

Université de Montréal

**Rôles de la protéine p53 et de l'oncoprotéine virale HBx dans la réponse
cellulaire aux dommages à l'ADN**

par

Géraldine Mathonnet

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Ph.D. en Biologie Moléculaire

Mars 2005

©, Géraldine Mathonnet, 2005.



QH

506

U54

2005

V. 021

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôles de la protéine p53 et de l'oncoprotéine virale HBx dans la réponse
cellulaire aux dommages à l'ADN**

Présentée par :

Géraldine Mathonnet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Richard Bertrand (président rapporteur et représentant du doyen de la FES)

Dr. Elliot Drobetsky (directeur de recherche)

Dr. Abdellah Belmaaza (membre du jury)

Dr. Girish Shah (examineur externe)

RÉSUMÉ

Suite à des agents endommageant l'ADN, p53 maintient l'intégrité du génome et prévient la transformation cellulaire. P53 joue un rôle essentiel dans la réparation par excision de nucléotides (NER), une voie antinéoplasique cruciale enlevant les dommages à l'ADN tels que les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPDs) induits par les rayons solaires UV. Deux sous-voies ont été caractérisées : (i) la réparation globale (GNER), qui élimine les dommages sur tout le génome; et (ii) la réparation couplée à la transcription (TCNER) qui excise seulement les lésions sur le brin transcrit des gènes actifs. P53 est essentielle pour l'efficacité de la voie GNER, mais son rôle dans la voie TCNER est controversé. Nous avons utilisé la technique de réaction en chaîne de la polymérase médiée par une ligation (LMPCR), afin de démontrer que le rôle de p53 dans la voie TCNER, et non dans la voie GNER, dépend de la longueur d'ondes d'UV incidents. En effet, les cellules humaines déficientes en p53 ont une réduction de l'efficacité des voies GNER et TCNER après irradiation avec des UVB (290-320nm), comparées aux cellules ayant une p53 normale. Par contre, après irradiation aux UVC 254nm, l'absence de p53 entraîne une diminution de l'efficacité de la GNER seulement. Ainsi, cette étude révèle que le mutagène modèle UVC 254nm très largement utilisé, ne reflète pas les effets environnementaux des UVB.

L'infection par le virus de l'Hépatite B (HBV) est un facteur de prédisposition critique au carcinome hépatocellulaire. HBx, une protéine codée par HBV, interfère avec p53 et interagit avec une variété de voies impliquées dans la réponse aux agents endommageant l'ADN, dont la NER. En effet, HBx inhibe la voie GNER mais son rôle dans la voie TCNER reste indéterminé. Afin d'élucider le rôle de HBx dans la TCNER, nous avons utilisé des lignées lymphoblastoïdes isogéniques TK6, exprimant HBx (TK6-HBx), ou déficientes en p53 (NH32). Comparées à TK6, TK6-HBx et NH32 ont une réduction des niveaux d'apoptose après irradiation aux UVB ou aux UVC, mais aucune différence n'a été observée quant à la survie clonogénique. Les études de réparation révèlent que les cellules TK6-HBx sont déficientes en GNER et en TCNER après irradiation aux UVB ou UVC. Ces

résultats démontrent pour la première fois que la protéine HBx peut réduire l'efficacité de la voie TCNER dans les cellules humaines indépendamment de p53. Ces résultats pourraient contribuer à une meilleure compréhension du rôle du HBV dans le carcinome hépatocellulaire.

MOTS CLÉS :

p53; réparation par excision de nucléotides; réparation couplée à la transcription; HBV; HBx; UV; carcinome hépatocellulaire; LMPCR

ABSTRACT

Nucleotide excision repair (NER) prevents skin cancer by eliminating highly-genotoxic cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) induced in DNA by the UV component of sunlight. NER consists of two overlapping subpathways, *i.e.*, global NER (GNER) which removes CPD from the genome overall, and transcription-coupled NER (TCNER) which removes CPD uniquely from the transcribed strand of active genes. Previous investigations have clearly established that the p53 tumour suppressor plays a crucial role in GNER, but its role in TCNER is controversial. Here we employed the ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) technique to demonstrate, at nucleotide resolution along two chromosomal human genes, that the requirement for functional p53 in TCNER, but not in GNER, is dependent upon incident UV wavelength. Indeed, relative to an isogenic p53-wild type counterpart, p53-deficient human lymphoblastoid strains were shown to be deficient in GNER and TCNER following exposure to polychromatic UVB (290-320-nm). However in contrast, after irradiation with 254-nm UV, p53-deficiency engendered less efficient CPD repair only along the nontranscribed strands of these target genes. Hence, our finding highlights a major caveat in experimental photobiology, by providing a prominent example where the extensively used “nonsolar” model mutagen 254-nm UV does not accurately replicate the effects of environmentally relevant UVB.

P53 functions can be inactivated by the hepatitis B virus X protein (HBx). HBx is firmly implicated in liver cancer and exogenous HBx expression has been shown to inhibit GNER and affect various signaling pathways. However it remains undetermined whether HBx also interferes with TCNER. To address this, we used the human lymphoblastoid strain TK6, and isogenic counterparts expressing HBx (TK6-HBx) or carrying a homozygous *p53* gene knockout (NH32). Relative to TK6, TK6-HBx and NH32 manifested reduced levels of apoptosis following exposure to either UVB or UVC, although no differences in clonogenic survival were observed. DNA repair studies revealed that TK6-HBx exhibited defective TCNER after

irradiation with either UVB or UVC. This data demonstrate for the first time that HBx can reduce the efficiency of TCNER in human cells independently of p53, thus suggesting a major contribution for HBx in the developpement of liver cancer.

KEYWORDS:

p53; nucleotide excision repair; transcription-coupled repair; HBV; HBx; UV; hepatocellular carcinoma; LMPCR

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

6-4 PPs : pyrimidine(6-4) pyrimidone photoproducts

AFB₁ : aflatoxin B₁

AFB₁-FAPY : aflatoxin B₁ formamidopyrimidine

AFB₁-N⁷-Gua : (8,9)-dihydro-8 (N⁷-guanyl)-8-hydroxyaflatoxin B₁ adduct

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complementary

AP : apurinic

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNpolII : acide ribonucléique polymerase II

ATM : ataxia-telangiectasia mutated

ATP : adenosine triphosphate

ATR : ataxia-telangiectasia related

BCC : basal cell carcinoma

BER : base excision repair

BRCA₁ : breast cancer associated protein 1

cccDNA : circular covalently closed deoxyribonucleic acid

CDK : cyclin dependent kinase

CDKI : cyclin dependent kinase inhibitor

CHC : carcinome hépatocellulaire

CPD : cyclobutane pyrimidine dimer

CS : Cockayne's syndrome

DNA : deoxyribonucleic acid

DHFR : dihydrofolate reductase

EGFR : epidermal growth factor receptor

ERK : extracellular regulated proteine kinase

GNER : global nucleotide excision repair

Gy : gray

HbcAg : hepatitis B core antigen

HbeAg : hepatitis B e antigen

HbsAg : hepatitis B surface antigen
HBV : hepatitis B virus
HBx : hepatitis B virus x protein
HCV : hepatitis C virus
HCC : hepatocellular carcinoma
HCVcore : hepatitis C virus core protein
HIPK : homeodomain interacting protein kinase
HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransferase
HPV : human papilloma virus
IFN- α : interféron alpha
IFN- γ : interféron gamma
iNOS : inducible nitric oxyde synthase
IR : ionizing radiation
J : joules
JNK : c-jun N-terminal kinase
kb : kilobases
LMPCR : ligation-mediated polymerase chain reaction
M : mitose
m² : mètre carré
MAPK : mitogen activated protein kinase
MAPKK : mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK : mitogen activated protein kinase kinase kinase
MMR : mismatch repair
MMS : methyl methane sulfonate
NER : nucleotide excision repair
NLS : nuclear location signal
NMSC : non melanoma skin cancer
NO : nitric oxyde
NTS : nontranscribed strand
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PKC : proteine kinase C

pol : polymerase

pRb: protéine du rétinoblastome

rcDNA : relaxed circular deoxyribonucleic acid

RCF : replication factor C

RNA : ribonucleic acid

ROS : reactive oxygen species

RPA : replication protein A

s : seconde

S : synthesis (phase réplivative du cycle cellulaire)

