

L'ADN endommagé, un leurre pour le facteur général de transcription TBP/TFIID

Des lésions sur l'ADN, consécutives à des irradiations de type UV ou à un traitement par certains types d'agents antitumoraux, perturbent plusieurs mécanismes orchestrant la vie de la cellule. On peut ainsi observer un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ainsi qu'une diminution de la transcription, vraisemblablement consécutifs à la mise en place de la machinerie de réparation. Cet arrêt ou ce ralentissement dans la synthèse de l'ARN sera de courte durée puisque divers travaux ont montré une réparation plus rapide et donc plus efficace des lésions subies au niveau des gènes que celles localisées sur les régions silencieuses du génome [1].

En 1993, le lien entre ces deux mécanismes fondamentaux que sont la transcription et la réparation était enfin conforté; nous montrions le rôle indispensable de TFIID, défini comme étant un facteur général de la transcription des gènes codant pour les protéines, dans la réaction de réparation par excision de nucléotides (*m/s n°4, vol. 9, p. 485*) [2]. Ainsi il était tentant d'avancer, à l'appui de nos travaux, que lorsque TFIID, un facteur multiprotéique possédant plusieurs activités enzymatiques [3, 4], était requis pour réparer l'ADN endommagé par divers agents génotoxiques, il ne pouvait plus assurer pleinement sa fonction au niveau de la transcription. Cette hypothèse s'avérait plausible d'autant plus qu'aucune étude à ce jour n'avait fait état d'une surproduction réactionnelle du complexe TFIID permettant de subvenir aux besoins momentanés de la cellule en assurant conjointement les deux fonctions de réparation et de transcription. Il y

avait cependant quelques questions qui restaient sans réponse. En effet, comment pouvait-on expliquer qu'un même facteur, en l'occurrence TFIID, puisse intervenir sur deux cibles différentes, un promoteur de classe II et une lésion sur l'ADN avec, à chaque fois, des partenaires différents (des facteurs de transcription dans le premier cas, des facteurs de réparation dans le second cas). Il était ainsi tentant d'envisager l'exis-

tence d'au moins deux facteurs TFIID pouvant différer par un changement dans leur conformation ou leur composition, en cas de besoin ou en réponse à un stimulus extérieur.

TBP cible une lésion sur l'ADN

C'est dans cette perspective que nous avons mis au point un test de compétition entre la transcription et la

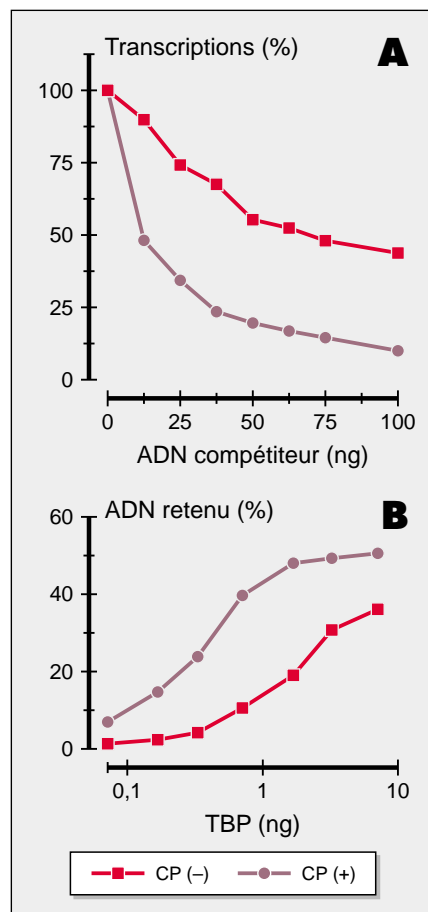


Figure 1. **A.** Représentation graphique de l'inhibition de la transcription d'un ADN rapporteur contenant le promoteur majeur tardif de l'adénovirus 2 par un ADN compétiteur endommagé (CP+) ou non (CP-) par le cisplatine. Un extrait total fait à partir de cellules HeLa est préincubé avec des quantités croissantes d'ADN compétiteur, avant l'ajout de l'ADN rapporteur et des nucléotides triphosphates permettant la synthèse de transcrits spécifiques. **B.** Représentation graphique des capacités de rétention sur filtre de nitrocellulose du facteur TBP par des quantités fixes d'ADN endommagé (CP+) ou non (CP-) par le cisplatine.

