 5' de la lésion engendrant ainsi des résidus 3'OH et 5'désoxyribose-phosphate. Les données actuelles suggèrent alors l'existence de deux voies de synthèse réparatrice [11]. Lorsqu'un seul nucléotide est excisé, la voie de «réparation par brèche courte» est

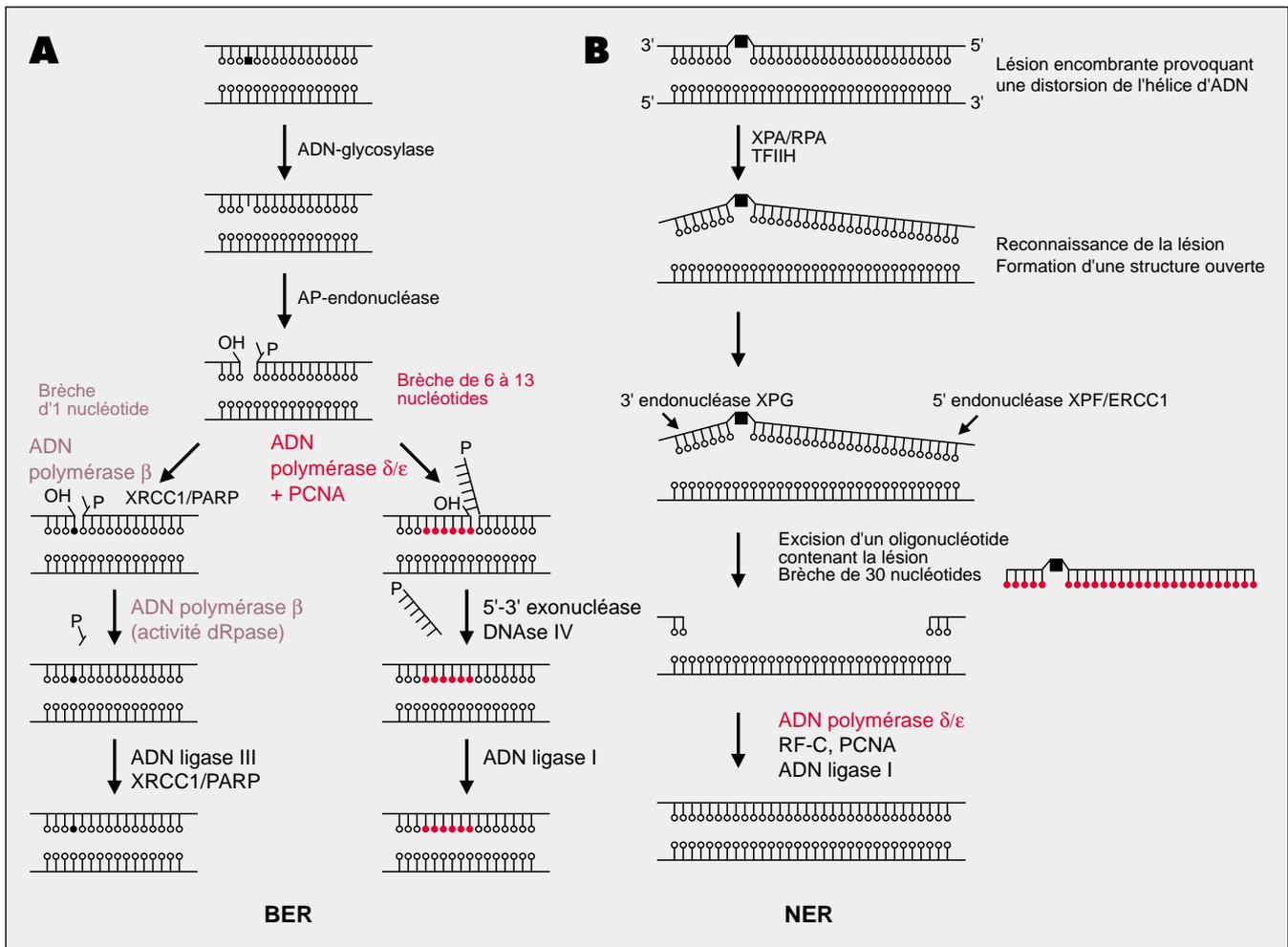


Figure 2. **Représentation schématique de la réparation par excision de bases (BER) et de la réparation par excision de nucléotides (NER) chez les eucaryotes.** A. La réparation par excision de bases comprend deux voies parallèles: une voie de réparation à brèche courte (1 nucléotide) impliquant l'ADN polymérase β /XRCC1/ADN ligase III-poly[ADP-ribose] polymérase, et une voie de réparation à brèche longue (6 à 13 nucléotides) impliquant les ADN polymérases δ et/ou ϵ . B. La réparation par excision de nucléotides engendre une brèche de 30 nucléotides environ, remplie par les ADN polymérases δ et/ou ϵ . (D'après [41]).