SAPK : stress activated protein kinase

SCC : squamous cell carcinoma

SV40 : simian virus 40

TAF : TATA binding protein associated factor

TBP : TATA binding protein

TCBER : transcription coupled base excision repair

TCNER : transcription-coupled nucleotide excision repair

TGF- α : transforming growth factor alpha

TNFR : tumour necrosis factor receptor

TS : transcribed strand

TTD : trichothiodystrophy

UV : ultraviolet

XP : xeroderma pigmentosum

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES..... xiii

LISTE DES TABLEAUX..... xv

CHAPITRE I INTRODUCTION 1

I) Les rayons ultraviolets, un mutagène modèle. 2

1) Généralités 2

2) La carcinogénèse induite par les rayons UV 3

3) La réponse cellulaire aux rayons UV..... 6

II) La réparation par excision de nucléotides..... 8

1) Mécanismes 8

2) Implication de la réparation par excision de nucléotides dans la carcinogénèse
..... 11

III) Le suppresseur de tumeurs p53..... 12

1) Structure..... 12

2) Rôle de p53 dans la réponse aux dommages à l'ADN 15

3) Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire..... 17

4) Rôle de p53 dans l'apoptose 19

5) Rôle de p53 dans la réparation de l'ADN..... 21

6) Rôle de p53 dans la carcinogénèse 23

IV) Le cancer du foie ou hépatocarcinome..... 25

1) Généralités 25

2) L'aflatoxine B₁ et l'hépatocarcinome 27

3) Les virus hépatiques et les hépatocarcinomes 31

V) Le virus de l'hépatite B..... 33

1) Épidémiologie..... 33

2) Pathologie 34

3) Biologie..... 35

4) Génome et protéines du HBV..... 39

VI) <i>La protéine X du virus de l'hépatite B</i>	41
1) Structure et localisation	41
2) Fonctions.....	42
a) Rôle de HBx dans la réplication virale	42
b) Rôle de HBx dans la carcinogénèse hépatique	42
i) Rôle de HBx dans la voie NF- κ B	43
ii) Rôle de HBx dans les voies MAPKs	45
iii) Rôle de HBx dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose	46
iv) Rôle de HBx dans la réparation des dommages à l'ADN.	47
VII) <i>Objectifs de la thèse</i>	48
<i>CHAPITRE II ARTICLE I</i>	49
<i>Abstract</i>	51
<i>I) Introduction</i>	52
<i>II) Materials and methods</i>	55
<i>III) Results and discussion</i>	57
<i>IV) Acknowledgements</i>	62
<i>V) Figure legends</i>	64
<i>CHAPITRE III ARTICLE II</i>	71
<i>Abstract</i>	73
<i>I) Introduction</i>	74
<i>II) Materials and methods</i>	76
<i>III) Results</i>	81
<i>IV) Discussion</i>	84
<i>V) Acknowledgements</i>	88
<i>VI) Figure legends</i>	89
<i>CHAPITRE IV DISCUSSION</i>	96

CHAPITRE V RÉFÉRENCES..... 108

CHAPITRE VI ANNEXE..... 157

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le spectre électromagnétique.....	2
Figure 2. Les principaux photoproduits générés par les rayons UV.....	4
Figure 3. La réponse cellulaire aux rayons UV.....	7
Figure 4. La réparation par excision de nucléotides (NER).....	10
Figure 5. Représentation schématique de la structure de la protéine p53.....	13
Figure 6. Modifications post-traductionnelles majeures de p53 en réponse aux dommages à l'ADN.....	16
Figure 7. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN.....	18
Figure 8. Rôle de p53 dans les voies de signalisation apoptotiques induites par les rayons UV.....	20
Figure 9. Séquences chronologiques des lésions cellulaires menant au développement du carcinome hépatocellulaire.....	26
Figure 10. A) photo de <i>Aspergillus flavus</i> , B) voie d'activation métabolique de AFB ₁ menant à la formation d'adduits avec l'ADN.....	28
Figure 11. Prévalence de la mutation du codon 249 du gène p53 en Asie et en Afrique.....	30
Figure 12. Structure des particules virales du virus de l'hépatite B.....	37
Figure 13. Cycle de vie du virus de l'hépatite B.....	38
Figure 14. Organisation génomique du virus de l'hépatite B.....	40
Figure 15. Voies de signalisation intracellulaires affectées par la protéine HBx.....	44
Figure 16. Repair of UVB-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the TS of the human <i>hprt</i> gene in TK6, TK6-5E, and NH32.....	66
Figure 17. Influence of p53 status on CPD removal along the transcribed and nontranscribed strands of the <i>c-jun</i> and <i>hprt</i> loci in TK6, TK6-5E, and NH32 treated with polychromatic UVB.....	67
Figure 18. Repair of 254-nm UV-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the NTS of the human <i>hprt</i> gene in TK6 and NH32.....	68
Figure 19. Repair of 254-nm UV-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the TS of the human <i>hprt</i> gene in TK6 and NH32.....	69

Figure 20. Influence of p53 status on CPD removal along the transcribed and nontranscribed strands of <i>c-jun</i> and <i>hprt</i> in TK6 and NH32 treated with monochromatic 254nm-UV.	70
Figure 21. Analysis of HBx mRNA expression level and transcriptional activity in TK6 and NH32 strains.	91
Figure 22. Influence of HBx expression and p53 status on apoptosis and clonogenic survival following UVB or 254-nm UV irradiation.....	92
Figure 23. Repair of UVB induced CPDs on the transcribed strand of <i>c-jun</i> in TK6, TK6 HBx and NH32.	93
Figure 24. Influence of HBx and p53 expression on GNER and TCNER following UVB or 254 nm UV irradiation.	94
Figure 25. Time course for <i>c-jun</i> mRNA induction in TK6 and TK6-HBx irradiated with 450 J/m ² UVB (A) or 20 J/m ² UVC (B).	95
Figure 26. Analyse de la quantité de CPDs générés dans les cellules humaines TK6 après irradiation aux UVB ou aux UVC 254nm.	98
Figure 27. Analyse des niveaux de phosphorylation de JNK dans les cellules TK6 et TK6 HBx.	103
Figure 28. Analyse des niveaux de phosphorylation de ERK dans les cellules TK6 et TK6 HBx.	104
Figure 29. Pourcentage des cellules en phase G0/G1 après irradiation avec A) 5 J/m ² UVC254nm ou B) 150 rads IR.	106
Figure 30. Représentation schématique de la technique de Ligation-mediated polymerase chain reaction.	158

LISTE DES TABLEAUX

Table I Oligonucleotide primer sets for LMPCR analysis of the human *hprt* gene.. 63

À Patrick et à mes parents Georges et Josiane...

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Elliot Drobetsky, pour m'avoir donné les moyens matériels, scientifiques et financiers, afin de réaliser ce projet passionnant et fructueux. Ses précieux conseils et son sens critique développé me permettront certainement de mieux affronter les rigueurs du milieu scientifique.

Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire présents et passés: Julie, Yannick, Raphaël, Silvana, Maud, Martin, Caroline, Elodie et Jean-Philippe; pour leur bonne humeur, leurs judicieux conseils, leur aide ainsi que leurs encouragements.

De plus je tiens à remercier le programme de Biologie Moléculaire de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal, pour leur soutien financier tout au long de mon doctorat, et notamment la secrétaire du programme Mme Viviane Jodoin pour son écoute et son dévouement.

Enfin, j'aimerais surtout remercier ma famille qui a dû me voir s'éloigner d'elle pendant ces longues années, et qui, comme l'a fait Patrick, m'a toujours soutenue et encouragée dans mes études. C'est à eux que je dédie cette thèse.

CHAPITRE I
INTRODUCTION

I) Les rayons ultraviolets, un mutagène modèle.

