

Le xeroderma pigmentosum, ou comment l'absence d'interaction entre une hélicase et son régulateur est à l'origine d'une maladie génétique

Le matériel génétique (ADN), contenu dans chacune de nos cellules, est constamment soumis à l'action d'agents génotoxiques d'origine exogène (rayonnements ultraviolets et ionisants, cancérigènes chimiques et composés antitumoraux) ou endogène (instabilité chimique des bases nucléiques et production de radicaux libres au cours du métabolisme cellulaire). Les modifications de l'ADN qui en résultent sont diverses; on peut observer la formation de dimères de thymine, de cassures double-brin de l'ADN, la perte ou l'insertion d'une ou plusieurs bases nucléiques. Ces dommages de la molécule d'ADN peuvent, entre autres, conduire à des changements dans la synthèse de certaines protéines, qui seront alors à l'origine de la transformation tumorale. Afin de maintenir l'intégrité du génome, la cellule dispose de nombreux systèmes de réparation qui lui permettent ainsi de lutter efficacement contre l'accumulation de lésions. Plus d'une centaine de gènes sont impliqués dans un réseau complexe de mécanismes très diversifiés et spécifiques de chaque type de lésion, dont le plus étudié est le système de réparation par excision-resynthèse de nucléotides (NER) [1]. Ce mécanisme implique différentes étapes dont la reconnaissance de la lésion, l'ouverture et l'excision du fragment d'ADN endommagé suivi de sa resynthèse [2].

Les lésions sur l'ADN affectent également d'autres mécanismes essentiels à la vie de la cellule, souvent à la suite de la mobilisation, par la machinerie de réparation, de facteurs

nécessaires à la transcription, la réplication ou la régulation du cycle cellulaire. Le complexe TFIIH fait partie de ces facteurs aux multiples fonctions. Étudié tout d'abord pour son rôle-clé dans la transcription des gènes codant pour les protéines, nous avons montré que ce facteur intervenait également dans la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire [3, 4]. Trois de ses sous-unités (il en comporte neuf), possèdent des activités enzymatiques: deux activités hélicases de sens opposé impliquées dans la séparation des deux brins d'ADN qui permettra, soit la lecture du brin codant au début de la transcription [5], soit l'excision du fragment lésé suivi de sa resynthèse lors de la réparation [6]; une activité kinase capable de phosphoryler, entre autres, le domaine carboxy-terminal de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II lors du début de la transcription.

Des mutations dans les gènes codant pour les deux hélicases de TFIIH sont à l'origine d'une maladie génétique autosomique récessive, le xeroderma pigmentosum (XP). Les malades XP présentent une photosensibilité extrême aux rayons ultraviolets avec des risques très élevés de développer des cancers de la peau. Ces derniers apparaissent très tôt chez l'enfant dont l'espérance de vie est réduite à 10 ans [7].

Bien qu'il soit communément admis que les mutations retrouvées chez les patients XP-D et XP-B affectent les capacités d'ouverture de la molécule d'ADN, propriété des hélicases par définition, les mécanismes moléculaires mis en jeu permettant d'expli-

quer la relation entre les mutations et les phénotypes des patients XP, ne sont pas connus.

La cartographie des mutations trouvées chez plus d'une centaine de patients XP-D, tous déficitaires dans le système NER, révèle qu'un grand nombre de mutations (plus de 80 %) sont localisées dans la région 3' du gène codant pour l'extrémité carboxy-terminale de XPD (*figure 1*) [8]. Ayant en main un système performant de production de protéines recombinantes (système d'expression de cellules d'insecte/baculovirus), nous avons tout d'abord analysé l'activité hélicase de divers mutants XPD reproduisant les mutations retrouvées chez certains patients [9]. Nous avons constaté que ces mutations n'avaient aucun effet sur l'activité hélicase propre du produit des gènes XPD ainsi mutés. Ces résultats sont quelque peu troublants lorsque l'on sait que l'activité hélicase de XPD chez les patients en question est nettement diminuée par rapport à celle mesurée pour un TFIIH extrait de cellules provenant d'individus sains. Il apparaissait ainsi qu'un mode de régulation de l'activité hélicase, interne à TFIIH, avait été perturbé par cette modification de séquence. La comparaison des activités hélicases de XPD lorsque celui-ci est libre ou associé aux autres sous-unités de TFIIH a permis d'étayer notre hypothèse. En effet, l'activité hélicase de XPD est multipliée par 10 lorsque XPD est intégré au facteur TFIIH. Cette observation nous a conduits à rechercher les partenaires potentiels de XPD au sein de TFIIH pouvant jouer un rôle régulateur. Par

