

Poly (ADP-ribose) polymérase : la structure cristallographique de développer de nouveaux médicaments antitumoraux permettra-t-elle ?

L'exposition de la cellule eucaryote aux agents génotoxiques, déclenche un ensemble de réponses physiologiques qui vont lui permettre de survivre en réparant aussi rapidement et fidèlement que possible les lésions présentes dans l'ADN ou, au contraire, d'ouvrir le programme de mort cellulaire par apoptose, évitant ainsi la fixation. Un élément important du réseau de surveillance du génome eucaryote est la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), qui détecte et signale les cassures dans l'ADN (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1487*) [1].

Sur le site même de l'interruption de la double hélice, la PARP, enzyme dépendante de l'ADN, utilise le NAD^+ comme substrat pour catalyser la polymérisation de résidus ADP-ribose en un homopolymère branché, le poly (ADP-ribose). Ce polyanion, lié de manière covalente mais transitoire à des protéines nucléaires acceptrices et à la PARP elle-même, va fortement modifier l'affinité pour l'ADN de ces accepteurs (histones et enzymes du métabolisme de l'ADN). Un certain nombre de fonctions essentielles pour la cellule sont alors ralenties ou momentanément arrêtées, le temps pour celle-ci d'ouvrir un programme de survie (réparation des lésions) ou, au contraire, de mort cellulaire en cas de dommages excessifs. La poly (ADP-ribosylation) est donc une modification post-traductionnelle des protéines nucléaires induite par les agents qui endommagent le génome eucaryote.

La PARP (113 kDa) est une enzyme multifonctionnelle, abondante, associée à la chromatine et conservée au

cours de l'évolution. Son étude structurale et fonctionnelle nous a permis d'identifier deux modules principaux: (1) un domaine aminoterminal comprenant deux doigts à zinc agissant comme un véritable détecteur moléculaire d'interruptions dans l'ADN [2] et un signal de localisation nucléaire bipartite [3, 4]; (2) dans la partie carboxyterminale, un domaine catalytique dont l'activité enzymatique basale (synthèse de polymères d'ADP-ribose) est fortement augmentée lorsque la PARP détecte et interagit avec une cassure simple brin d'ADN [5].

La structure cristallographique de ce domaine vient d'être achevée en présence et en absence d'un inhibiteur analogue du nicotinamide [6]. Elle se compose d'une région en hélice α (662-784) et d'une région carboxyterminale (785-1010) riche en brins β , constituant le cœur catalytique de la PARP et comprenant, en particulier, une séquence de 50 acides aminés (859-908) conservés à plus de 90 % depuis les mammifères jusqu'à la plante *Arabidopsis thaliana*. Cette séquence, qui représente la « signature PARP » s'avère en fait constituer l'essentiel du site actif de l'enzyme (*figure 1*). L'autre surprise que nous a réservée l'étude cristallographique de ce domaine est que ce site actif, constitué du motif structural: β - α -loop- β - α (*figure 1*), est en grande partie superposable à celui des toxines à NAD^+ qui catalysent la mono-ADP-ribosylation (toxine diphtérique de *Corynebacterium diphtheriae*, l'entérotoxine de *Escherichia coli*, exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, toxine

pertussique de *Bordetella pertussis* et toxine cholérique de *Vibrio cholerae*). Cet alignement, sur le plan structural, des sites actifs de la PARP et de ces toxines à NAD^+ , ne va pas de pair avec une homologie de séquence, hormis quelques acides aminés interagissant directement avec la partie nicotinamide du NAD^+ qui est précisément ce que reconnaît la PARP dans son substrat. La similitude frappante entre la PARP, enzyme de surveillance du génome eucaryote, et les toxines procaryotes qui catalysent la mono-ADP-ribosylation de facteurs d'élongation de la traduction (EF2) ou de petites protéines G, indique une très nette parenté de leur site actif sur le plan évolutif. Ce nouveau motif de liaison du NAD^+ (β - α -loop- β - α) caractérise désormais la superfamille des ADP-ribosyl transférases incluant la PARP, les toxines à NAD^+ et, sans doute, les mono-ADP-ribosyl transférases eucaryotes.