1) Généralités

En 1801, Johann W. Rotter, un physicien allemand, met en évidence pour la première fois, l'existence d'un rayonnement ultraviolet (UV), à l'aide de prismes. Néanmoins, ce n'est qu'au XX^{ème} siècle qu'un enregistrement photographique du spectre UV sera réalisé. Les rayons UV font partie du spectre électromagnétique émis par le soleil et sont divisés en trois types selon leurs longueurs d'onde : les UVA (320 à 400 nm), les UVB (280 à 320 nm) et les UVC (100 à 280 nm) (figure 1).

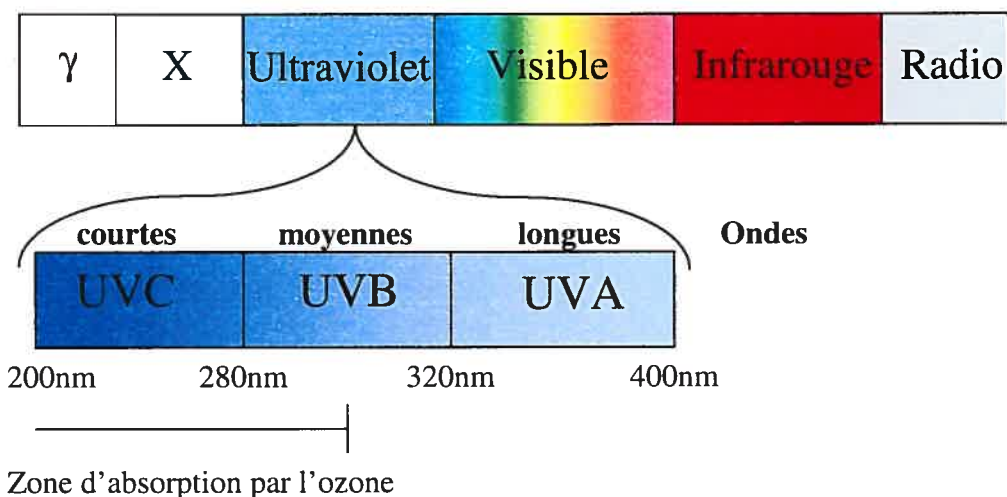


Figure 1. Le spectre électromagnétique.

La couche d'ozone stratosphérique de la Terre, bloque une grande partie de ce rayonnement UV. En effet, les rayons de type UVC sont complètement bloqués par la couche d'ozone et n'atteignent donc pas la surface de la Terre, mais certaines personnes peuvent y être exposées *via* des sources artificielles comme des lampes germicides. Par contre les UVA ainsi qu'une grande partie des UVB, ne sont pas

bloqués par la couche d'ozone et ont des conséquences biologiques majeures chez les humains.

Les UVA sont faiblement absorbés par la plupart des composants cellulaires, mais génèrent une grande quantité d'espèces oxygénées réactives (ROS) par l'intermédiaire d'une variété de chromophores (1, 2). Par contre les UVB, bien qu'ils génèrent aussi des ROS, sont absorbés par les protéines et l'ADN, et vont par conséquent entraîner directement la formation de dommages à l'ADN. De plus, alors que 20% des UVA vont pénétrer les couches profondes de l'épiderme et du derme, seulement 2% à 10% des UVB vont atteindre cette profondeur. Par contre, le chromophore principal des UVC est l'ADN, et ceux-ci ne génèrent que très peu de ROS et pénètrent très peu profondément les tissus.

Les humains sont soumis aux rayonnements UV quotidiennement, soit en s'exposant à la lumière solaire, soit *via* des sources de lumière artificielles. Les organes cibles des UV sont la peau et les yeux. Une exposition prolongée aux UV va mener au bronzage et entraîner le vieillissement prématuré de la peau, mais peut aussi avoir des conséquences plus graves comme l'apparition d'érythèmes, de brûlures (coups de soleil), d'immunosuppression, de dommages permanents à la rétine, et éventuellement de cancers de peau (3).

2) La carcinogénèse induite par les rayons UV

Les rayons UV sont des carcinogènes complets agissant à toutes les étapes de la carcinogénèse : l'initiation, la stimulation et la progression. Il est aujourd'hui bien établi que les UV génèrent des dommages à l'ADN dont des cassures simple brin, des photoproduits de pyrimidines ainsi que des liaisons protéine-ADN (4). Les deux principaux photoproduits générés par les UV sont les photoproduits pyrimidine(6-4) pyrimidone (6-4 PPs) et les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPDs) (figure 2), qui vont entraîner une distorsion de l'ADN et un arrêt de la transcription. Parmi les lésions créées par les UV au niveau de l'ADN, les CPDs sont considérés comme les plus mutagéniques dans les cellules de mammifères (5-7). En effet, les 6-4 PPs

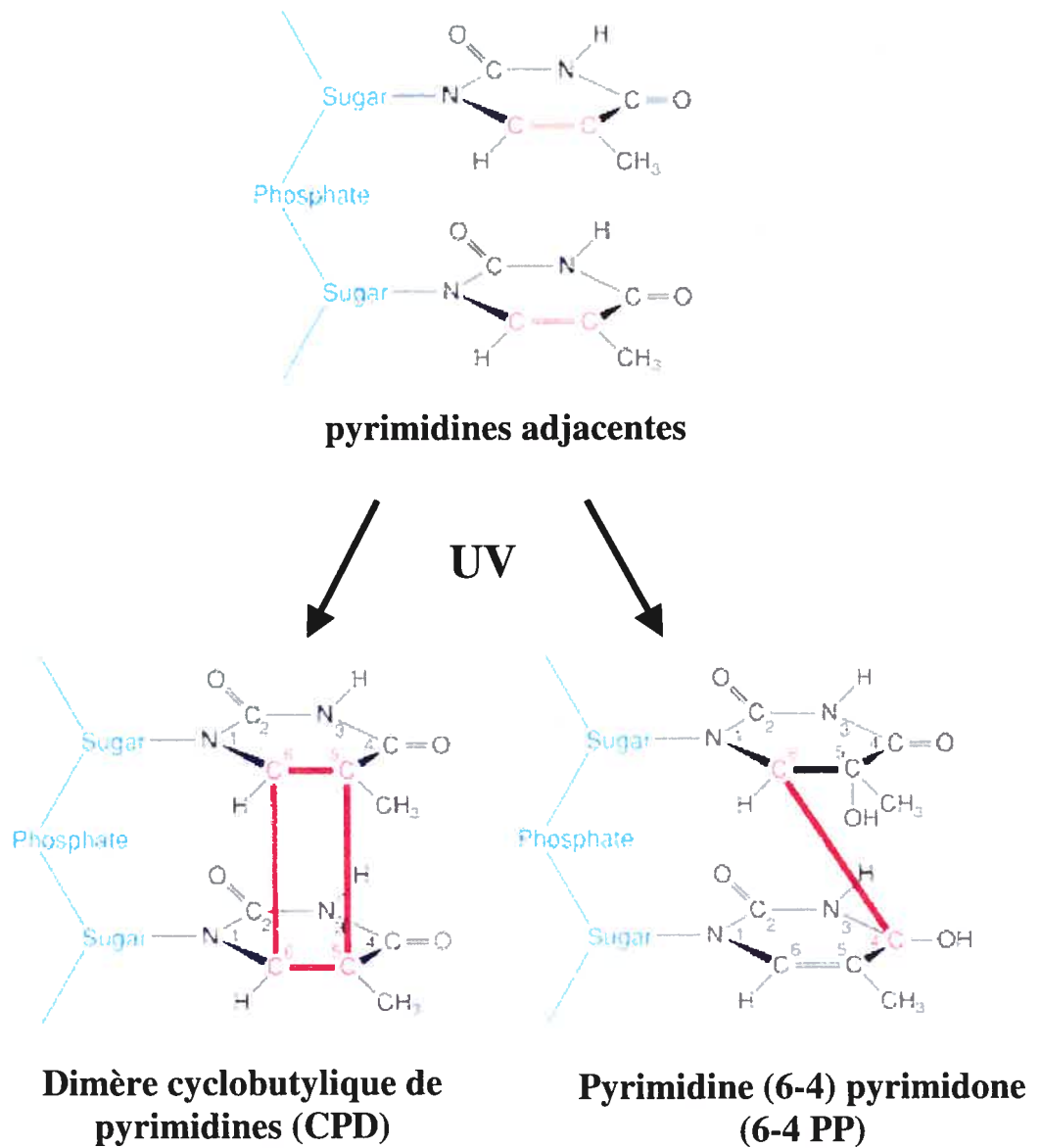


Figure 2. Les principaux photoproduits générés par les rayons UV.