activée. Cette voie majoritaire fait intervenir le complexe ADN polymérase β /XRCC1/ADN ligase III/PARP (poly [ADP-ribose] polymérase) dans lequel XRCC1 joue un rôle d'adaptateur capable de stabiliser les trois autres partenaires, et la PARP joue un rôle à la fois de détecteur du site AP incisé et de recrutement des autres protéines [12, 13]. Par ailleurs, en interagissant avec l'ADN polymérase β , XRCC1 permet d'éviter une synthèse d'ADN excédentaire par cette polymérase lors de la réparation [14]. L'ADN polymérase β est un monomère de 39 kDa dépourvu d'une activité intrinsèque 3'-5' exonucléase (Tableau I). Le domaine amino-terminal de liaison à l'ADN de

8 kDa possède une activité désoxyribose-phosphodiesterase (dRpase) associée qui assure l'excision du résidu 5'désoxyribose-phosphate sur le site abasique par β -élimination; le domaine carboxy-terminal de 31 kDa possède l'activité catalytique de polymérisation de nucléotides. Il a été décrit récemment une interaction entre l'AP-endonucléase humaine (HAP1, Ref1, Apex) et l'ADN polymérase β . Cette interaction permet le recrutement de l'ADN polymérase β sur le site abasique et stimule son activité dRpase [15]. La structure cristallographique de l'ADN polymérase β humaine a été établie récemment et révèle l'existence de deux motifs identiques de type hélice-

boucle-hélice, l'un dans le domaine amino-terminal et l'autre dans le domaine carboxy-terminal de l'enzyme. Ce motif est retrouvé dans d'autres protéines nucléaires et définit la spécificité de liaison à l'ADN [16]. Lorsque plusieurs nucléotides sont excisés, la voie de «réparation par brèche longue» est activée. Ces brèches plus longues de 6 à 13 nucléotides résultent d'une réaction de déplacement de brin dans le sens 5'-3'. Le brin ainsi déplacé est ensuite excisé par la DNase IV (5'-3' exonucléase). De récentes études démontrent l'implication du complexe ADN pol δ et/ou ϵ /PCNA dans cette voie. Il n'est aujourd'hui pas encore clairement établi quels dom-

mages activent spécifiquement l'une ou l'autre de ces deux voies bien que la voie faisant intervenir l'ADN polymérase β soit majoritaire. Lorsque les sites abasiques sont modifiés *in vitro* par oxydation ou réduction, il semblerait que la « voie de réparation par brèche longue » devienne majoritaire et, dans ce cas, utilise l'ADN polymérase β mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse [17].

L'inactivation du gène codant pour l'ADN polymérase β chez la souris conduit à une létalité embryonnaire à 10,5 jours suggérant un rôle essentiel de l'ADN polymérase β dans le développement embryonnaire [18]. Les fibroblastes embryonnaires établis à partir des embryons de 10 jours présentent une très grande sensibilité aux agents alkylants monofonctionnels produisant des dommages réparés par le BER, ce qui confirme le rôle de cette protéine dans ce système de réparation [19].

Il n'est pas encore clairement établi quelle ADN ligase intervient spécifiquement dans chacune des deux voies de la réparation par excision de bases. L'interaction de XRCC1 avec l'ADN ligase III suggère que cette dernière est responsable de l'étape de ligation dans la voie de réparation par brèche courte [12]. Toutefois, Kubota *et al.* [14] ont montré que cette étape de ligation peut aussi être réalisée par l'ADN ligase I *in vitro*. De même, on attribue à l'ADN ligase I le rôle principal dans la voie de réparation par brèche longue bien qu'elle puisse être remplacée par l'ADN ligase III *in vitro* [17].

La réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotides est efficace sur les lésions encombrantes ou provoquant une distorsion importante de l'hélice d'ADN. Elle élimine les adduits formés par l'action des carcinogènes chimiques comme le cisplatine et des photoproduits de l'ADN engendrés par les rayons UV-C [10]. Chez l'homme, le système de réparation par excision de nucléotides est le mécanisme principal impliqué dans la réparation des dommages produits par les UV. Des mutations dans les gènes codant pour les protéines XP

qui participent au système NER sont responsables du *xeroderma pigmentosum* caractérisé par un risque élevé de développer des cancers de la peau [23].

Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides est maintenant élucidé en grande partie grâce aux expériences de réparation réalisées *in vitro* (figure 2B). Le complexe RPA/XPA reconnaît la lésion sur l'ADN, l'activité hélicase portée par le facteur de transcription TFIIH permet la formation d'une structure ouverte au niveau du site du dommage. L'ADN est d'abord incisé à 2-9 nucléotides en 3' de la lésion par l'endonucléase XPG, puis à 16-25 nucléotides en 5' de la lésion par le complexe XP-F/ERCC1. Un oligonucleotide d'environ 30 nucléotides contenant la lésion est alors excisé. La lacune d'ADN doit ensuite être remplie par une ADN polymérase. Or ce système nécessite *in vitro* comme *in vivo* le facteur accessoire des ADN polymérases δ et ϵ : PCNA, ce qui implique un rôle de ces polymérases dans l'étape de synthèse réparatrice du système NER. De nombreuses études suggèrent que l'ADN polymérase ϵ est le candidat privilégié *in vivo* [20] et *in vitro* [21]. Toutefois, des travaux récents de Zeng *et al.* [22] fondés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques, démontrent clairement l'implication de l'ADN polymérase δ dans la réparation *in vitro* des dommages induits par les UV-C. Il n'est donc pas encore clairement établi quelle est la polymérase (δ ou ϵ) qui intervient préférentiellement dans le système NER. Il est possible, en fait, que les deux enzymes participent à ce processus *in vivo*.

Le système de réparation des mésappariements

Les cellules eucaryotes disposent d'un système de réparation similaire à celui de *E. coli* pour corriger les mésappariements d'un seul nucléotide et les petites boucles (jusqu'à 4 nucléotides mésappariés) qui surviennent lors de la réplication et la recombinaison [24, 25]. Les premières étapes de la réparation des mésappariements sont bien connues (figure 3A). Les protéines homologues de MutS de *E. coli* reconnaissent la lésion dans l'ADN: l'hétérodimère hMSH2/GTBP reconnaît

un mésappariement d'un nucléotide ou une boucle de 1-2 nucléotides et l'hétérodimère hMSH2/hMSH3 reconnaît une boucle de plus de 2 nucléotides. Le complexe ADN-hMutS est reconnu à son tour par un autre hétérodimère composé de protéines homologues de MutL de *E. coli*: hMLH1/hPMS2. L'élimination du brin incorrect est réalisée par une exonucléase qui peut être la DNase IV/FEN1 (ou 5'-3' exonucléase) puis l'étape de resynthèse/ligation est similaire à celle de la réparation par excision de nucléotides. Durant le processus de resynthèse, l'ADN polymérase impliquée doit synthétiser un oligonucleotide de 100 à 1 000 paires de bases en 3' ou 5' du mésappariement. Cette synthèse réparatrice est assurée, dans les cellules humaines, par une ADN polymérase sensible à l'aphidicoline [26]. Par ailleurs, des études récentes démontrent un rôle important de PCNA dans le système de réparation des mésappariements [27, 28]. Ces données indiquent donc clairement l'implication de l'ADN polymérase δ et/ou ϵ dans ce processus. PCNA semble avoir plusieurs rôles dans ce système: il peut s'agir d'un facteur de processivité* pour les ADN polymérases, mais peut également être impliqué dans des étapes plus précoces de reconnaissance du brin endommagé ou, par interaction avec l'ADNase IV/FEN 1, dans l'étape d'excision du brin contenant le mésappariement. L'importance du système de réparation des mésappariements est clairement démontrée chez l'homme pour éviter l'apparition de mutations conduisant à la transformation des cellules. En effet, les gènes hMSH2 et hMLH1 mutés sont responsables du syndrome HNPCC (*hereditary non polyposis colon cancer*) caractérisé par un risque élevé de développer des tumeurs du côlon [29].

