

affectée, notamment celle du rein qui se développe anormalement en l'absence de Robo-2 [7]. C'est cependant des souris déficientes en Robo-3 que sont venus les résultats les plus inattendus: les axones commissuraux de la moelle épinière ne sont plus capables de croiser la plaque du plancher [6]. Qu'en est-il des autres axones commissuraux du cerveau? Notre équipe a étudié plusieurs populations de neurones du tronc cérébral qui envoient des axones dans le cervelet, d'où leur nom de neurones précérébelleux, et ont un rôle important dans le contrôle des mouvements et de l'équilibre [8]. Tous ces neurones projettent leurs axones à travers la plaque du plancher. En outre, pendant le développement, le corps cellulaire de certains neurones précérébelleux va aussi migrer à travers la ligne médiane. Nous avons montré que tous les neurones précérébelleux expriment fortement Robo-3/Rig-1 jusqu'à ce que leurs axones ou leurs corps cellulaires aient croisé la ligne médiane. Chez les souris déficientes en Robo-3, ni les axones des neurones précérébelleux, ni leurs corps cellulaires ne traversent la plaque du plancher [8]. Le phénotype est donc identique à celui qui est observé pour les axones de la moelle épinière. Ces résultats sont surprenants car ils font de Robo-3 un régulateur négatif de l'activité inhibitrice des Slit, ce qui est inhabituel pour un récepteur Robo classique. Le mode d'action de Robo-3 reste hypothétique, mais l'on pense qu'il pourrait bloquer l'activation par Slit des

autres récepteurs Robo. La concentration élevée de Robo-3 sur les axones qui s'approchent de la ligne médiane rendrait ces derniers insensibles à l'action répulsive des Slit. Une fois celle-ci franchie, l'extinction rapide de l'expression de Robo-3 permettrait l'activation des autres récepteurs Robo, contraignant ainsi les axones à s'éloigner de la ligne médiane. Chez les souris déficientes en Robo-3, les axones sont repoussés prématurément et ne peuvent approcher la ligne médiane. Une autre surprise de taille est venue de l'étude génétique d'un syndrome humain rare [9], associant une paralysie des mouvements oculaires horizontaux à une forte scoliose (*horizontal gaze palsy with progressive scoliosis*). Chez ces patients, des analyses d'imagerie cérébrale par RMN (résonance magnétique nucléaire) ont montré une atrophie du noyau abducens, dont les neurones moteurs contrôlent les muscles oculaires responsables des déplacements horizontaux de l'œil. Ces travaux ont aussi mis en évidence une forte atrophie d'un groupe de neurones précérébelleux constituant les noyaux du pont. Enfin, l'analyse de la conduction des informations sensorielles ascendantes proprioceptives (toucher) et des informations motrices descendantes (faisceau corticospinal) a montré que, chez les patients atteints, les axones transmettant ces informations ne traversent pas la ligne médiane contrairement aux individus normaux. L'analyse génétique de dix familles de patients a révélé que tous sont

porteurs de mutations dans le gène codant pour l'homologue humain de Robo-3. Les patients sont tous homozygotes pour l'allèle muté et les individus hétérozygotes sont normaux. Ces résultats confirment donc que l'expression de Robo-3 par les neurones commissuraux est nécessaire au croisement de la ligne médiane et que cette fonction est conservée dans l'évolution. ♦

Axone guidance at the midline gets more complex

RÉFÉRENCES

1. Wang B, Xiao Y, Ding BB, *et al.* Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 2003; 4: 19-29.
2. Bagri A, Marin O, Plump AS, *et al.* Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 2002; 33: 233-48.
3. Nguyen-Ba-Charvet KT, Plump AS, Tessier-Lavigne M, Chedotal A. Slit1 and Slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci* 2002; 22: 5473-80.
4. Plump AS, Erskine L, Sabatier C, *et al.* Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 2002; 33: 219-32.
5. Long H, Sabatier C, Ma L, *et al.* Conserved roles for slit and robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron* 2004; 42: 213-23.
6. Sabatier C, Plump AS, Ma L, *et al.* The divergent Robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 2004; 117: 157-69.
7. Grieshammer U, Le MA, Plump AS, *et al.* Slit2-mediated Robo2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 2004; 6: 709-17.
8. Marillat V, Sabatier C, Failli V, *et al.* The Slit receptor Rig-1/Robo3 controls the development of precerebellar neurons. *Neuron* 2004; 43: 69-79.
9. Jen JC, Chan WM, Bosley TM, *et al.* Mutations in a human ROBO gene Disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science* 2004; 304: 1509-13.