sont réparés plus efficacement, puisque 90 % d'entre eux sont éliminés 3 h après irradiation, certainement parce qu'ils entraînent une plus grande distortion de la molécule d'ADN que les CPDs (8, 9). Néanmoins, des études ont montré que les 6-4 PPs peuvent aussi être impliqués dans la mutagenèse induite par les UV même si ils sont réparés plus rapidement que les CPDs (10, 11). Par ailleurs, les UVA, bien qu'ils n'affectent pas directement l'ADN, joueraient aussi un rôle important dans la mutagenèse solaire (12). Si les dommages induits par les UV ne sont pas réparés efficacement, ceux-ci peuvent générer des mutations dans la séquence d'ADN. Les mutations les plus fréquemment et spécifiquement induites par les UV sont les transition C à T et CC à TT et sont considérées comme la signature des UV (13-16). La règle du « A » a été proposée pour permettre d'expliquer la formation des mutations induites par les UV (17). Selon cette règle, l'ADN polymérase ϵ (h) insérerait une adénine (A) par défaut en face d'une lésion ne pouvant être interprétée. C'est pourquoi, une mutation se produira lorsque le dimère cyclobutylique se formera au niveau des dimères cyclobutyliques de pyrimidine CT ou CC, et non au niveau des dimères TT puisqu'un A sera normalement inséré en face des T. Lorsque l'ADN sera répliqué, il y aura apparition d'une mutation C à T ou CC à TT.

De nombreuses études ont montré le rôle primordial des rayons UV dans les cancers de la peau (18-24). Par ailleurs, l'incidence des cancers de peau est en augmentation alarmante depuis les dernières décennies. Il existe deux grands types de cancers de peau : les mélanomes et les cancers de peau de type non-mélanome (NMSC). On estime à plus d'un million par année, le nombre de nouveaux cas de NMSC aux Etats-Unis (25). Parmi les NMSC, on distingue les carcinomes des cellules basales (BCC) et les carcinomes des cellules squameuses (SCC). Les BCC et les SCC sont les deux types de cancer de peau les plus fréquents et aussi les moins mortels. En effet, un traitement tôt et efficace d'un BCC résulte en un taux de guérison de 95 %. Par contre les mélanomes, provenant des mélanocytes, sont la forme la plus dangereuse des cancers de peau. Ce type de cancer est de plus en plus fréquent, et le nombre d'individus atteint a augmenté plus que n'importe quel autre type de cancer durant les dix dernières années.

L'apparition d'un cancer de la peau est un processus comprenant plusieurs étapes faisant intervenir l'inactivation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, dont fréquemment le gène p53 (voir paragraphe III) (20, 26-30).

3) La réponse cellulaire aux rayons UV

Outre les dommages au niveau de l'ADN, les rayons UV induisent d'autres effets cellulaires indépendants des dommages à l'ADN appelés la réponse aux UV (« UV response ») (figure 3) (31). Cette réponse entraîne l'expression rapide des gènes c-fos, c-jun et NF- κ B (32). L'initiation par les UV du signal menant à l'induction précoce de ces gènes est certainement due à l'activation de récepteurs membranaires par les UV. En effet, plusieurs études ont montré que les rayons UV sont capables d'activer les récepteurs membranaires tel que le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) (33, 34). Les UV entraîneraient une oligomérisation et l'internalisation de EGFR et du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), en l'absence de ligand, très rapidement après irradiation aux UVB (35). Suite à l'activation de ces récepteurs, une cascade de signalisation intracellulaire serait activée menant à diverses réponses cellulaires telles que l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire par apoptose, ou la réparation de l'ADN (figure 3). De nombreuses études ont montré l'activation de protéines de signalisation suite à une irradiation aux UV. En effet, les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs) seraient activées par les UV. Les MAPKs sont un groupe de protéines kinase impliquées dans la réponse des cellules à des changements de leur environnement (36). Ces voies de signalisation sont normalement initiées à la surface suite à la liaison d'un ligand spécifique à divers récepteurs. Les MAPKs permettent le transfert des signaux de la surface vers le noyau afin d'induire la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires spécifiques aux signaux envoyés. Chez les vertébrés, trois voies MAPKs ont été identifiées : la voie de la kinase régulée par les signaux extracellulaires (MAPK/ERK), la voie p38 MAPK, et la voie de la protéine kinase activée par le stress/ kinase c-Jun N- terminale

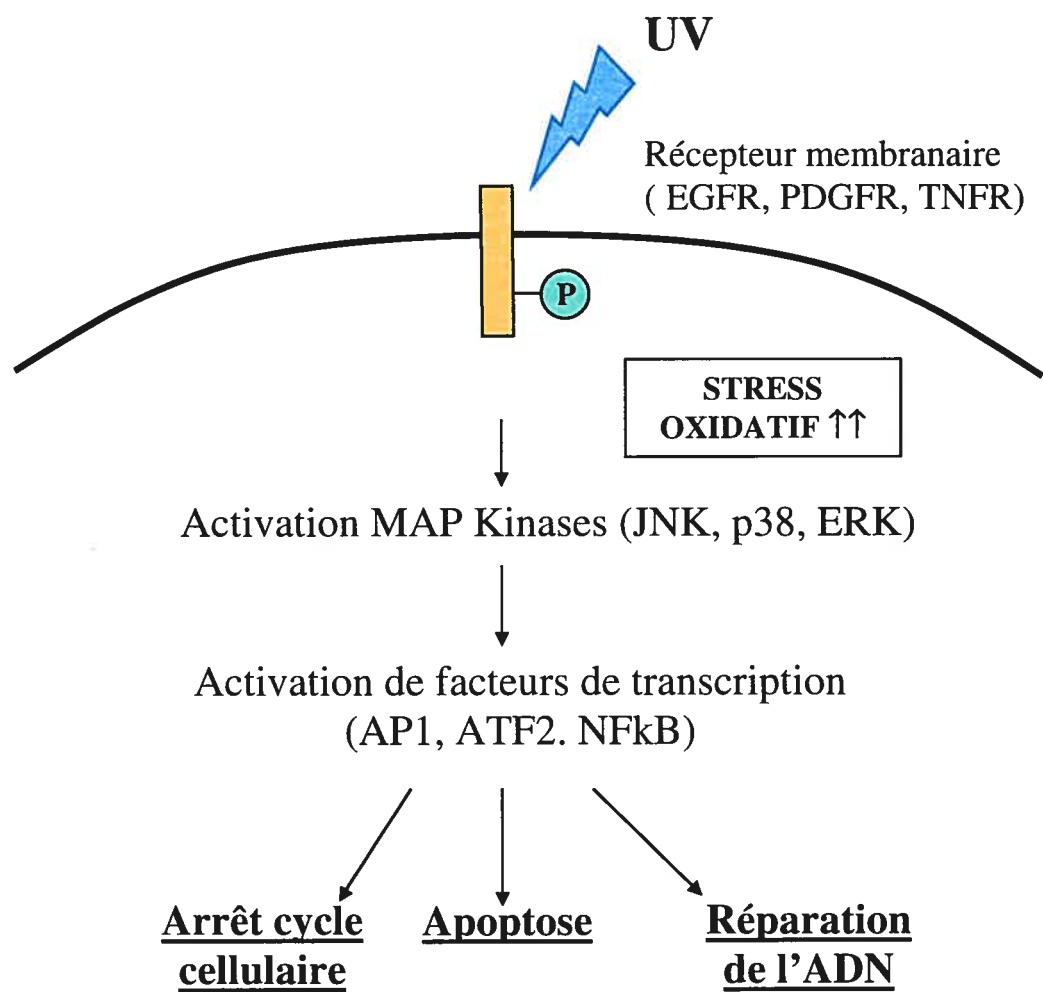


Figure 3. La réponse cellulaire aux rayons UV.