réparation (*transcription/repair competition assay*). En préincubant un extrait total de cellules HeLa avec des quantités croissantes d'un ADN préalablement endommagé par le cisplatine, nous constatons qu'il y avait diminution de la transcription d'un second ADN rapporteur, ce dernier contenant le promoteur majeur tardif de l'adénovirus (MLP). La même réaction menée en parallèle avec comme compétiteur un ADN témoin non endommagé permettait, quant à elle, une transcription consécutive du rapporteur MLP (*figure 1A*). Ce résultat nous amenait à conclure que l'ADN endommagé avait piégé, outre des facteurs nécessaires à la réparation du dommage lui-même, des composants nécessaires à la machinerie transcriptionnelle de base. Il était ainsi raisonnable de penser que, parmi ces facteurs de transcription, se trouvait TFIIF dont on savait que la fixation sur les lésions était catalysée par le facteur de réparation XPA. L'expérience de contrôle que nous avons réalisée nous a alors apporté quelques surprises. En effet, lorsque l'on substituait à l'extrait cellulaire total, un système dont on avait préalablement bien défini tous les constituants, à savoir les facteurs généraux de transcription TFIIA, IIB, IIE, IIF, IIH, TBP ainsi que l'ARN polymérase II, nous constatons toujours une diminution de la transcription du rapporteur MLP après la préincubation avec de l'ADN endommagé. Ainsi, il ne faisait plus aucun doute que l'ADN endommagé avait piégé directement un facteur général de transcription. Cela se vérifia aisément en ajoutant chacun des facteurs de transcription séparément ou conjointement à notre système préalablement inhibé. Nous constatons alors, contre toute attente, que c'était l'ajout de TBP ou du facteur natif TFIID, qui restaurait la transcription. Il nous fallait donc conclure que le facteur dénommé TBP (*TATA binding protein*) pour sa capacité de reconnaître la séquence promotrice TATA, avait une forte affinité pour l'ADN endommagé, ce que confirmaient les expériences de retard sur gel ou de rétention sur filtre de nitrocellulose (*figure 2B*). Il faut donc admettre qu'il peut y avoir