À côté de l'intérêt purement fondamental qu'elle suscite, la connaissance de la structure cristallographique de ce domaine va relancer le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques de la PARP. En effet, dans les années 1980, Shall *et al.* (Birmingham, GB) ont largement contribué à la compréhension des réactions de poly-ADP-ribosylation en identifiant le 3-aminobenzamide (3-AB), un analogue du nicotinamide, qui allait bientôt devenir un outil standard de laboratoire pour inhiber la réparation par excision de bases (BER, *based excision repair*) dans l'ADN [7]. Bien que l'usage et, parfois, l'abus de cet inhibiteur



Figure 1. **Structure cristallographique du domaine catalytique de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) de poule** (acides aminés 662 à 1010; la numérotation des acides aminés se réfère à la PARP humaine). On distingue nettement en aminoterminal, le sous-domaine en hélice α (les hélices sont colorées en rouge) et en carboxyterminal, le domaine β (les brins β sont colorés en jaune). Le site actif de la PARP (motif: β - α -loop- β - α ; acides aminés 859-908) est représenté en vert.

aient pu engendrer des polémiques sur l'implication de la PARP lors de la réparation de l'ADN, il est bien clair maintenant que les inhibiteurs de la PARP potentialisent la cytotoxicité des agents génotoxiques et, en particulier, des médicaments antitumoraux. En effet, l'inhibition de la synthèse de poly-ADP-ribose (fonction du domaine carboxyterminal) par un inhibiteur spécifique empêche la PARP de s'automodifier, la forçant donc à résider plus longtemps sur l'ADN endommagé (fonction du domaine aminoterminal). La non-réparation de l'ADN aura alors pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire et, au-delà, la mise en route du programme apoptotique deviendra la seule issue pos-

sible pour la cellule. Notons que la plupart des phénotypes observés, lorsque la PARP est inhibée par le 3-AB, ont été jusqu'à présent vérifiés en utilisant des approches de génétique et de biologie moléculaire (anti-sens [8], mutants *trans*-dominants négatifs [9]).

L'inhibition de la réparation de l'ADN et l'augmentation de l'apoptose indépendante de p53 induite par les agents génotoxiques, sont les objectifs que se sont donnés un certain nombre de laboratoires académiques [10] et pharmaceutiques [11] qui ont vu dans la PARP une alternative nouvelle et intéressante au « tout p53 ». La structure cristallographique va sans aucun doute faciliter la production de ces nouveaux inhibiteurs

potentiellement utilisables en radiothérapie en particulier, l'effet de potentialisation n'ayant lieu que pour les cellules endommagées et donc irradiées.

A.R.
J.M.M.
G.E.S.
G.M.

1. de Murcia G, Ménissier de Murcia J. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 172-6.
2. Molinete M, Vermeule W, Bürkle A, Ménissier de Murcia J, Küpper J, Hoeijmakers J, de Murcia G. Overproduction of the poly (ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J* 1993; 5: 2109-17.
3. Schreiber V, Molinete M, Bœuf H, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. The human poly (ADP-ribose) polymerase nuclear location signal is a bipartite element functionally separate from DNA-binding and catalytic activity. *EMBO J* 1992; 9: 3263-9.
4. Schreiber V, de Murcia G, Ménissier de Murcia J. Le transport des protéines dans le noyau: les signaux de localisation nucléaire et leurs récepteurs. *médecine/science* 1992; 8: 134-9.
5. Simonin F, Poch O, Delarue M, de Murcia G. Identification of potential active-site residues in the human poly (ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1993; 268: 8529-35.
6. Ruf A, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G, Schulz G. Structure of the catalytic domain of poly ADP-ribose polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7481-5.
7. Shall S. ADP-ribose in DNA repair: a new component of DNA excision repair. *Adv Rad Biol* 1984; 11: 1-69.
8. Ding R, Smulson M. Depletion of nuclear poly ADP-ribose polymerase by antisense RNA expression: influences on genomic stability, chromatin organization and carcinogen cytotoxicity. *Cancer Res* 1994; 54: 4627-34.
9. Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G, Ménissier de Murcia J. A dominant-negative mutant of human poly (ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and chromosomal stability following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 11: 4753-7.
10. Griffin RJ, Srinivasan S, White AW, Bowman K, Calvert AH, Curtin NJ, Newell DR, Golding BT. Novel benzimidazole and quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase. *Pharm Sci* 1996; 2: 43-7.
11. Suto MJ, Suto CM. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase: potential chemotherapeutic agents. *Drugs Fut* 1991; 18: 723-39.