NOUVELLE

Trois brins d'ADN dans le centre catalytique des ADN polymérase

Patrick Lestienne

> Depuis plus de 40 ans, on admet que les ADN polymérase ne contiennent que deux brins d'ADN dans leur centre actif : le brin modèle et le brin en cours de synthèse.

Nous montrons dans ce travail qu'à partir d'une amorce formant une triple hélice, il est possible de répliquer de l'ADN en double brin si une certaine instabilité est localisée

à proximité du site d'initiation de la réplication. Par conséquent, les ADN polymérase peuvent accommoder transitoirement trois brins d'ADN au lieu de deux comme cela est communément admis.

Les conséquences portent à la fois sur les systèmes de réparation, voire des mécanismes de réarrangements de l'ADN. Des hypothèses évolu-

Laboratoire de pharmacologie des agents anticancéreux, FRE 2618 CNRS, Institut Bergonié, 229, cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux, France. lestienne@bergonie.org

tives sur la structure des amorces permettant l'initiation de la réplication sont aussi proposées.

La longue course pour la détermination de la structure de l'ADN, débutée il y a un peu plus de 50 ans, a été marquée par des erreurs d'interprétation de modèles tels celui de Linus Pauling qui proposa une triple hélice hélicoïdale avec les groupements phosphates au centre de la molécule. En revanche, le dénouement, qui mit du temps à se faire admettre par la communauté scientifique, eut lieu

avec l'aide des clichés de diffraction des rayons X effectués par Rosalind Franklin dans le laboratoire de Maurice Wilkins à Cambridge, et interprétés avec intuition et justesse par Jim Watson et Francis Crick [1]. Néanmoins, des triples hélices ont été mises en évidence en 1957 par Alex Rich et ses collaborateurs [2] à l'aide d'un simple spectrophotomètre. En effet, la titration d'oligonucléotides de taille définie a montré que, pour un brin riche en poly(A), deux brins en poly(U) pouvaient former un complexe ternaire, probablement par l'interaction du 3^e brin dans le grand sillon de l'ADN formé du duplexe (A-U).

Pendant ce temps, Arthur Kornberg tentait d'élucider les mécanismes de réplication qui posaient de sérieux problèmes topologiques. Depuis l'ensemble de ses travaux, il est communément admis que des activités hélicases séparent la double hélice, et qu'une amorce, en général oligonucléotidique, s'apparie avec le simple brin. Les ADN polymérases incorporent alors à l'extrémité de l'amorce des désoxyribonucléotides monophosphates reliés par des liaisons phosphodiester complémentaires du brin à répliquer, formant ainsi une copie de la molécule en double brin initiale, permettant la transcription et la synthèse de protéines au

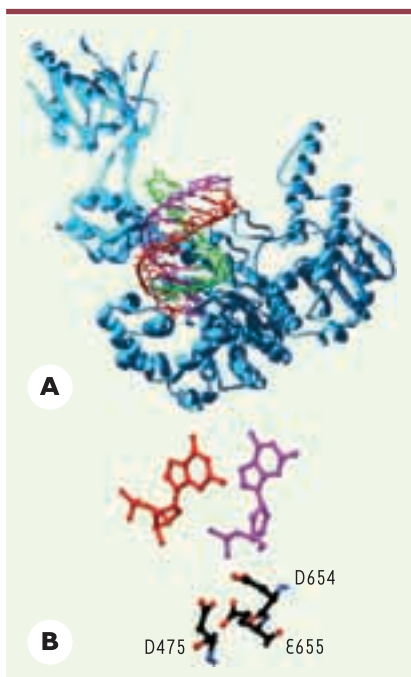


Figure 1. Représentation du complexe entre l'ADN polymérase du phage T7, d'après les données cristallographiques, et le complexe d'initiation comportant la triple hélice. La séquence de la triple hélice a été obtenue à partir des données cristallographiques, celles-ci étant représentées en rouge sur la figure. Le brin homologue est représenté en magenta, et le brin modèle à répliquer en vert. Les principaux acides aminés du centre catalytique sont représentés (Asp 475, Asp 654, Glu 655) ainsi que les bases terminales (didésoxyadénosine pour le brin amorce à ne pas répliquer en magenta, et en rouge pour l'extrémité 3' de la désoriboguanosine de l'amorce formant la triple hélice (d'après [5] avec la permission d'Oxford University Press).