L'ADN polymérase ζ et le franchissement de lésions lors de la réplication

La combinaison de ces trois systèmes de réparation (BER, NER et réparation des mésappariements) assure

* La processivité d'une ADN polymérase est sa capacité à synthétiser de l'ADN de manière continue sans se détacher de son substrat.

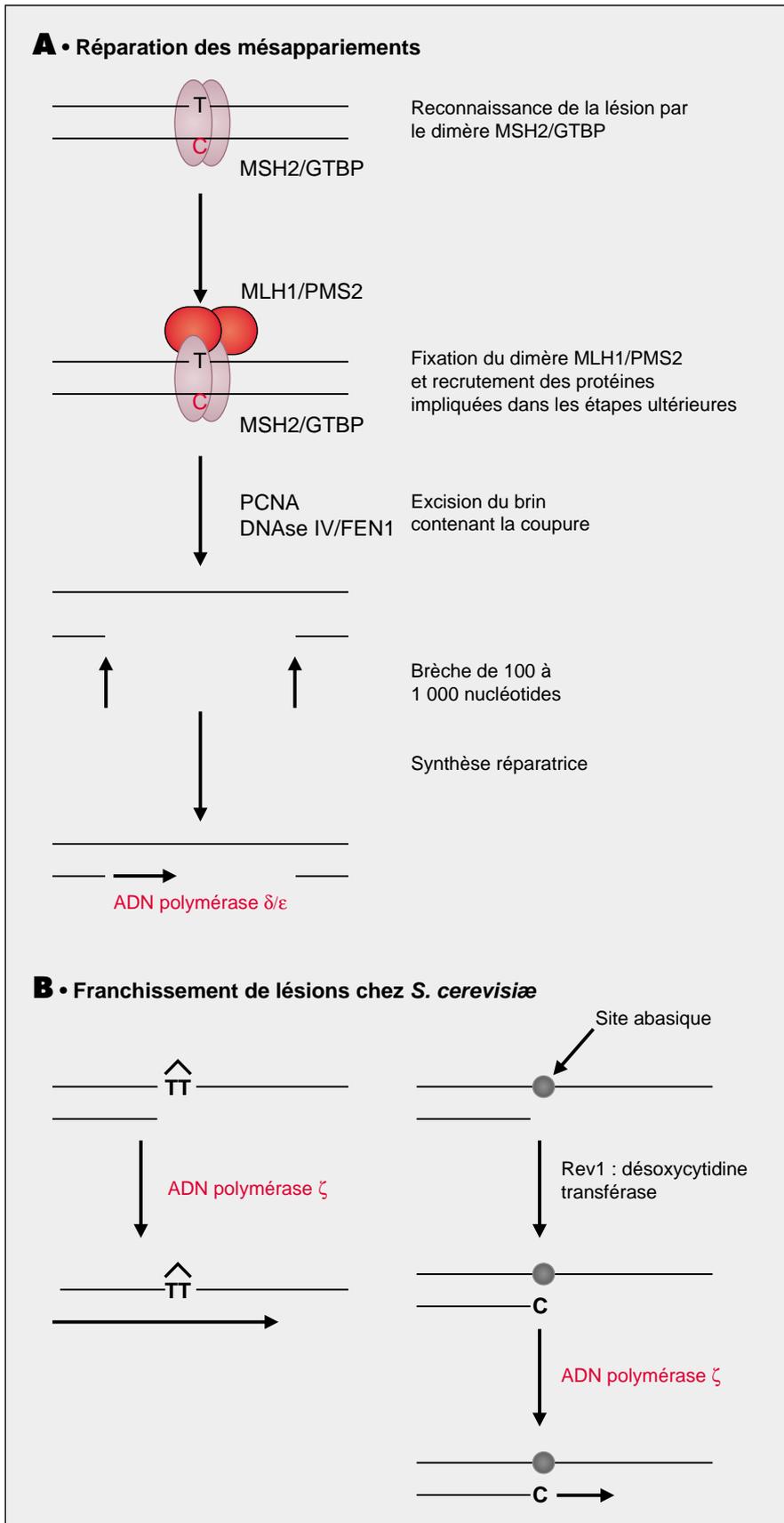


Figure 3. **Représentation schématique du système de réparation des mésappariements chez les eucaryotes et du mécanisme de franchissement des lésions par l'ADN polymérase ζ .** A. Le système de réparation des mésappariements engendre une brèche de 100 à 1000 nucléotides ensuite remplie par les ADN polymérases δ et/ou ϵ . B. L'ADN polymérase ζ de levure est capable de franchir les lésions dans l'ADN au cours de la réplication par un processus hautement mutagène.

