#240

Bulletin et Mémoires
DE
L'ACADÉMIE ROYALE DE MÉDECINE
DE
BELGIQUE

Volume 140 — Année 1985 — N° 1-2-3
Séance du 26 janvier 1985

(pages 108 à 112)

EXTRAIT

L'ENTRETIEN DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE DANS LES CELLULES DES MAMMIFÈRES

par

W.G. VERLY (Liège).

PALAIS DES ACADÉMIES
1000 BRUXELLES

Bull. Acad. Méd. Bel., 140 : 108-112 (1985)

L'ENTRETIEN DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE DANS LES CELLULES DES MAMMIFÈRES

par

W. G. VERLY (Liège)*

Les molécules de DNA sont constituées de deux chaînes polynucléotidiques complémentaires; elles contiennent donc deux exemplaires de la même information génétique. Cette duplication permet à la molécule de DNA de se multiplier; elle permet aussi de la réparer. Le principe de la réparation est simple : on excise un morceau de chaîne contenant la lésion; il est ensuite resynthétisé, la chaîne complémentaire intacte jouant le rôle de matrice.

Le DNA est fragile; il subit continuellement des altérations spontanées dont la plus fréquente est la perte de bases, c'est-à-dire des lettres qui servent à écrire l'information génétique. On calcule que le DNA d'un neurone de 50 ans aurait perdu 1 base sur 40 s'il n'avait pas été continuellement réparé; la cellule ne pourrait donc plus synthétiser la moindre protéine correcte.

La perte d'une base (purine ou pyrimidine) laisse, dans la chaîne de DNA, un site AP (apurinique ou apyrimidinique). L'entretien de l'information génétique consiste principalement à réparer du DNA qui a perdu des bases. Nous avons découvert, il y a 15 ans, un enzyme qui coupe les chaînes de DNA spécifiquement près des sites AP (Verly et Paquette, 1970). Cet enzyme, appelé AP endonucléase, a été trouvé dans toutes les cellules animales, végétales ou bactériennes qui ont été examinées (Verly *et al.*, 1973).

Chez la bactérie *Escherichia coli,* la réparation des sites AP se fait de la manière suivante (Gossard et Verly, 1978) : l'AP endonucléase (endonucléase VI) coupe la chaîne de DNA du côté 5' du site AP et, par son activité d'exonucléase 3'-5' (exonucléase III), élargit l'incision (cet élargissement empêche la DNA ligase de refermer l'incision); la DNA polymérase I remplit la brèche, déplace le site AP et, par son activité d'exonucléase 5'-3', l'excise lié à un nucléotide; le nouveau segment est soudé au reste de la chaîne par la DNA ligase. Le DNA se retrouve tel qu'il était avant de perdre une base.

---

* Invité par le Bureau en vertu de l'article 84 du Règlement.

Plus récemment, nous nous sommes attachés à l'étude de la réparation du DNA nucléaire dans les cellules de mammifères. Le foie de rat est très riche en AP endonucléases et plus de 90 % de l'activité résident dans la chromatine. On trouve, dans d'autres compartiments cellulaires, des AP endonucléases qui sont probablement les précurseurs de l'enzyme chromatinien (Thibodeau et Verly, 1980).

L'AP endonucléase chromatinienne de foie de rat coupe les chaînes de DNA près des sites AP au même endroit que l'enzyme bactérien, mais elle est dépourvue d'activité exonucléolytique (César et Verly, 1983); la DNA ligase peut refermer l'incision et faire avorter la réparation (Goffin et Verly, 1983). Pour réparer du DNA contenant des sites AP avec des enzymes extraits de la chromatine, nous avons dû procéder en deux étapes (Goffin et Verly, 1982) : le DNA est d'abord incubé avec l'AP endonucléase qui incise du côté 5' du site AP et l'exonucléase 5'-3' qui l'excise; après inactivation de ces deux enzymes, la brèche est comblée par la DNA polymérase ß et la DNA ligase.