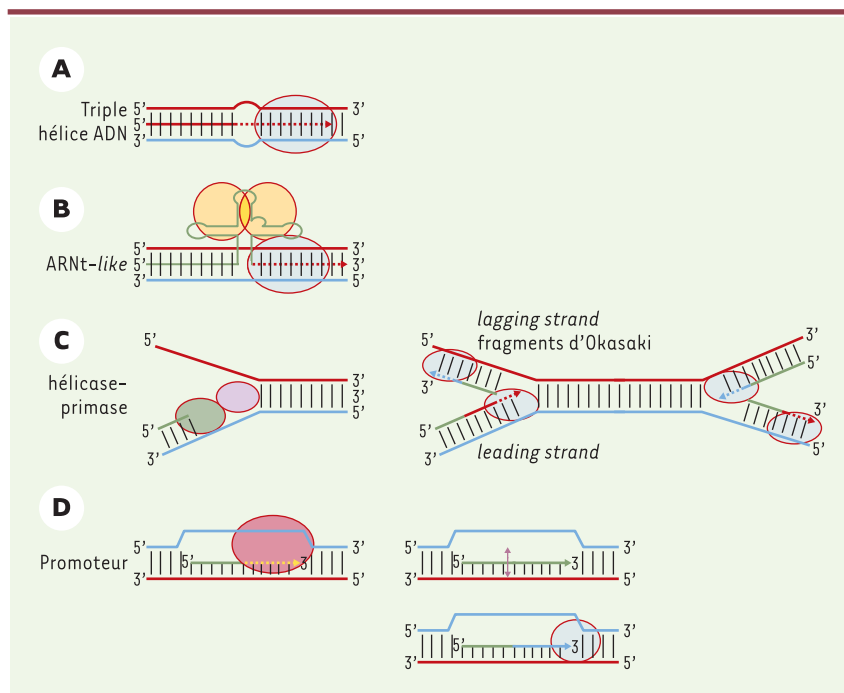


Figure 2. Évolution possible du système d'initiation de la réplication dans différents systèmes biologiques. **A.** Modèle proposé pour l'initiation de la réplication à partir d'une triple hélice. **B.** Compte tenu de la stabilité supérieure de l'ARN capable de déplacer l'ADN, notre schéma prévoit dans une deuxième étape l'initiation de la réplication à partir d'une triple hélice ARN. Il est cependant généralement admis que le monde à ARN a précédé celui du monde à ADN, et certaines structures en forme d'ARNt (extrémité de certains ARN viraux, ou initiation de la réplication de l'ADN mitochondrial des mammifères) pourraient débiter après synthèse d'une amorce rappelant les structures en forme d'ARNt. Ces structures sont néanmoins moins stables biochimiquement que l'ADN. **C.** Le système actuel le plus évolué implique la séparation de brins au moyen d'une activité hélicase, séparant chaque brin sur lequel se fixe l'amorce oligonucléotique. L'activité primase permet de former des fragments d'Okazaki pour la réplication du brin complémentaire de polarité 3' vers 5' (*lagging strand*). **D.** Bien que les données actuelles ne soient pas certaines, il est possible qu'à partir d'un promoteur, une RNase libère une extrémité 2' 3' OH capable d'être allongée par les ADN polymérases.

niveau des ribosomes grâce à des adaptateurs, les ARN de transfert.

Un problème difficile à concilier avec ce modèle concernait sa réplication, et ce n'est que grâce aux travaux pionniers d'Arthur Kornberg qu'une image progressive se dégagea [3]. La détermination de la structure cristallographique de différentes ADN polymérases montra leur ressemblance au niveau de leur mécanisme assuré par trois acides aminés et des cations métalliques ; il en est de même pour les ARN polymérases (Figure 1) [4]. Les ADN polymérases allongent une amorce oligonucléotidique et répliquent le simple brin modèle par l'incorporation de désoxynucléotides monophosphates complémentaires des bases exposées de l'ADN en simple brin [5] et, par conséquent, on admet qu'elles ne contiennent dans leur centre catalytique que le simple brin à répliquer et l'amorce en cours de synthèse.