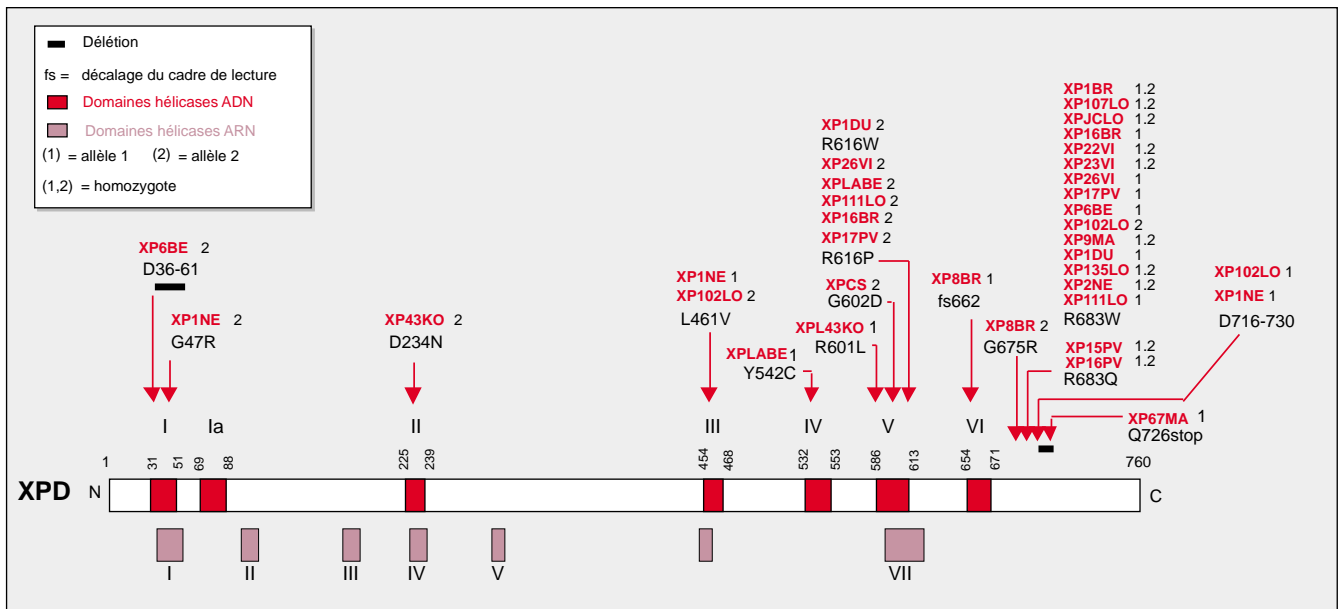


Figure 1. **Les mutations dans le produit du gène XPD chez les patients XP-D.** Plus de 80% des mutations sont situées dans la région 3' du gène, codant pour l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.

co-infection de cellules d'insecte à l'aide de différents baculovirus dont l'un exprimait XPD, et l'autre chacune des sous-unités de TFIIH individuellement, nous avons mis en évidence une très forte interaction entre XPD et la sous-unité p44 [10]. Cette interaction multipliée par 10 l'activité hélicase de XPD, lui permettant d'atteindre une activité spécifique proche de celle de TFIIH. Nous avons alors cherché à comprendre pourquoi des mutations dans la région 3' du gène XPD ne permettaient pas de développer une activité hélicase optimale. En utilisant la même procédure de co-infection de cellules d'insecte par deux baculovirus contenant l'un p44 et l'autre XPD mutant ou sauvage, nous avons constaté que chacune des sous-unités XPD provenant d'un gène muté dans la région 3', n'interagissait plus avec p44. Cette même protéine p44, que l'on pouvait considérer comme l'enzyme hélicase, est alors incapable de jouer son rôle d'activateur: l'activité hélicase XPD au sein du complexe TFIIH est alors trop faible pour assurer une ouverture normale de l'ADN autour de la lésion, empêchant de ce fait que l'incision du brin endommagé suivi