On sait que, pour réparer le DNA nucléaire, il est nécessaire de faire disparaître l'organisation nucléosomique de la chromatine; cette modification conformationnelle est provoquée principalement par la poly(ADP-ribose) polymérase qui est activée par les interruptions dans les chaînes du DNA. Une hypothèse serait que cette transconformation pourrait ordonner les étapes de la réparation comme nous sommes obligés de le faire *in vitro*.

Après l'incision du DNA près des sites AP par l'AP endonucléase chromatinienne, l'exonucléase 5'-3' n'hydrolyse pas la liaison phosphodiester qui se trouve de l'autre côté du site AP, ce qui aurait fait apparaître un 3'-hydroxyle; elle la rompt par un mécanisme de ß-élimination qui donne une double liaison 2'-3' (Grondal-Zocchi et Verly) (1985). Cette observation étonnante nous oblige à concevoir d'une tout autre manière la réparation des sites AP *in vivo*. En effet, dans la chromatine, les histones et les polyamines sont des catalyseurs de ß-élimination beaucoup plus puissants que l'exonucléase 5'-3'. Il semble donc que des molécules que l'on n'a pas l'habitude de considérer comme des enzymes puissent jouer un rôle important dans l'entretien de l'information génétique.

Le modèle de réparation que nous sommes en train de vérifier

peut se résumer ainsi : le site AP apparaît dans la chromatine organisée en nucléosomes; il y a toujours un groupe -NH_2 appartenant à une histone ou une polyamine suffisamment près pour catalyser la rupture de la chaîne de DNA du côté 3' du site AP par un mécanisme de ß-élimination; la cassure stimule la poly(ADP-ribose), polymérase qui décondense la chromatine; l'AP endonucléase peut alors se déplacer, trouver le site AP et couper la chaîne du côté 5' de celui-ci pour le libérer; après le départ du site AP, la DNA polymérase ß remplace le seul nucléotide manquant et la DNA ligase termine la réparation; l'activité de la poly(ADP-ribose) polymérase diminue et la chromatine se recondense.

RÉSUMÉ

Le DNA subit continuellement des altérations spontanées dont la plus fréquente est la perte de bases. La chromatine contient tous les facteurs nécessaires pour entretenir le DNA nucléaire; les histones et les polyamines pourraient jouer le rôle de catalyseurs d'une étape de la réparation du DNA qui a perdu des bases. Les étapes de cette réparation doivent se succéder dans un ordre précis qui dépendrait de modifications conformationnelles de la chromatine.

SUMMARY

The loss of bases is the most common spontaneous alteration of cellular DNA. All the repair factors necessary for the maintenance of nuclear DNA are in chromatin; histones and polyamines might catalyze one step of the repair. The order of the successive steps of DNA repair might be linked to chromatin conformational changes.

BIBLIOGRAPHIE

Cesar R. et W.G. Verly. The AP endonuclease of rat liver chromatin. *Eur. j. Biochem., 129:* 509-516 (1983).

Goffin C. et W.G. Verly. Excision of AP sites from DNA with enzymes isolated from rat liver chromatin. *Eur. j. Biochem., 127:* 619-623 (1982).

Goffin C. et W.G. Verly. DNA ligase can seal a nick in double-stranded DNA limited by a 5'-phosphorylated base-free deoxyribose residue. *Nucleic acids res., 11:* 8103-8109 (1983).

Gossard F. et W.G. Verly. Properties of the main endonuclease for AP sites of *Escherichia coli* (endonuclease VI). Mechanism of AP sites excision from DNA. *Eur. j. Biochem., 82:* 321-332 (1978).

Grondal-Zocchi G. et W.G. Verly. Deoxyribonuclease IV from rat liver and the excision of AP sites from depurinated DNA. *Biochem. j., 225:* 535-542 (1985).