Nous avons démontré que, contrairement aux données connues, une séquence riche en poly d(G) formant une triple hélice peut servir d'amorce à la réplication dans une configuration non canonique par rapport aux données des différentes publications. En effet, cette amorce est parallèle au brin homologue, tandis qu'en règle générale elle est anti-parallèle [6]. La réplication initiée à partir de l'amorce en triple brin avait été effectuée sur de l'ADN simple brin,

conformément aux données de la littérature.

Cependant, dans une seconde étape, nous avons utilisé un ADN en double brin comme modèle et nous avons étudié sa réplication à partir de l'amorce en triple hélice. Contrairement à ce qui est connu depuis 40 ans, nous avons démontré que la réplication a lieu si une certaine instabilité est localisée à proximité du complexe d'initiation de la réplication, même à 5 nucléotides en amont de ce complexe de réplication [7].

Ces observations nouvelles signifient que les ADN polymérases peuvent rompre les liaisons hydrogènes formant les paires de bases situées en amont du complexe de réplication, et ne nécessitent donc pas toujours une activité hélicase de déroulement des brins. Elles démontrent pour la première fois que les ADN polymérases peuvent accommoder transitoirement 3 brins d'ADN dans leur centre catalytique, contre 2 dans les conditions communément admises [7].

Ces résultats montrent aussi que si une ADN polymérase est associée à une séquence capable de former une triple hélice, elle peut s'associer à une séquence homologue, et envahir un ADN double brin si une certaine instabilité est présente à proximité du site d'initiation ; celle-ci peut être due à une variation de la superhélicité de l'ADN, ou liée à une mutation, ou à l'action de protéines.

Ce nouveau mécanisme pourrait aussi rendre compte de réarrangements génomiques, sans coupure de brins ; il pourrait être à l'origine de la dernière étape de la recombinaison homologue lors de la phase de réplication.

Concernant l'évolution des amorces de réplication, un schéma récapitule les différentes étapes où, contrairement à ce qui est couramment admis, l'ADN en triple hélice – moins stable que la complémentarité avec l'ARN, mais celui-ci étant beaucoup plus instable biochimiquement – pourrait avoir initié la réplication dans des systèmes anciens, comme l'indique la Figure 2.

Three DNA strands in the catalytic center of DNA polymerases

RÉFÉRENCES

1. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 1953; 421: 737-8.
2. Felsenfeld G, Davies DR, Rich A. Formation of a three-stranded polynucleotide molecule. *J Am Chem Soc* 1957; 79: 2023-24.
3. Kornberg A. *DNA replication*. San Francisco: Freeman, 1960.
4. Steitz TA, Smerdon SJ, Jäger J, Joyce CM. A unified polymerase mechanism for non homologous DNA and RNA polymerases. *Science* 1994; 266: 2022-5.
5. Kool ET. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 301-22.
6. Rocher C, Dalibard R, Letellier T, et al. Initiation of DNA replication by DNA polymerases from primers forming a triple helix. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3320-6.
7. Lestienne P, Pourquier P, Bonnet J. Elongation of oligonucleotide primers forming a triple helix on double-stranded DNA templates by purified DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 380-5.

NOUVELLE



Les multiples actions des facteurs de transcription FOXO

Anne Brunet

Department of Genetics,
Stanford University,
Stanford CA 94305,
États-Unis.
anne.brunet@stanford.edu

> Les facteurs de transcription de type *Forkhead* constituent un groupe d'une centaine de membres chez l'homme et possèdent des fonctions biologiques

variées qui vont de la formation des organes à l'acquisition du langage. Au sein de ce groupe, la famille FOXO comprend quatre membres: FOXO1, FOXO3, FOXO4 et

FOXO6. Les FOXO ont été particulièrement étudiés ces dernières années en raison de leur rôle pivot dans la voie de signalisation de l'insuline et des facteurs de croissance.