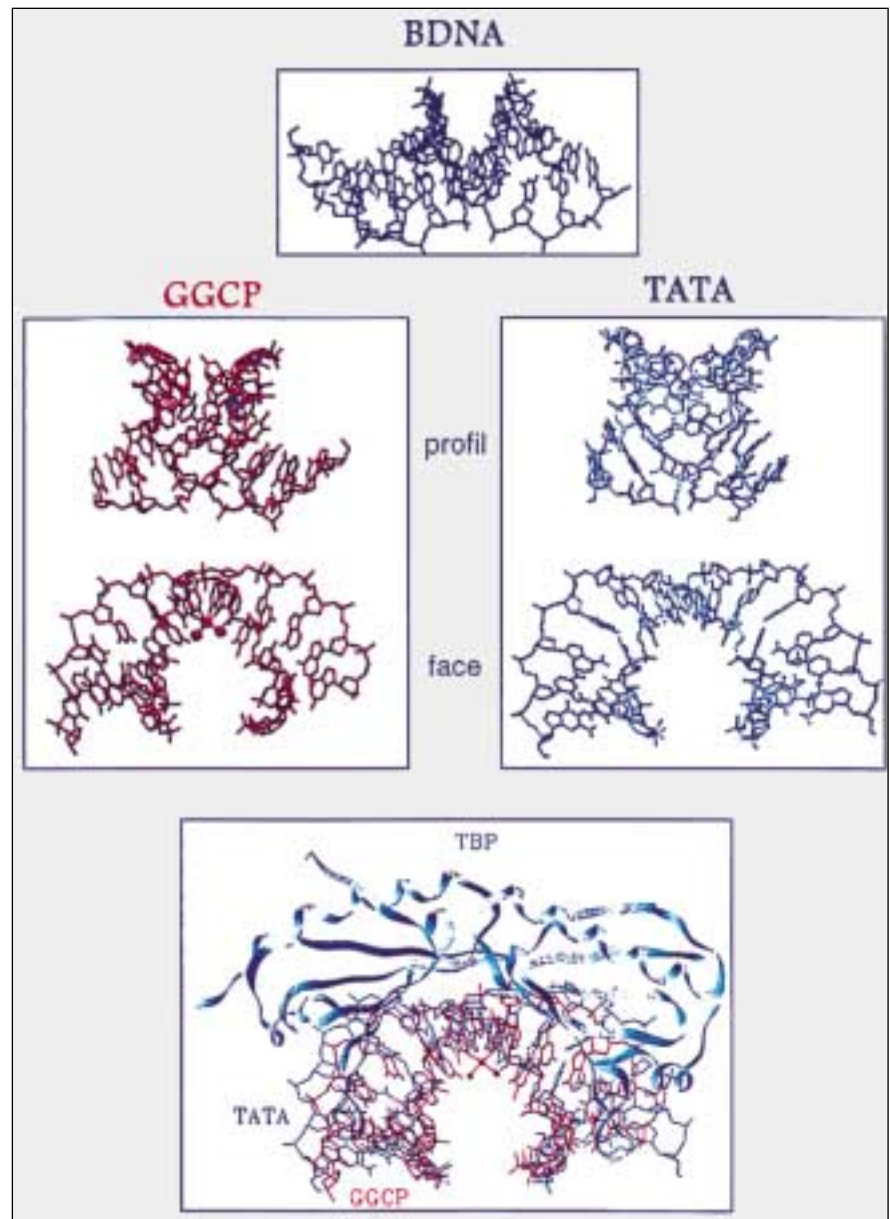


Figure 2. **Comparaison de la structure tridimensionnelle des trois dodécamères d'ADN double brin** : forme B linéaire (BDNA), boîte TATA courbée par la TBP (TATA) telle qu'elle est observée au sein du complexe TBP-TATA, et ADN courbé par une lésion induite par le cisplatine (GGCP), où l'ion platine est lié de manière covalente aux azotes N7 de deux guanines adjacentes, formant un « chélate G-G intrabrin », ainsi qu'à deux groupements amine (NH_2). Le platine et les groupements amine apparaissent comme des sphères rouges dans la vue de face et grises dans la vue de profil. Les trois oligonucléotides sont représentés « de profil » avec une orientation montrant la forme du petit sillon – étroit et profond dans le cas de BDNA, avec les paires de bases inaccessibles – ouvert et aplati dans le cas de TATA et de GGCP, avec les paires de bases accessibles et offrant une surface de contact hydrophobe importante. GGCP et TATA sont également représentés « de face » pour montrer la courbure générale de l'ADN. Finalement, la superposition de GGCP et du complexe TBP-TATA permet de voir l'adaptation aisée de la TBP à l'oligonucléotide platiné (panneau inférieur).

un facteur TBP/TFIID pour deux cibles ADN, différant non seulement par leur fonction mais encore par leur séquence.

Similitudes entre la boîte TATA et un oligonucléotide cisplatiné

La confirmation des données précédentes nous a été apportée par la comparaison de structures déjà présentes dans la *protein data bank*. Nous avons comparé la structure de la boîte TATA (l'oligonucléotide contenant la séquence TATA reconnue par la TBP) telle qu'elle est observée au sein du complexe avec la partie carboxy-terminale de la TBP humaine [5], à la seule structure disponible à ce jour d'un oligonucléotide double brin contenant un adduit intrabrin du cisplatine (où l'ion platine est lié de manière covalente aux atomes N7 de deux guanines adjacentes) [6]. L'oligonucléotide platiné est nommé GGCP pour chélate GG-cisplatine. La boîte TATA et GGCP présentent tous deux une conformation très déformée par rapport à la forme B (linéaire) de l'ADN [7]. Dans les deux structures, la double hélice est courbée d'environ 90° vers le grand sillon et en partie déroulée avec ouverture et aplatissement du petit sillon, le réseau de liaisons hydrogène de type Watson-Crick étant maintenu. Dans le complexe TBP-TATA, c'est la protéine qui déforme l'ADN, en particulier grâce à l'insertion de résidus phénylalanine entre des paires de bases entourant la séquence TATA centrale tandis que, dans l'adduit platiné, c'est la liaison du platine aux azotes N7 de deux guanines adjacentes qui provoque la distorsion. Les squelettes des deux oligonucléotides se superposent étonnamment bien (*figure 2, panneau inférieur*), leur conférant une forme générale commune malgré des différences dans l'orientation des paires de bases. La surface concave de la TBP s'adapte spectaculairement bien au sillon mineur aplati de l'oligonucléotide platiné, la surface enfouie calculée étant d'environ 2 700 Å² (sans optimisation) comparée à environ 3 100 Å² dans le complexe TBP-TATA. Dans les deux cas, les interactions sont essentiellement

des contacts de van der Waals entre des chaînes latérales de la protéine et les paires de bases de l'ADN devenues accessibles du côté du sillon mineur, ce qui va à l'encontre d'une spécificité de séquence et dénote plutôt une reconnaissance structurale. Dans le cas de la boîte TATA, c'est la « déformabilité » de la séquence qui est reconnue, plutôt que la séquence elle-même.