(SAPK/JNK) (37, 38). Ces trois voies sont basées sur le même schéma d'activation divisé en trois modules: la MAPK est activée par une MAPK kinase (MAPKK) qui est elle-même activée par une MAPK kinase kinase (MAPKKK). L'interrelation de ces trois voies permet de réguler la réponse cellulaire en fonction du signal envoyé (39). Les UV entraîneraient l'activation des trois types de MAPK : SAPK/JNK, ERK et p38 (40-45). Par ailleurs, cette cascade de signalisation induite par les UV serait partiellement dépendante de l'activation de la protéine G Ras (46, 47). Néanmoins, cette cascade de signalisation intracellulaire indépendante des dommages à l'ADN serait extrêmement variable et modulable selon la longueur d'onde et la dose d'UV employées (48). De plus, cette voie serait aussi modulée par les niveaux de ROS générés à l'intérieur de la cellule par les rayons UV (49-51). Ainsi, la réponse cellulaire pourrait varier en fonction de la modulation de cette voie de signalisation.

Les rayons UV constituent donc un modèle de choix pour l'étude de la réponse cellulaire au stress et aux dommages à l'ADN.

II) La réparation par excision de nucléotides

1) Mécanismes

Afin de prévenir l'apparition de mutations et de préserver l'intégrité du génome, les cellules humaines ont développé d'importants mécanismes leur permettant de réparer les dommages causés à l'ADN par les carcinogènes environnementaux. La voie de réparation par excision de nucléotides, ou NER (« nucleotide excision repair »), permet aux cellules d'éliminer les lésions causant un arrêt de la transcription et déformant la structure de la molécule d'ADN, dont les dommages induits par les UV ainsi que les lésions volumineuses, ou « bulky adducts », comme celles générées par la toxine hépatique aflatoxine B1 (voir paragraphe IV 2)), ainsi que les dommages causés par les hydrocarbures polycycliques aromatiques de la fumée de cigarette, et les agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine (52-54). Ces dommages doivent être réparés avant la réplication de l'ADN, afin d'éviter l'apparition des mutations pouvant altérer l'intégrité du génome. La voie de réparation NER fait intervenir plus

de trente gènes et est composée de six étapes majeures : la reconnaissance de la lésion, l'ouverture et le déroulement de l'hélice d'ADN, l'incision du brin endommagé de part et d'autre du dommage, l'excision du fragment d'ADN contenant le dommage, la resynthèse du brin endommagé, et la ligation du brin réparé (figure 4) (55). Le mécanisme de réparation NER est composé de deux sous-voies ne différant qu'au niveau de la reconnaissance du dommage, le reste de la voie étant commune (56). La voie de réparation globale, ou GNER (« global NER ») répare les lésions sur l'ensemble du génome alors la voie de réparation couplée à la transcription, ou TCNER (« transcription-coupled NER »), va éliminer les dommages localisés sur le brin transcrit de gènes actifs uniquement (figure 4) (56-60).

La voie GNER est initiée par la reconnaissance du dommage par le complexe protéique XPC/hHR23B (61, 62). La protéine XPE jouerait aussi un rôle dans cette étape puisqu'elle possède une affinité pour l'ADN endommagé par les UV (63). Suite à la reconnaissance de la lésion, les protéines XPA, RPA (« replication protein A ») et TFIIH sont recrutées (64, 65). TFIIH est un facteur de transcription basal contenant les hélicases XPB et XPD permettant le déroulement de la double hélice d'ADN en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et facilité par la protéine RPA (66, 67). TFIIH est un complexe protéique primordial à la viabilité des cellules, puisqu'une inactivation de XPB et XPD est létale chez la souris (68). Les endonucléases XPG et ERCC1/XPF sont ensuite recrutées et vont cliver le brin endommagé en 3' et en 5' du dommage respectivement, générant un oligonucléotide de 24 à 32 nucléotides (69, 70). L'étape de resynthèse implique les protéines RPA, PCNA (« proliferating cell nuclear antigen »), RCF (« replication factor C »), ainsi que les polymérases δ ou ϵ (71).

La voie de réparation TCNER est activée lorsque l'ARN polymérase II (ARNpolIII) est bloquée au site du dommage lors de la transcription (72). XPC/hHR23B est le seul complexe de réparation NER dispensable à la voie TCNER (73). L'ARN polIII agit elle-même comme facteur de reconnaissance du dommage dans la voie TCNER, et permet le recrutement des protéines de la voie NER

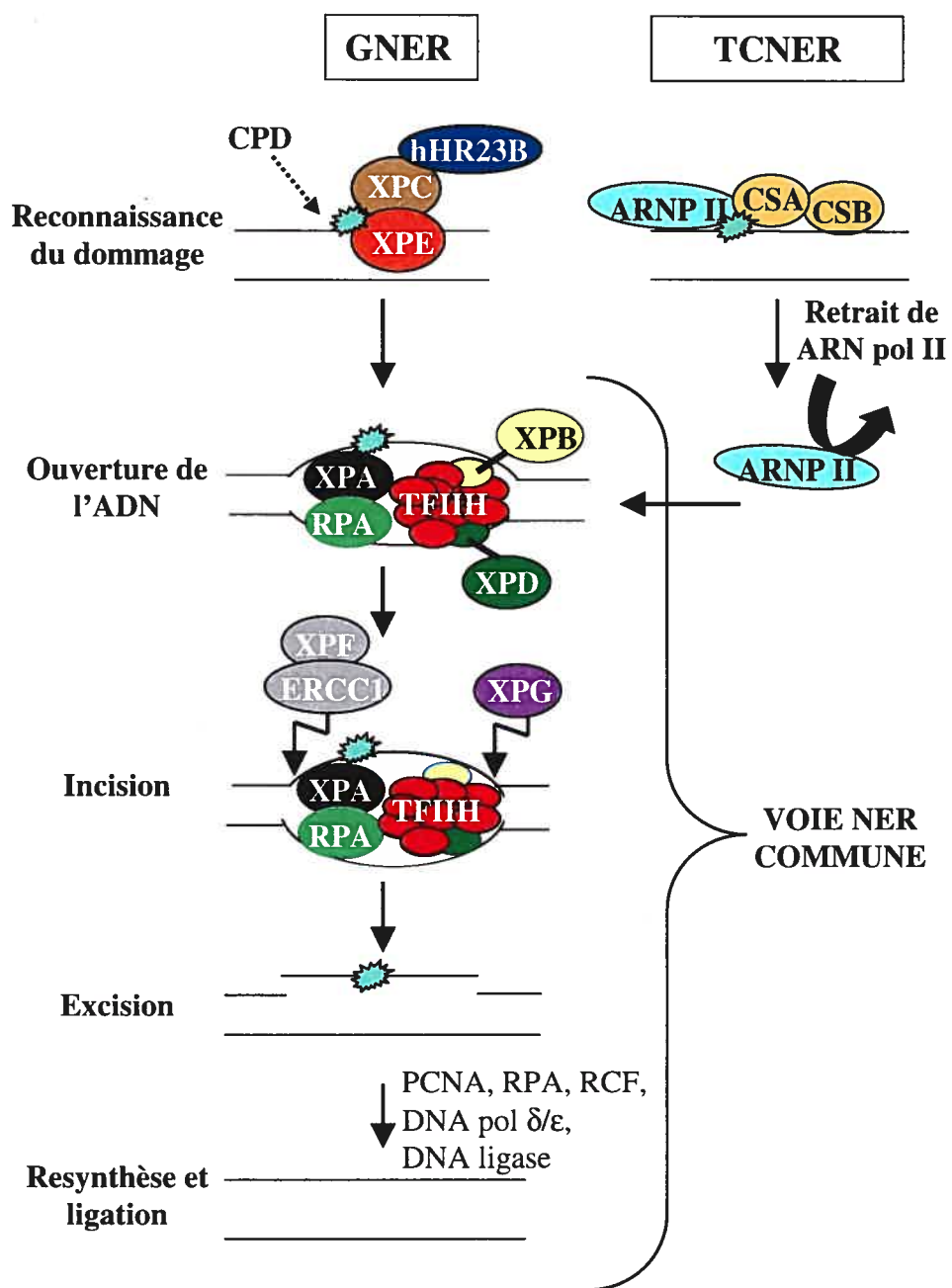


Figure 4. La réparation par excision de nucléotides (NER).

commune, suite à son retrait (figure 4) (74),(75). Par ailleurs, les protéines CSA et CSB joueraient un rôle spécifiquement dans la voie TCNER puisque les cellules déficientes en CSA ou CSB ont un défaut en TCNER mais ont une GNER normale, et leur interaction avec ARNpolIII a été démontrée (76).