une réparation efficace et rapide de l'ADN endommagé. Toutefois, lors de la réplication subsistent des lésions qui sont franchies par les ADN polymérases dans un processus hautement mutagène. Par exemple, l'ADN polymérase β de thymus de veau est capable de franchir efficacement *in vitro* un adduit d(GpG) dû au cisplatine, en engendrant une délétion mutagène d'une paire de bases [30, 31]. L'ADN polymérase β humaine est également capable de franchir des sites abasiques dans l'ADN, conduisant ainsi à des délétions ou des substitutions de bases [32]. Les travaux récents de Giot *et al.* (Orsay, France) [33] réalisés *in vivo*, suggèrent que l'ADN polymérase δ de *S. cerevisiae* peut également être impliquée dans un système de franchissement de lésions induites par les UV.

Chez la levure, *S. cerevisiae*, trois autres protéines (Rev1, Rev3, et Rev7) sont impliquées dans le franchissement des lésions dans l'ADN [34]. Le complexe Rev3/Rev7 forme l'ADN polymérase ζ de levure (figure 3B). Cette ADN polymérase est capable de franchir *in vitro* des lésions de type dimère de thymine (cyclobutane). Rev3 est également capable de franchir un adduit de type N-2-acétylaminofluorène (AAF) *in vivo* en engendrant une délétion d'une paire de base [35]. Lorsqu'un site abasique est présent sur l'ADN, l'activité désoxycytidine transférase de Rev1 réalise l'insertion d'une cytosine en face du site abasique facilitant ainsi la capacité de l'ADN polymérase ζ de franchir cette lésion. Les mutations spontanées observées chez *S. cerevisiae* peuvent être dues à l'effet

mutagène du phénomène de franchissement des lésions par l'ADN polymérase ζ plutôt qu'à des erreurs d'incorporation des ADN polymérases lors de la réplication. Les protéines homologues de Rev1 et Rev3 de *S. cerevisiae* ont été identifiées chez l'homme, ce qui laisse supposer que le processus de franchissement des lésions existe aussi chez les eucaryotes supérieurs [36].

L'ADN polymérase γ

Ce n'est que depuis la fin des années 1980 que l'ADN polymérase γ a pu être purifiée à partir des eucaryotes supérieurs. L'enzyme est composée d'une sous-unité catalytique unique de taille variable allant de 125 à 145 kDa suivant les organismes.

L'ADN polymérase γ contient une activité 3'-5' exonucléase associée et montre de grandes similitudes de séquences avec l'ADN polymérase I de *Escherichia coli* (Tableau I). Comme aucune autre polymérase n'a jusqu'ici pu être identifiée dans la mitochondrie, il semblerait que cette enzyme soit seule responsable de la réplication et de la réparation de l'ADN mitochondrial.

L'ADN polymérase γ est une enzyme hautement processive. De récents travaux réalisés *in vitro* suggèrent que cette polymérase, comme les autres protéines de réplication nucléaires, pourrait s'associer avec des protéines auxiliaires telles que RPA et PCNA qui augmenteraient la processivité de l'enzyme, afin que la synthèse de l'ADN mitochondrial soit réalisée de la manière la plus efficace et fidèle possible.

Le métabolisme oxydatif de la mitochondrie est responsable d'une grande partie des dommages produits sur l'ADN mitochondrial, notamment des résidus 8-oxodG. De plus, la mitochondrie est constamment soumise à des pertes de bases de manière spontanée ou induite engendrant des sites abasiques. L'ensemble de ces dommages est responsable d'un grand nombre de maladies génétiques provoquées par des mutations dans l'ADN mitochondrial. La fréquence élevée de ces dommages et leurs conséquences a donc conduit la cellule à se doter d'un système de réparation efficace dans lequel est impliqué l'ADN poly-

mérase γ mais sa fonction exacte dans ce processus reste à définir [37].