■■■■ **Le gène MDA-7: membre d'une nouvelle classe de gènes supprimeurs de tumeurs?**

Le cancer résulte d'un processus multifactoriel qui implique, en particulier, le jeu de gènes régulateurs (positifs et négatifs) de la croissance et de la différenciation cellulaires, gènes dont la liste ne cesse de s'allonger. C'est ainsi qu'aujourd'hui le gène *MDA-7* (*melanoma differentiation-associated*) apparaît comme nouveau prétendant à la fonction de gène suppresseur de tumeurs. Identifié et cloné à partir de mélanomes humains en tant que gène de différenciation spécifique, *MDA-7* exerce des effets inhibiteurs puissants sur la croissance des mélanomes et contribue à la différenciation terminale des mélanocytes [1]. Alors que la structure de la protéine *MDA-7* ne laisse présager aucune fonction connue, sa synthèse dans les mélanomes métastatiques humains est généralement beaucoup plus faible que dans les cellules normales [1]. Des expériences de transfection du gène *MDA-7* dans des cultures cellulaires réalisées par une équipe new-yorkaise démontrent aujourd'hui la capacité de *MDA-7* d'inhiber (de 3 à 15 fois) la croissance de cellules cancéreuses humaines dérivées de différents tissus comme la glande mammaire, le tissu nerveux, le côlon, la prostate ou le col de l'utérus [2]. Sur des cellules normales (cellules humaines de peau ou de glande mammaire, fibroblastes de rat), en revanche, l'effet inhibiteur du gène *MDA-7* est très faible. L'analyse d'un clone stable recombinant de la lignée humaine HeLa (issue d'un cancer du col de l'utérus) surexprimant le gène *MDA-7*, démontre que la synthèse active de la protéine *MDA-7* s'accompagne d'une diminution importante de la croissance cellulaire et de l'altération du phénotype des cellules transformées, phénomène qui peut être partiellement inversé par la transfection d'une construction antisens du gène *MDA-7*. L'expression ectopique du gène transfecté dans des cellules cancéreuses de prostate humaine (à l'aide d'un vecteur d'expression sen-

sible à la dexaméthasone) conduit également à l'inhibition de la croissance cellulaire. Les effets antiprolifératifs du gène *MDA-7*, dans les modèles cellulaires étudiés, étant sans relation directe avec l'expression normale ou anormale des gènes suppresseurs de tumeurs les plus étudiés, *P53* ou *RB*, les mécanismes impliqués dans la fonction de *MDA-7* restent totalement énigmatiques. Néanmoins, il semble d'ores et déjà important de vérifier si l'expression de ce gène, présumé suppresseur de tumeurs, est altérée voire éteinte dans les tumeurs humaines.

- [1. Jiang H, *et al. Oncogene* 1995 ; 11 : 2477-86.]
- [2. Jiang H, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 9160-5.]

■■■■ **La protéine BRCA1: en fait, une phospho-protéine nucléaire.**

médecine/sciences s'est récemment fait l'écho des résultats très étonnants suggérant que les produits des gènes de susceptibilité au cancer du sein, et plus particulièrement *BRCA1*, pouvaient appartenir à la famille des granines et être sécrétés (*m/s n° 6-7, vol. 12, p. 812*). Cependant, ces résultats en contredisaient d'autres qui assignaient à la protéine *BRCA1* une localisation nucléaire, et un poids moléculaire de 190 ou 220 kDa, suivant les équipes. Dans cette optique, les résultats de Chen *et al.* (San Antonio, TX, USA) semblaient particulièrement intéressants [1]: en effet, ces auteurs montraient que dans des cancers sporadiques, sans mutation du gène *BRCA1*, la protéine était localisée de façon anormale dans le cytoplasme. Cette anomalie de localisation semblait extrinsèque à *BRCA1*, puisqu'on la retrouvait avec une protéine recombinante normale synthétisée dans les cellules cancéreuses par l'intermédiaire d'un vecteur d'expression [2]. En revanche, d'autres auteurs ne retrouvaient pas ces résultats, observant une localisation nucléaire de *BRCA1* dans les cellules cancéreuses