Nous proposons donc un modèle selon lequel la TBP se lie à l'ADN précourbé de façon « clé-serrure » (*lock-and-key*), tandis que la liaison à la boîte TATA résulterait d'une adaptation mutuelle (*induced fit*). L'affinité plus forte de la TBP pour l'ADN platiné que pour la boîte TATA, observée dans des tests de compétition (F. Coin et J.M. Egly, résultats non publiés), s'explique peut-être par le fait que, dans le premier cas, la protéine n'a pas à fournir d'énergie d'activation pour déformer l'ADN, conduisant à une vitesse d'association plus élevée.

La seule structure tridimensionnelle disponible d'un ADN contenant un dommage dû aux UV est la structure cristallographique d'un oligonucléotide comportant un dimère de thymine de type cyclobutane complexée avec l'endonucléase V du phage T4 [8]. Dans cette structure, la forme de l'ADN rappelle de nouveau fortement celle de la boîte TATA liée à la TBP. Même si le dimère de thymine subit dans ce cas des contraintes particulières propres à son interaction avec l'endonucléase, la similitude structurale suggère qu'un ADN comportant ce type de lésion pourrait, lui aussi, se courber vers le grand sillon par interaction avec la TBP en raison de l'instabilité conférée à la « marche » TT par la réticulation des deux thymines adjacentes.

L'ensemble de ces résultats concordait pour montrer que TBP pouvait se fixer aussi bien sur une séquence TATA promotrice que sur un ADN contenant un adduit cisplatiné ou un dimère de thymine. Mais qu'en était-il dans la réalité au niveau de la cellule ? Pouvait-on démontrer une interaction entre l'ADN endommagé et le facteur TBP/TFIID ? Des expériences menées en collaboration avec le groupe de J.H.J. Hoeijmakers à

Rotterdam, ont montré qu'une micro-injection de TBP préalable à l'irradiation de la cellule par des rayons UV limitait l'effet d'inhibition de la transcription. En effet, alors que dans des conditions expérimentales bien définies un traitement UV entraînait une perte d'activité transcriptionnelle de 50 %, une micro-injection de TBP réduisait cette inhibition à environ 25 %, soit un gain d'activité en valeur absolue de 50 % [9]. L'impossibilité de contrebalancer totalement l'effet d'inhibition de la transcription engendré par le traitement par les UV, peut s'expliquer, certes, par une non-optimisation de nos expériences. Il faut également garder présent à l'esprit que les divers agents génotoxiques perturbent également d'autres mécanismes. Par exemple, une diminution de la phosphorylation de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II a été observée après irradiation par les UV [10], ainsi que son ubiquitinylation (Bregman *et al.*, communication personnelle), deux phénomènes qui affectent l'initiation de la transcription.

TBP ne reconnaît pas une séquence mais une structure

Ainsi, la diminution de la transcription à la suite d'une agression de la cellule par des agents génotoxiques, pourrait s'expliquer, entre autres, par un déficit en facteur TBP/TFIID. Ce facteur aurait deux utilisations possibles : soit dans l'initiation de la transcription en se fixant sur une séquence consensus TATA, soit dans une interaction avec une région endommagée. Dans le premier cas, TBP, encouragée par la structure du promoteur lui-même et peut-être par celle des séquences et la présence de facteurs environnants, se lierait à la séquence TATA. Dans le second cas, l'ADN endommagé déjà courbé inviterait TBP au contact, servant ainsi de leurre. Sachant que TBP n'existe pas sous forme libre, mais associée à différentes autres protéines, on peut se demander lequel des divers complexes SL1, TFIID, TFIIB et TRF*

* TBP-related factor, un facteur contenant TBP et une autre catégorie de protéines, participant à la transcription de certains gènes de classe II.

[11], interagira avec l'ADN endommagé? On sait, expériences à l'appui, que TFIID interagira vraisemblablement avec la lésion, inhibant ainsi, du moins en partie, la transcription conduite par l'ARN polymérase II. En ce qui concerne les autres complexes, SL1 et TFIIB qui participent respectivement à la transcription des gènes de classe I et III, on peut penser que leur mode de reconnaissance de l'ADN endommagé, s'il existe, sera différent. Cela n'est de toute façon pas une surprise, sachant que ces facteurs déclenchent la transcription de gènes dépourvus de séquence consensus TATA. N'ayant pas à reconnaître des séquences TATA, leurs mécanismes d'action devraient être guidés par d'autres facteurs ou séquences promotrices; on voit d'ailleurs mal comment SL1 et TFIIB pourraient interagir avec des structures tridimensionnelles courbes proches de celles des ADN endommagés. Il se peut également que la diminution de la transcription ne concerne que certains types de gènes ciblés par TBP/TFIID.