Conclusions

L'activité de polymérisation de nucléotides réalisée par les ADN polymérases est très bien établie, mais l'identification de six ADN polymérases différentes chez les eucaryotes fait s'interroger sur leur spécificité fonctionnelle.

Les efforts investis ces quinze dernières années dans l'étude de la structure et de la fonction de ces enzymes nous permettent à présent de mieux situer leur importance dans les deux grandes voies du métabolisme de l'ADN que sont la réparation et la réplication de l'ADN. Il est donc possible d'apporter les conclusions suivantes: (1) l'ADN polymérase α -primase amorce la synthèse des fragments d'Okazaki lors de la mise en route de la réplication et lors de la réplication du brin à synthèse discontinue; (2) l'ADN polymérase δ complète la synthèse des fragments d'Okazaki, réalise la synthèse du brin continu et est impliquée dans les étapes de polymérisation à la fois du système NER, du système de réparation des mésappariements et de la « voie de réparation par brèche longue » du système BER; (3) l'ADN polymérase β réalise l'étape de polymérisation de nucléotides dans la « voie de réparation par brèche courte » du système BER; (4) l'ADN polymérase ϵ semble être la polymérase majeure du système NER mais peut également se substituer à l'ADN polymérase δ , soit lors de la réplication, soit dans la « voie de réparation par brèche longue du système BER » ou dans l'étape de polymérisation du système de réparation des mésappariements; (5) l'ADN polymérase γ est la seule polymérase mitochondriale répertoriée de nos jours; (6) l'ADN polymérase ζ semble être responsable des mutations spontanées observées chez *S. cerevisiae* par franchissement des lésions lors de la réplication de l'ADN endommagé. Les ADN polymérases eucaryotes sont donc fondamentales pour le métabolisme de l'ADN et leur dysfonctionnement peut entraîner des conséquences dramatiques sur la vie de la cellule. Cette observation pour-

rait être mise à profit dans une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des cancers. On peut imaginer que la résolution de la structure cristallographique de ces enzymes permette, dans l'avenir, la mise au point de nouveaux inhibiteurs spécifiques des ADN polymérases et complémentaires des inhibiteurs des topo-isomérases I déjà utilisés dans le traitement des cancers, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses dans la mise au point de nouveaux agents antitumoraux.

D'autre part, l'étude de ces enzymes et des facteurs auxiliaires permet peu à peu d'établir une connexion entre les mécanismes de surveillance du génome et la progression du cycle cellulaire. Ainsi, l'interaction de l'ADN polymérase α -primase avec la poly(ADP-ribose) polymérase (protéine impliquée dans la réparation par excision de bases [12, 38]), identifiée récemment [39, 40], permet un contrôle de l'avancement de la fourche de réplication après dommages (*m/s n° 11, vol. 12, p. 1269*). De plus, il est maintenant établi que le facteur auxiliaire des ADN polymérases δ et ϵ , PCNA, constitue un point de communication entre les processus de contrôle du cycle cellulaire, la réplication, la réparation par excision de nucléotides, la réparation par excision de bases et le système de réparation des mésappariements [6]. Comprendre les mécanismes moléculaires reliant les systèmes de réparation, les arrêts du cycle cellulaire, et la machinerie de réplication est un défi pour la recherche future ■

Remerciements

Nous remercions Agnès Cordonnier pour la lecture critique de ce manuscrit. F. Dantzer est subventionnée par la Ligue Nationale contre le Cancer.

RÉFÉRENCES

1. Waga S, Stillman B. Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. *Nature* 1994; 369: 207-12.
2. Stillman B. Smart machines at the replication fork. *Cell* 1994; 78: 725-8.
3. Salas M, Miller JT, Leis J, De Pamphilis ML. Mechanisms for priming DNA synthesis. In: De Pamphilis ML, ed. *DNA replication in eukaryotic cells*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 131-76.