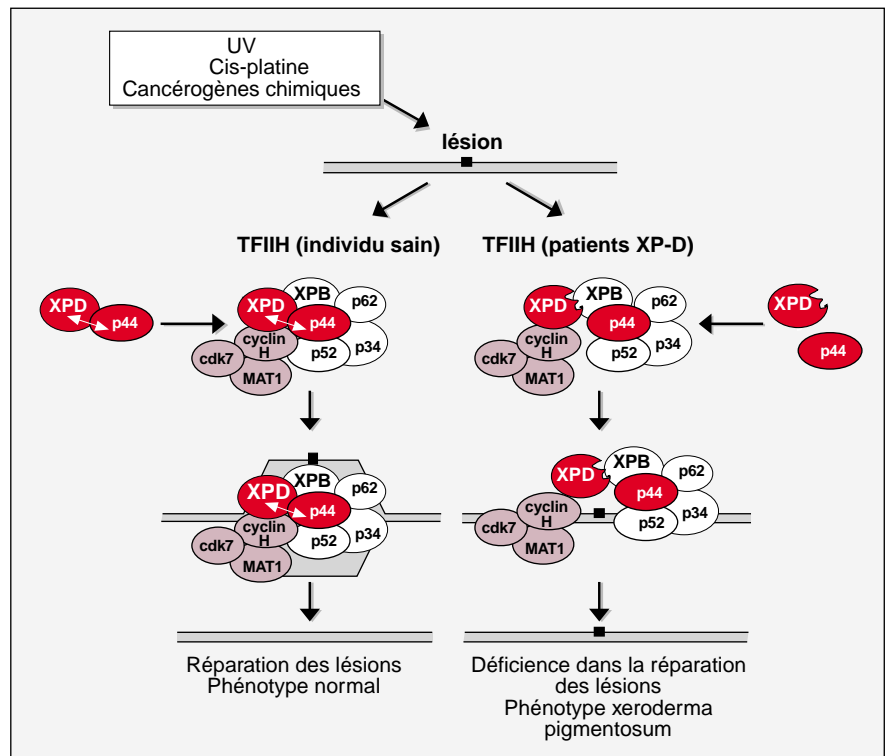


Figure 2. **Mécanisme d'action proposé dans le xeroderma pigmentosum.** Une lésion sur l'ADN entraîne le recrutement du complexe TFIIH qui, du fait de son activité hélicase, ouvre la molécule d'ADN, ce qui permet de la réparer. Chez les patients XP-D, le complexe TFIIH est bien recruté, mais l'anomalie dans l'interaction entre XPD et p44 inhibe l'activité hélicase de XPD; le brin d'ADN n'est pas ouvert et la lésion ne peut être réparée.

de son excision puisse se réaliser (figure 2). Ce défaut d'interaction entre XPD et son régulateur nous permet d'expliquer le phénotype NER chez les patients XP-D.

Parmi les diverses hélicases (présu- mées) impliquées dans le développe- ment de maladies génétiques rares comme le syndrome de Bloom, le syndrome de Werner, l' α -thalassé- mie, ou le syndrome de Cockayne, seules les mutations dans XPD à l'ori- gine du xeroderma pigmentosum ont trouvé, pour l'instant, une expli- cation biologique: une absence de stimulation (de régulation) de l'acti- vité enzymatique [11]. Impliquées, ou supposées l'être, dans des méca- nismes aussi variés que la transcrip- tion, la réparation comme ce serait le cas pour la thalassémie, le xeroderma ou le syndrome de Cockayne, la répli- cation, ou la conservation de l'inté- grité du génome, les hélicases ont pour l'instant été très peu étudiées. Il est cependant raisonnable d'imagi- ner, au vu de nos résultats, que cer- taines de ces mutations puissent per- turber leur activité propre ou leur mode de régulation par d'autres fac- teurs, dans l'une ou l'autre fonction évoquée ci-dessus. Il ne fait pas de doute qu'outre le fait que d'autres hélicases restent à identifier, des phé-

nomènes cliniques complexes pour- ront être expliqués par des dysfonc- tionnements dans la régulation de ces enzymes ■

Frédéric Coin
Jean-Christophe Marinoni
Jean-Marc Égly

Institut de génétique et de biologie molé- culaire et cellulaire, (Cnrs/Inserm), 1, rue Laurent-Fries, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, Université Louis-Pasteur de Stras- bourg, France.

RÉFÉRENCES

1. Boulikas T. DNA lesion-recognizing proteins and the p53 connection. *Anticancer Res* 1996; 16: 225-42.
2. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 23465-8.
3. Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ, Chambon P, Egly JM. The basic transcrip- tion factor BTF2/TFIIH contains a helicase involved in both transcription and DNA repair. *Science* 1993; 260: 58-63.
4. Roy R, Adamczewski JP, Seroz T, Ver- meulen W, Tassan JP, Schaeffer L, Nigg EA, Hoeijmakers JHJ, Egly JM. MO15 kinase involved in cell cycle regulation is part of TFIIH the transcription/DNA repair factor. *Cell* 1994; 79: 1-9.
5. Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT. Opening of an RNA polymerase II pro- moter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors TFII E and III. *EMBO J* 1996; 15: 1666-77.
6. Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997; 16: 6559-73.
7. Sarasin A. Les gènes humains de la répa- ration de l'ADN. *Med Sci* 1994; 10: 43-54.
8. Taylor E, Broughton B, Botta E, Stefanini M, Sarasin A, Jaspers N, Fawcett H, Har- court S, Arlett C, Lehmann A. Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8658-63.
9. Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini MA, Egly JM. Mutations in the XPD helicase resulting in XP and TTD phe- notypes, prevent the interaction of XPD with the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet* 1998; 20: 184-8.
10. Humbert S, van Vuuren H, Lutz Y, Hoeij- makers JHJ, Egly JM, Moncollin V. p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcrip- tion factor have homologies with SSL, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J* 1994; 13: 2393-8.
11. Tuteja N, Tuteja R. DNA helicases: the long unwinding road. *Nat Genet* 1996; 13: 11-2.

TIRÉS À PART

J.M. Égly.