aussi bien que normales [3]. Dans un récent article, Chen *et al.* apportent des renseignements complémentaires et convaincants semblant indiquer que la protéine *BRCA1* est bien nucléaire [4]. Les auteurs ont utilisé trois anticorps polyclonaux dirigés contre des régions différentes de la protéine, et on pu démontrer leur spécificité. Les résultats obtenus à l'aide de ces trois anticorps sont identiques. *BRCA1* est une protéine nucléaire de 220 kDa qui interagit avec des kinases liées au cycle cellulaire (*Cdk*, notamment *Cdk2*) et est phosphorylée au cours du cycle cellulaire. La quantité de *BRCA1* et sa phosphorylation augmentent durant les phases S et M du cycle cellulaire [4]. Peut-on tirer une leçon de ces résultats contradictoires? A en croire la majorité des auteurs, il semble bien que *BRCA1* ne soit pas une protéine sécrétée, mais bien une protéine nucléaire, dont on apprend aujourd'hui qu'elle est la cible des kinases liées au cycle cellulaire. *BRCA1* pourrait bien être, comme on le suspecte depuis le début, un facteur de transcription. D'ailleurs, un domaine d'activation transcriptionnelle vient d'être identifié à son niveau [5].

- [1. Chen Y, *et al. Science* 1995 ; 270 : 279-91.]
- [2. Chen Y, *et al. Science* 1996 ; 272 : 125-6.]
- [3. Scully R, *et al. Science* 1996 ; 272 : 123-5.]
- [4. Chen Y, *et al. Cancer Res* 1996 ; 56 : 3168-72.]
- [5. Chapman MS, Berma IM. *Nature* 1996 ; 382 : 678-9.]

■■■■ **Le virus SV40 est-il aussi un oncovirus humain?**

Tout le monde se rappelle l'épisode de la vaccination antipoliomyélitique utilisant des virus produits par culture sur cellules de rein de singe... infectées par le virus Simien 40 (SV40). Entre 1956 et 1963, on estime que, rien qu'aux États-Unis, 30 millions de personnes, ont été contaminées par des vaccins

contenant des particules virales intactes de SV40. Les conséquences de cet épisode ne sont cependant pas encore connues mais les arguments s'accumulent pour indiquer que le virus SV40 pourrait être un oncovirus chez l'homme, comme il l'est avec une très grande efficacité chez le hamster. En effet, des hamsters recevant des particules virales SV40, développent, dans les 6 mois, des épéndymomes, des tumeurs du plexus choroïde, des ostéosarcomes, des mésothéliomes, des sarcomes et des lymphomes histiocytiques. La première alerte véritable date de 1992 lorsque Bergsagel *et al.* publièrent dans le *New England Journal of Medicine* que des épéndymomes et des tumeurs du plexus choroïde chez l'homme contenaient et exprimaient des séquences SV40 [1]. En 1994, Carbone *et al.* rapportaient les mêmes résultats sur des mésothéliomes humains, dont 29 sur 48 contenaient et exprimaient de telles séquences [2]. De plus, certains de ces malades développaient des anticorps dirigés contre l'antigène T du virus SV40. Un peu plus tard, en 1995, Lednicky *et al.* montraient la présence dans certaines tumeurs du plexus choroïde d'ADN épisomique entier, et étaient même capables d'isoler une fois du virus infectieux [3]. Enfin, Carbone *et al.*, dans *Oncogene*, viennent de retrouver des séquences de ce virus dans 40 ostéosarcomes analysés sur 126 et dans 14 tumeurs osseuses d'autres origines sur 34 [4]. En revanche, la recherche était négative dans d'autres types de tumeurs comme des cancers du poumon ou du rein. L'ADN viral était détecté grâce à la PCR, ce qui exigeait que les auteurs vérifiasent qu'il ne s'agissait pas là d'un artefact dû à une contamination. Plusieurs arguments vont en ce sens. L'un d'entre eux est que l'ADN détecté est parfois remanié, mais contient en tout cas toujours la partie de l'antigène T capable de lier la protéine Rb et qui est aussi importante pour le pouvoir oncogénique. Dans une autre étude non encore publiée mais rapportée à un congrès,