A ce stade de la discussion, il faudrait peut-être se demander combien de lésions, sur l'ensemble du génome, seront créées par une irradiation de type UV ou un traitement par des agents antitumoraux? On estime qu'une irradiation de l'ordre de 30 J/m² ou que le traitement de cellules par le cisplatine (80 µg/ml), induit une lésion par 10-100 kb. Sachant que la cellule a un génome de l'ordre de 3000 Mb, et que les gènes représentent 5% de l'ensemble du génome dont un tiers avec une séquence TATA, on attend entre 0,1 et 1 lésion par séquence type boîte TATA existante. Devant une telle situation, une sorte de sélection dans la transcription s'instaurera. La compétition, en fait, ne s'exercera pas forcément entre ADN endommagé et séquence consensus TATA. Il est plus logique d'imaginer que s'établira un gradient dans l'utilisation du TBP fondé sur sa constante d'affinité pour l'ADN. Seront ciblés en premier les

promoteurs contenant une forte séquence TATA ainsi que certains ADN endommagés. Le complexe TFIID sera déficitaire pour une catégorie de promoteurs, principalement les promoteurs dits faibles; ces derniers ne pourront piéger TFIID (en raison de la forte demande vers les lésions), et donc transcrire en temps et en heure le gène correspondant. Cette hypothèse devra prendre en compte les constantes d'affinité de TBP/TFIID pour les séquences TATA et les lésions qui sont aussi fonction des séquences environnantes.

Nos travaux ont en fait démontré que le facteur TBP reconnaît une structure courbée plutôt qu'une séquence primaire de l'ADN, sachant également que cette interaction est favorisée par la séquence primaire. De plus, cette propriété du facteur TBP de se fixer à ces structures courbées pourra être utilisée pour évaluer le nombre et l'importance du dommage causé par différentes molécules naturelles ou synthétiques, une information fort utile pour la conception rationnelle de futurs agents anticancéreux ■

Remerciements

Nous souhaitons remercier Étienne Bergmann et Jérôme Auriol pour leur lecture critique de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 1985; 40: 359-69.
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, Chambon P, Egly JM: the basic transcription factor BTF2/TFIIH contains a helicase involved in both transcription and DNA repair. *Science* 1993; 260: 58-63.
- Hoeijmakers JHJ, Egly JM, Vermeulen W. TFIID: a key component in multiple DNA transactions. *Curr Opin Biol* 1996; 6: 26-33.
- Svejstrup JQ, Vichi P, Egly JM. The multiple roles of transcription/Repair factor TFIID. *Trends Biol* 1996; 21: 346-50.
- Juo ZS, Chiu TK, Leiberman PM, Baikakov I, Berk AJ, Dickerson RE. How proteins recognize the TATA box. *J Mol Biol* 1996; 261: 239-54.
- Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 1995; 377: 649-52.
- Drew HR, Wing RM, Takano T, Broka C, Tanaka S, Itakura K, Dickerson RE. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2179-83.
- Vassilyev DG, Kashiwagi T, Mikami Y, Ariyoshi M, Iwai S, Ohtsuka E, Morikawa K. Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: structural basis for damaged DNA recognition. *Cell* 1995; 83: 773-82.
- Vichi P, Coin F, Vermeulen W, Renaud JP, Hoeijmakers JHJ, Moras D, Egly JM. Cisplatin - and UV - damaged DNA lure the basal transcription factor TBP/TFIID. *EMBO J* 1997; 16 (sous presse).
- Adamczewski JP, Rossignol M, Tassan JP, Nigg EA, Moncollin V, Egly JM. MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light sensitive upon association with TFIID. *EMBO J* 1996; 15: 1877-84.
- Buratowsky S. Multiple TATA-binding factors come back into style. *Cell* 1997; 91: 13-5.

Frédéric Coin
Jean-Marc Egly
Jean-Paul Renaud
Dino Moras

Université Louis-Pasteur, Strasbourg, France et Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, France.

TIRÉS À PART

J.M. Egly.