RÉFÉRENCES

4. Collins KL, Russo AAR, Tseng BY, Kelly TJ. The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase α in DNA replication. *EMBO J* 1993; 12: 4555-66.
5. Dornreiter I, Erdile LF, Gilbert IU, von Winkler D, Kelly TJ, Fanning E. Interaction of DNA polymerase α -primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *EMBO J* 1992; 11, 2: 769-76.
6. Jonsson ZO, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *BioEssays* 1997; 19: 967-75.
7. Zlotkin T, Kaufmann G, Jiang Y, Lee MYWT, Vitto L, Sväoja J, Dornreiter I, Fanning E, Nathanel T. DNA polymerase epsilon may be dispensable for SV40 but not cellular DNA replication. *EMBO J* 1996; 15: 2298-305.
8. Navas TA, Zhou Z, Elledge SJ. DNA polymerase ϵ links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* 1995; 80: 29-39.
9. Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 391-7.
10. Wood R. DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 136-60.
11. Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DS, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 9573-8.
12. Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular « nick sensor » *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4387-94.
13. Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Ménéssier-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 (sous presse).
14. Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. 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.
15. Bennet RAO, Wilson IIDM, Wong D, Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7166-9.
16. Pelletier H, Sawaya MR, Woffle W, Wilson SH, Kraut J. Crystal structures of human DNA polymerase β complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity and fidelity. *Biochemistry* 1996; 35: 12742-61.
17. Kungland A, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 1997; 16: 3341-8.
18. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-6.
19. Sobol RW, Horton JK, Kühn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, Wilson S H. Requirement of DNA polymerase β in base excision repair. *Nature* 1996; 379: 183-6.
20. Sväoja J, Svomensaaari S, Nishida C, Goldsmith JS, Chui GSJ, Jain S, Linn S. DNA polymerase α , δ and ϵ : three distinct enzymes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6664-8.
21. Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MKK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hübscher U, Egly JM, Wood RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 1995; 80: 859-68.
22. Zeng XR, Jiang Y, Zhang SJ, Hao H, Lee MYWT. DNA polymerase δ is involved in the cellular response to UV damage in human cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 13748-51.
23. Schaeffer L, Egly J. BTF2/TFIIH, un facteur de transcription et réparation impliqué dans des maladies de la réparation de l'ADN. *Med Sci* 1994; 10: 973-8.
24. Kolodner R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 1996; 10: 1433-42.
25. Lindhal T, Karran P, Wood RD. DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 7 (sous presse).
26. Fang WH, Modrich P. Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. *J Biol Chem* 1993; 268: 11838-44.
27. Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 1996; 87: 65-73.
28. Johnson RE, Kovvali GK, Guzder SN, Amin NS, Holm C, Habraken Y, Sung PL, Prakash S. Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 1996; 271: 27987-90.
29. Thomas G. Dix ans de recherche sur les prédispositions génétiques au développement des tumeurs. *Med Sci* 1995; 11: 336-48.
30. Hoffman JS, Pillaire MJ, Maga G, Podust V, Hübscher U, Villani G. DNA polymerase β bypasses *in vitro* a single d(GpG) cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5356-60.
31. Hoffman JS, Pillaire MJ, Garcia e Stafania D, Lapalu S, Villani G. *In vitro* bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase β and human immunodeficiency virus type-I reverse transcriptase is highly mutagenic. *J Biol Chem* 1996; 271: 15386-92.
32. Efrati E, Tocco G, Eritja R, Wilson SH, Goodman MF. Abasic translesion synthesis by DNA polymerase β violates the « A-rule ». *J Biol Chem* 1997; 272: 2559-69.
33. Giot L, Chanet R, Simon M, Facca C, Faye G. Involvement of the yeast DNA polymerase δ in DNA repair *in vivo*. *Genetics* 1997; 146: 1239-51.
34. Nelson J, Lawrence C, Hinkle D. Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase ζ . *Science* 1997; 272: 1646-9.
35. Baynton K, Bresson-Roy A, Fuchs RPP. Analysis of damage tolerance pathways in *Saccharomyces cerevisiae*: a requirement for Rev3 DNA polymerase in translesion synthesis. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 960-6.
36. Lawrence CW, Hinkle DC. DNA polymerase ζ and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. *Cancer Surv* 1996; 28: 21-31.
37. Pinz KG, Shibutani S, Bogenhagen DF. Action of mitochondrial DNA polymerase γ at sites of base loss or oxidative damage. *J Biol Chem* 1995; 270: 9202-6.
38. De Murcia G, Ménéssier-de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 172-6.
39. Simbulan CMG, Suzuki M, Izuta S, Sakurai T, Savoisky E, Kojima K, Miyahara K, Shizuta Y, Yoshida S. Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase α by physical association. *J Biol Chem* 1993; 268: 93-9.
40. Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Ménéssier-de Murcia J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1891-8.
41. Friedberg EC, Wood RD. DNA excision repair pathways. In: De Pamphilis ML, ed. *DNA replication in eukaryotic cells*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 249-69.