2) Implication de la réparation par excision de nucléotides dans la carcinogénèse

L'implication de la NER dans la carcinogénèse est supportée par le fait qu'un défaut dans une protéine des voies GNER ou TCNER est responsable de l'apparition de divers syndromes : le xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS), et la trichothiodystrophie (TTD). Ces syndromes très rares vont entraîner une photosensibilité chez les individus atteints. Les individus XP ont des mutations dans un des gènes XPA à XPG, et sont sujets à des altérations dégénératives progressives de la peau et des yeux plus ou moins sévères selon le gène atteint, si ils s'exposent au soleil (77). L'âge moyen des symptômes est de deux ans. De plus, les individus XP ont un risque de développer des cancers de peau multiplié par mille par rapport aux individus sains et ont aussi un risque élevé (dix ou vingt fois) de développer certains types de cancers internes. La majorité des patients vont développer des cancers de type BCC et SCC, et parfois des mélanomes à un âge moyen de huit ans. Par ailleurs, moins de 20% des patients XP vont démontrer des anomalies neurologiques progressives, surtout les patients XPA, qui ont des symptômes plus sévères que les patients XPF par exemple. En effet, le syndrome XP est caractérisé par une hétérogénéité génétique et, par conséquence, on observe une grande variabilité dans la sévérité du défaut en réparation et des symptômes tels que la sensibilité au soleil et les anomalies neuronales, selon le type de mutation et le gène impliqué.

Le syndrome CS est caractérisé par une photosensibilité cutanée et un retard physique et mental, mais le risque de développer un cancer de la peau chez les individus atteints n'est pas augmenté (78). De plus les individus CS meurent à l'âge moyen de 12,5 ans, souvent de pneumonie ou d'autres infections respiratoires. Le syndrome CS est caractérisé par une mutation dans les gènes CSA ou CSB, indiquant

donc un défaut en TCNER uniquement, et une GNER normale. Le fait que les individus CS ont une GNER normale expliquerait peut-être qu'ils n'ont pas de risque augmenté de cancer puisqu'ils sont quand même capables de réparer leur ADN endommagé. D'autre part, il semblerait que les patients CS soient aussi déficients en réparation des dommages oxydatifs (79).

Le troisième syndrome impliquant les gènes de réparation de la voie NER est la TTD. Les individus atteints possèdent un retard mental et physique et sont caractérisés par les cheveux cassants et de l'ichthiose (desquamation de la peau). Une photosensibilité a été rapportée chez certains patients TTD, mais pas chez la totalité. Les individus TTD possèdent une mutation dans les gènes de réparation XPB, XPD ou TTDA, chacun codant pour une sous-unité de TFIIH (80).

Ainsi, ces différents syndromes démontrent l'importance de la voie NER dans le maintien de la stabilité génomique, et comment un défaut dans cette voie, notamment chez les patients XP, peut entraîner une prédisposition au cancer.

III) Le suppresseur de tumeurs p53

1) Structure

C'est en 1979 qu'est parue la première publication décrivant l'interaction entre un virus associé au cancer (SV40) et une protéine cellulaire de 53 kDa (81). Cette protéine, appelée par la suite p53, fut alors reconnue comme oncogène, puis comme suppresseur de tumeurs après le clonage moléculaire de son ADN complémentaire (ADNc) en 1985 (82). En effet, de nombreuses propriétés attribuées initialement à p53 telles que sa capacité d'immortaliser des cellules et de transformer des fibroblastes primaires de rat en coopération avec *ras*, ainsi que l'augmentation de l'efficacité de son pouvoir transformant lorsque celle-ci est mutée, suggéraient que p53 agissait comme un oncogène (83-85). Néanmoins, on détermina par la suite que l'ADNc de p53 utilisé dans ces expériences contenait des mutations affectant la conformation et la fonction de la protéine, et que la perte d'expression ou de fonction de p53 est un facteur important dans la transformation cellulaire (86-89).

Ces études ainsi que d'autres études subséquentes, ont permis d'établir clairement que p53 est un suppresseur de tumeurs, non un oncogène.

Le gène codant pour p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p3) et est constitué d'environ 20 kb contenant 11 exons (90-92). Par ailleurs, p53 est très conservée entre les espèces, surtout au niveau des régions cruciales pour les fonctions de p53 (93, 94). La protéine p53 contient 393 acides aminés et quatre domaines fonctionnels majeurs : un domaine d'activation de transcription en N-terminal, un domaine de liaison à l'ADN dans la partie centrale, ainsi qu'un domaine d'oligomérisation (tétramérisation) et un domaine de régulation en C-terminal de la protéine (figure 5).

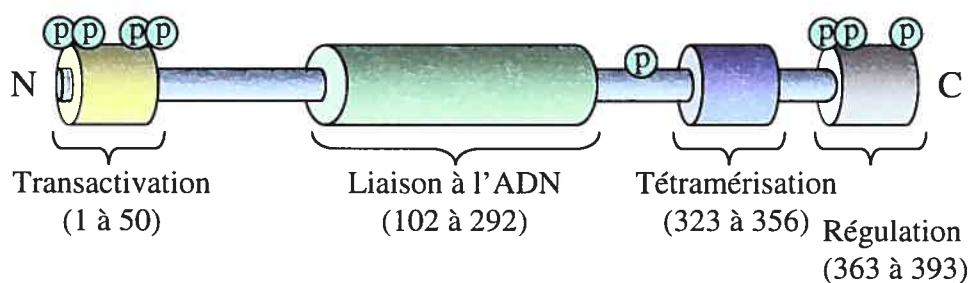


Figure 5. Représentation schématique de la structure de la protéine p53.

N, région amino-terminale; C, région carboxy-terminale; P site de phosphorylation. Les nombres réfèrent aux résidus d'acides aminés.

La portion N-terminale de p53 permet de recruter les facteurs appartenant à la machinerie de transcription basale, dont la protéine liant la boîte TATA (TBP) et le facteur associé à TBP (TAF), composants du complexe TFIID (95, 96). Les protéines RPA ainsi que la sous-unité p62 du facteur de transcription et de réparation TFIIF interagissent aussi avec le domaine N-terminal de p53 (97, 98). Par ailleurs, ce domaine de transactivation est aussi le site de liaison du régulateur négatif de p53, MDM2 (99, 100). La régulation de p53 par MDM2 est bidirectionnelle (101). En effet, en liant p53, MDM2 inhibe son activité de transactivation et permet de contrôler les niveaux de p53 dans la cellule puisque MDM2 cible p53 pour sa

dégradation (102). Par ailleurs, le gène *mdm2* est lui-même transactivé par p53, permettant un rétrocontrôle négatif de p53 sur son activité (103). De plus, la région N-terminale de p53 est la cible de protéines virales telles que E1B-55kDa de l'adénovirus, la protéine E6 du virus du papillôme humain (HPV), et de la protéine x du virus de l'hépatite B (HBx, voir paragraphe VI), qui vont ainsi inhiber ses fonctions (104-107).