Carbone et ses collaborateurs ont montré dans des cellules issues de mésothéliomes humains que la présence de séquences du virus SV40 coïncidait souvent avec la présence d'une quantité augmentée de la protéine p53, probablement complexée sous une forme inactive par l'antigène T. Formellement, ces différents résultats ne prouvent pas que les cancers considérés sont bien dus à la présence de séquence du virus SV40, mais le suggèrent très fortement puisque les tumeurs observées positives pour ces séquences sont assez exactement superposables à celles qui apparaissent spontanément après infection du hamster par le virus. On ne sait pas non plus s'il existe d'autres sources potentielles d'infection que la vaccination ancienne par les lots contaminés de virus anti-poliomyélitique.

- [1. Bergsagel L, *et al.* *N Eng J Med* 1992; 36: 988-93.]
- [2. Carbone M, *et al.* *Oncogene* 1994; 9: 1871-90.]
- [3. Lednicky JA, *et al.* *Virology* 1995; 212: 710-7.]
- [4. Carbone M, *et al.* *Oncogene* 1996; 13: 527-35.]

■■■■ **Les grandes souris déficientes en p27^{Kip1}.** Il existe deux familles d'inhibiteurs des kinases liées au cycle cellulaire (kinase Cdk) : la famille Ink et la famille Kip/Cip [1]. La première comporte les facteurs p16^{Ink4A}, p15^{Ink4B}, p18^{Ink4C}, p19^{Ink4D}, qui sont des inhibiteurs spécifiques des complexes liés à la cycline D. La famille Kip/Cip comporte trois membres, p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} et p27^{Kip2}, qui sont des inhibiteurs de pratiquement tous les complexes kinases. Un rôle particulièrement important de p27^{Kip1} a été décrit dans l'inhibition du cycle cellulaire en réponse à des agents extérieurs tels que l'AMP cyclique, le TGFβ et l'immunosuppresseur rapamycine. Trois équipes américaines ont publié simultanément dans la revue *Cell* le phénotype des souris totalement déficientes en

p27^{Kip1}, obtenues par recombinaison homologue [2-4]. Les descriptions des phénotypes de ces animaux sont concordantes : les souris sont grandes, avec un excès moyen de poids d'environ 30 % pour les homozygotes et des chiffres intermédiaires pour les hétérozygotes. L'hypertrophie concerne tous les organes et elle est associée, au niveau de l'hypophyse, à une hyperplasie nodulaire du lobe intermédiaire, sans hypersécrétion d'hormone de croissance. Par ailleurs, les souris femelles sont stériles par anomalie de la maturation des follicules ovariens. Le même type de tumeurs de la *pars intermedia* est observé chez les souris hétérozygotes pour l'inactivation d'un allèle du gène *Rb*. Cela indique probablement que les protéines Rb et p27^{Kip1} interviennent, au niveau de l'hypophyse, dans la même voie de contrôle du cycle cellulaire. Cela n'est pas étonnant puisque l'on sait que l'activité de Rb sur le blocage du cycle cellulaire en G1 est contrôlée par sa phosphorylation par des Cdk. Par conséquent, le déficit en protéine Rb ou l'impossibilité d'inhiber sa phosphorylation inactivatrice en cas d'absence de p27^{Kip1} peuvent avoir le même effet dans certains tissus cibles.

- [1. Darbon J, *et al.* *médecine/sciences* 1995; 11: 349-56.]
- [2. Fero M, *et al.* *Cell* 1996; 85: 733-44.]
- [3. Kiyokawa H, *et al.* *Cell* 1996; 85: 721-32.]
- [4. Makayana K, *et al.* *Cell* 1996; 85: 707-20.]

m/s

octobre 1996

**Vient de paraître
Numéro spécial**

**30 ANS DE RECHERCHE
AU DÉPARTEMENT
DES SCIENCES
DE LA VIE DU CNRS**