* GLOSSAIRE *

BER : base excision repair.
NER : nucleotide excision repair.
PCNA : proliferating cell nuclear antigen.
RFC : replication factor C.
RPA : replication protein A.
site AP : site apurique ou apyrimidique.
HAP-1 : human AP-endonuclease.
FEN-1 : 5'flap endonuclease 1.
XRCC1 : X-ray repair cross complementing 1.
PARP : poly (ADP-ribose) polymerase.
dRpase : désoxyribose phosphodiesterase.
XPA : xeroderma pigmentosum group A.
XPG : xeroderma pigmentosum G.
ERCC1 : excision repair cross complementary 1.
TFIIH : transcription factor IIIH.

Summary

Which DNA polymerases are used for DNA-replication and DNA-repair in eukaryotes?

There are five well-characterized DNA polymerases in higher eukaryotes: DNA polymerases α , β , δ and ϵ are nuclear proteins and DNA polymerase γ is a mitochondrial enzyme. Recently an additional enzyme was described in *S. cerevisiae* called DNA polymerase ζ . This short review summarizes our current knowledge concerning the role of each of these polymerases in DNA replication and the major excision repair pathways: base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) and mismatch repair. The summary answer is that DNA polymerase α is required for semi-conservative DNA replication but not for DNA repair. Base excision repair mainly involves DNA polymerase β , but a compensatory alternative pathway involving DNA polymerase δ and/or ϵ may also operate. Nucleotide excision repair like mismatch repair uses DNA polymerase ϵ and/or δ . Both of these two enzymes are also required for leading and lagging strand synthesis during DNA replication. DNA polymerase γ is required in mitochondrial DNA replication and probably also in mitochondrial DNA repair. DNA polymerase ζ appears to be involved in the bypass of damage during DNA replication of a damaged template.

3 BOURSES DE DEA

AFRG

Laboratoires BIOGALÉNIQUE

VALEUR : 80 000 FF CHACUNE

OBJECTIF : Ces 3 bourses d'étude seront attribuées aux candidats ayant satisfait aux conditions d'admission en DEA et ayant trouvé un laboratoire d'accueil dans des projets

- **RELEVANT DES DOMAINES SUIVANTS**

Consultations pluridisciplinaires
Diagnostic génétique
Économie de la santé
Épidémiologie génétique
Éthique
Interactions génotype-phénotype

- **RELATIFS AUX**

MALADIES GÉNÉTIQUES ORPHELINES

Amyloses, Angelman, Chorée de Huntington,
Délétions chromosomiques, Gilles de la Tourette,
Leucodystrophies, Maladies métaboliques, Marfan,
Neurofibromatoses, Ostéogenèse imparfaite,
Van-Hippel Lindau

Le Jury sera composé de neuf membres du conseil scientifique de l'AFRG (Médecins spécialistes des maladies concernées et scientifiques de haut niveau dans les domaines retenus) ainsi qu'un représentant des Laboratoires BIOGALÉNIQUE

- **DOSSIER**

RETRAIT à partir du 31 mars 1998
DATE LIMITE d'envoi 30 juin 1998

- **RENSEIGNEMENTS**

AFRG

Monsieur Alain Bouvet, PhD
5, rue Casimir-Delavigne
75006 Paris, France

Tél. : 01 43 25 98 00 - Fax : 01 43 54 32 56

Mais vous pouvez aussi nous contacter
par courrier électronique de dépôt
AFRGrare@francemultimedia.fr

 laboratoires
Biogalénique
GRUPE RHÔNE-POULENC RORER

UNION DE MALADES
ASSOCIATION FRANÇAISE DE RECHERCHE GÉNÉTIQUE
ORPHELINES

TIRÉS À PART

F. Dantzer.