Thibodeau L. et W.G. Verly. Cellular localization of the AP endonucleases in rat liver. *Eur. j. Biochem., 107:* 555-563 (1980).

Verly W.G. et Y. Paquette. *Escherichia coli* nuclease for depurinated sites in alkylated DNA. *Can. fed. biol. soc.*, 685 (1970).

VERLY W.G., Y. PAQUETTE et L. THIBODEAU. Nuclease for DNA apurinic sites may be involved in the maintenance of DNA in normal cells. *Nature, 244:* 67-69 (1973).

(Service de Biochimie, Faculté des Sciences de l'Université de Liège au Sart Tilman.)

Discussion

M. le Président. — Je remercie M. Verly pour cet exposé passionnant qui semble suggérer que c'est cette capacité de réparation de DNA qui, pour chaque espèce, contrôle la longueur de vie caractéristique de l'espèce. Ces mécanismes que vous définissez, vous, M. Verly, comme simples, paraissent tout de même assez compliqués et remplissent à la fois d'admiration et d'étonnement.

M. J.-M. Ghuysen. — Je voudrais demander à M. Verly quelle est son opinion sur la spécificité d'action des histones, dans la β-élimination? Est-ce que toutes les histones sont actives et a-t-on quelqu'idée de leur efficacité catalytique pour cette réaction de β-élimination qui serait la première étape de la réparation des sites sans base dans la chromatine?

M. W. Verly. — La β-élimination demande la soustraction d'un proton qui se trouve en position 2' du sucre sans base. Pour catalyser la réaction, il suffit d'une fonction amine non protonée qui puisse approcher suffisamment près. Des fonctions amines à pKa suffisamment bas pour n'être pas complètement protonées au pH nucléaire existent dans toutes les histones. Nous avons montré que l'histone HI catalyse facilement cette β-élimination, mais nous n'avons pas encore de résultat sur l'efficacité des autres histones, organisées ou non en octamères.

La réaction de β-élimination est toutefois une réaction lente si on la compare à la rapidité de la coupure du côté 5' du site sans base par l'AP endonucléase. Mais notre hypothèse est que, dans la chromatine condensée (c.-à-d. organisée en nucléosomes), on dispose de tout le temps nécessaire pour que cette coupure du côté 3' du site sans base par β-élimination, qui serait la première étape de la réparation, puisse avoir lieu.

M. H. Van Cauwenberge. — M. Verly, que je tiens à féliciter pour son remarquable travail, a parlé d'enzymes agissant sur les mécanismes qu'il nous à décrits. Je voudrais lui demander si des hormones, p. ex. l'aldostérone ou d'autres, peuvent influencer ces processus?

M. W. Verly. — Je ne connais pas de travaux où cet aspect de la question aurait été étudié.

M. H. Kulbertus. — Comment peut-on expliquer que l'existence d'une brèche puisse aboutir à la stimulation d'une polymérase?

M. W. Verly. — A l'extrémité de la brèche créée par l'exonucléase, se trouve une extrémité 3'-OH qui sert de point de départ pour la synthèse de DNA par la polymérase qui remplit la brèche en utilisant l'autre chaîne, intacte, comme matrice.

M. A. Burny. — Je félicite M. Verly pour la qualité du travail présenté. Ma question est la suivante : comment se fait-il que la β-élimination ne se produise pas chez les bactéries, alors qu'elles possèdent, elles aussi, de la chromatine?

M. W. Verly. — Le processus de β-élimination se produit certainement chez les bactéries, mais la coupure du côté 5' par l'AP endonucléase suivie d'excision du site sans base, par l'activité d'exonucléase 5'-3' de la DNA polymérase I, est tellement plus rapide qu'on peut l'ignorer. Des auteurs ont récemment décrit des AP endonucléases qui couperaient du côté 3' des sites sans base, notamment chez les bactéries. Nos travaux montrent qu'il ne s'agit pas d'hydrolases, comme le prétendent ces auteurs, mais de catalyseurs de β-élimination.

*
**