La région centrale de p53 est le site de 80 à 90% des mutations retrouvées dans les tumeurs et contient le domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît et lie une séquence consensus (108). Cette région de p53 est aussi le site de liaison de l'antigène T du virus SV40 et des protéines cellulaires 53BP1 et 53BP2 (109-111), et contient un atome de zinc permettant de stabiliser la liaison de p53 à la molécule d'ADN (112).

Le domaine C-terminal de la protéine p53 possède une région flexible capable de connecter le domaine central avec la région C-terminale, ainsi qu'un domaine de tétramérisation. En effet, il est bien établi que la protéine p53 forme des tétramères par l'intermédiaire de ce domaine, et que la formation de tétramères est nécessaire aux fonctions de p53 (113, 114). Par ailleurs, le domaine C-terminal contient trois signaux de localisation nucléaires (NLS) permettant à p53 de pénétrer dans le noyau et d'y exercer ses fonctions de transactivation. La région située à l'extrémité C-terminale est connue sous les noms de domaine régulateur, de domaine apoptotique ou de domaine de reconnaissance des dommages à l'ADN. Cette portion semblerait agir comme régulateur négatif de la liaison de p53 à une séquence spécifique (115, 116). La région C-terminale de p53 peut être liée par les protéines XPB et XPD de TFIIH, ainsi que la protéine CSB, suggérant un rôle important de p53 dans les voies GNER et TCNER (117) (voir paragraphe III 5)). Par ailleurs, la protéine HBx lierait aussi la portion C-terminale de p53, empêchant ainsi son interaction avec XPB (105).

D'autre part, plusieurs études ont montré que p53 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles afin d'être activée telles que des phosphorylations, acétylations, glycosylations et sumoylations, en réponse aux dommages à l'ADN (118-120).

2) Rôle de p53 dans la réponse aux dommages à l'ADN

Les souris transgéniques déficientes en p53 se développent normalement mais ont une forte prédisposition à un développement précoce de tumeurs. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que p53 joue un rôle crucial dans la réponse aux dommages à l'ADN, en participant aux mécanismes d'apoptose et d'arrêt du cycle cellulaire. Suite à des dommages à l'ADN, p53 est rapidement stabilisée et s'accumule dans la cellule. Plusieurs types de dommage au niveau de l'ADN vont entraîner une stabilisation et une activation de p53, dont ceux générés par les radiations ionisantes (rayons γ ou IR), les UV, ainsi que des composés liant l'ADN comme le méthyl méthane sulfonate (MMS) et la toxine hépatique aflatoxine B1 (voir paragraphe IV 2)) (121). L'augmentation des niveaux intracellulaires de p53 est majoritairement causée par les modifications post-traductionnelles que subit la protéine, et non à une augmentation dramatique des niveaux de l'ARNm de p53 (122). Ces modifications post-traductionnelles vont entraîner une forte augmentation de la demi-vie de la protéine (123). Néanmoins, le contrôle de la traduction de l'ARNm de p53 jouerait aussi un rôle clé dans la réponse aux dommages à l'ADN puisqu'en présence de l'inhibiteur de la traduction cycloheximide, l'accumulation de p53 est réduite et l'arrêt du cycle cellulaire partiellement inhibé (122). Les modifications post-traductionnelles majeures suite aux dommages à l'ADN sont la phosphorylation et l'acétylation de la protéine p53. En effet, suite à ces dommages, p53 sera phosphorylée en N-terminal au niveau des sérines 15 et 20 (ser15 et ser20), réduisant l'interaction de celle-ci avec son inhibiteur MDM2 (124, 125). De plus, d'autres résidus sont phosphorylés comme la ser33 et ser37, ainsi que la ser392 qui est phosphorylée suite à une irradiation aux UV, mais non aux IR (118, 126, 127). La phosphorylation de p53 est effectuée par des kinases de la famille des PI 3-kinases, les protéines codées par le gène muté dans la maladie génétique ataxia-telangiectasia (ATM) et la protéine qui y est reliée, ATR. ATM et ATR agissent en amont de p53 dans les voies de signalisation activées en réponse aux IR, UVA et UVB pour ATM et aux UVC pour ATR (figure 6) (128-131). ATM et ATR agiraient comme senseurs

et seraient activées directement par les modifications de la structure de l'ADN causées par les agents endommageant l'ADN (132). Par ailleurs, en plus de phosphoryler p53, des études ont démontré qu'ATM phosphorylerait MDM2, réduisant ainsi son potentiel inhibiteur sur p53 (133, 134). De plus, p53 serait phosphorylée par les kinases CHK1 et CHK2/hCDS1 impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, au niveau de la ser20 (figure 6) (135). Cette dernière étant elle-même phosphorylée par ATM (136). Une étude récente a démontré que p53 pouvait aussi être phosphorylée sur la ser46 et activée par la protéine kinase-2 interagissant avec l'homéodomaine HIPK2 (137). D'autre part, la déphosphorylation serait aussi un mécanisme crucial dans la régulation de l'activité de p53, notamment au niveau de la ser376, permettant ainsi la liaison de p53 à l'ADN (138). De plus, l'acétylation est un mécanisme majeur dans l'activation de p53 (139). En effet, suite aux dommages à l'ADN, p53 est acétylée au niveau des lysines 320, 373 et 382 par les histone acétyltransférases CBP/p300 et PCAF (118, 140) (figure 6).

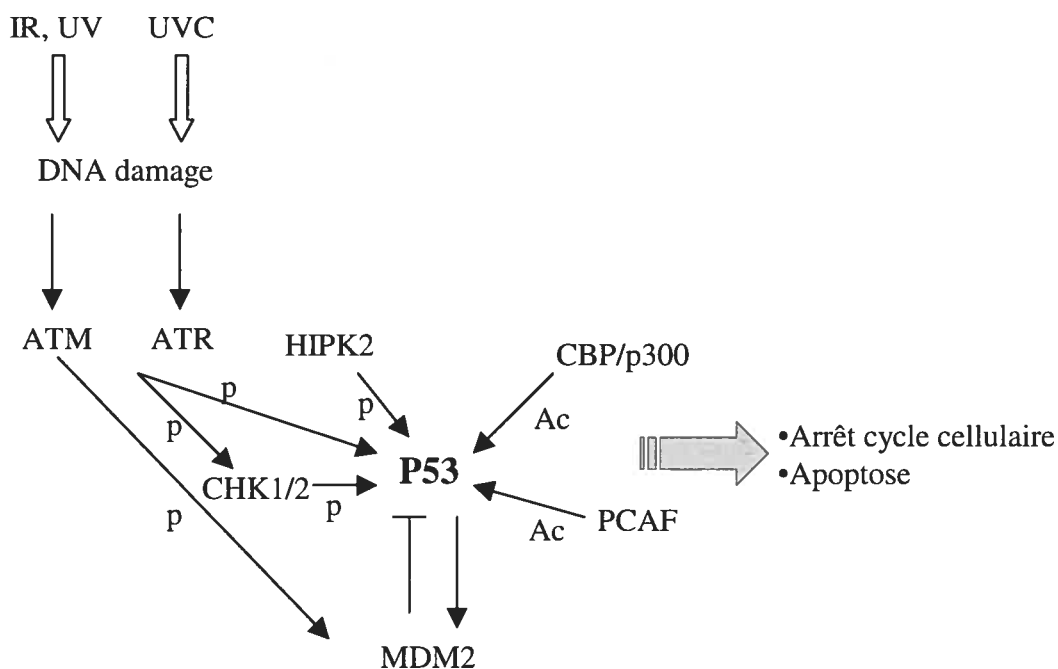


Figure 6. Modifications post-traductionnelles majeures de p53 en réponse aux dommages à l'ADN.

P, phosphorylation; Ac acétylation.

3) Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire

En réponse aux radiations ionisantes, p53 va induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, afin de permettre aux cellules de réparer l'ADN endommagé (141). Le cycle cellulaire est composé de quatre phases : la phase G1 au cours de laquelle la cellule grossit et synthétise les ARNm et protéines nécessaires à la réplication de l'ADN, la phase S qui permet la réplication de l'ADN, la phase G2 durant laquelle la cellule se prépare à entrer en mitose (phase M) permettant la division de la cellule en deux cellules filles. La cellule possède plusieurs points de contrôle, en phases G1, S, et G2, afin d'éviter la poursuite du cycle lorsque l'ADN est endommagé. Les fibroblastes embryonnaires de souris p53 $-/-$ n'arrêtent pas leur cycle en phase G1 suite à une irradiation aux rayons γ (142). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que les cellules ATM sont aussi déficientes en arrêt en G1, démontrant ainsi un rôle majeur des protéines p53 et ATM dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1 suite aux dommages à l'ADN. En effet, dans les fibroblastes diploïdes normaux, une exposition aux radiations ionisantes va entraîner un arrêt prolongé du cycle dépendant de p53, associé à une induction soutenue de la protéine p21WAF1 (143). p21WAF1 est un facteur critique transactivé par p53, médiant l'arrêt dépendant de p53 en phase G1 (144). Des études ont néanmoins démontré que des fibroblastes embryonnaires de souris p21 $-/-$, ne sont que partiellement déficients en arrêt en phase G1 après exposition aux IR, suggérant l'existence d'une voie indépendante de p21 (145). p21 appartient à la famille des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKIs), dont fait aussi partie la protéine p16. Les cyclines sont des protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire et sont associées à des kinases (CDKs) spécifiques selon la phase du cycle : cycline D/CDK4/6 et cycline E/CDK2 en phase G1, cycline A/CDK2 en phase S et cycline B/CDK1 en phase G2. P21 inhibe CDK4/6, CDK2 et CDC2, empêchant ainsi la progression du cycle (figure 7) (146). La cible ultime de l'activité inhibitrice de p21 sur le cycle cellulaire est la protéine du rétinoblastome RB. Durant la phase G1, Rb est sous sa forme hypophosphorylée, et dans cet état va lier et séquestrer le facteur de transcription stimulateur de la phase S, E2F (147). RB appartient à une famille de

protéines comprenant aussi p107 et p130, qui vont aussi lier E2F et joueraient ainsi un rôle dans l'arrêt du cycle (148). La phosphorylation de RB par les CDKs résulte en la libération de E2F qui sera ensuite libre de transactiver les gènes nécessaires pour la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à S (figure 7) (148). Ainsi, en inhibant les CDKs, p21 va empêcher la phosphorylation de RB et donc la progression du cycle (149). Cet arrêt en G1 préviendrait la réplication de l'ADN endommagé et permettrait la réparation de l'ADN avant l'entrée en phase S. Par ailleurs, p53 serait aussi impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, via l'inhibition de cycline B/CDK1 par p21 (150-152). L'inhibition de cycline B/CDK1 empêche la condensation de la chromatine ainsi que la fragmentation nucléaire nécessaires à la division cellulaire (figure 7).

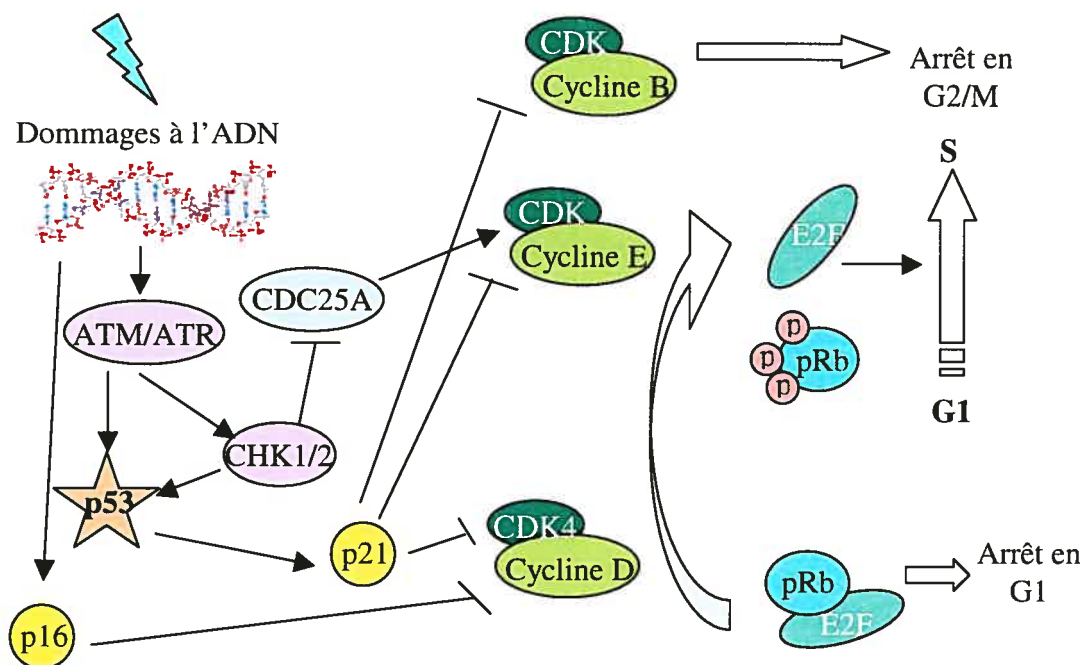


Figure 7. Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN.

Si p53 est absolument nécessaire à l'arrêt en G1 suite à une exposition aux radiations ionisantes, il n'en est pas de même après irradiation aux UV. En effet des études ont montré que l'arrêt en G1 et l'induction de p21 suite à une irradiation aux UVC, seraient indépendants de p53 (153, 154). Ainsi, le rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire dépendrait du type de dommages au niveau de l'ADN.

4) Rôle de p53 dans l'apoptose

Lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants, p53 sera activée et induira la mort cellulaire programmée de la cellule, ou apoptose. En effet, comme dans le cas de l'arrêt en G1, de multiples études ont permis de montrer que divers types de cellules déficientes en p53, ont un défaut dans l'induction de l'apoptose suite à certains types de dommages à l'ADN (155, 156). Alors que l'induction de p21 par p53 n'est pas nécessaire à l'induction de l'apoptose, d'autres protéines induites par p53 jouent un rôle majeur dans ce mécanisme. En effet, p53 induit l'expression du récepteur de mort FAS (157) et de la protéine proapoptotique Bax qui va antagoniser l'action du facteur antiapoptotique Bcl-2 (158). Il existe deux voies principales menant à l'apoptose. La première voie est la voie extrinsèque, ou des récepteurs de mort. Cette voie est activée par des signaux extracellulaires qui vont stimuler les récepteurs de mort FAS, TNFR, DR3, DR4 et DR5 entraînant le clivage et l'activation de cystéine protéase, ou caspases (159, 160). La caspase 8 est l'initiatrice de la voie apoptotique extrinsèque et va ensuite cliver et activer les caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces dernières caspases induisent le clivage des protéines du cytosquelette et la fragmentation de l'ADN, étapes caractéristiques de l'apoptose (figure 8). La seconde voie est la voie apoptotique intrinsèque, indépendante des récepteurs de mort. Cette voie est activée par des signaux internes tels que les ROS ou les dommages à l'ADN, et a pour site principal la mitochondrie. La protéine Bax va entraîner le relargage du cytochrome c de la mitochondrie qui mènera à l'activation de la caspase 9, puis de caspases effectrices induisant l'apoptose (figure 8). L'action de Bax est inhibée par le facteur antiapoptotique Bcl-2 (161, 162). Ces deux voies apoptotiques sont néanmoins étroitement reliées, notamment *via* la protéine bid faisant le lien entre la caspase 8 et la mitochondrie

(163, 164). L'induction de Bax et du récepteur FAS suite à l'activation de p53 par les dommages à l'ADN, va ainsi activer les voies apoptotiques et mener à la mort cellulaire (figure 8). De plus, les UV induisent l'apoptose en activant directement le récepteur TNFR en l'absence de ligand et ce, indépendamment de p53 (165).

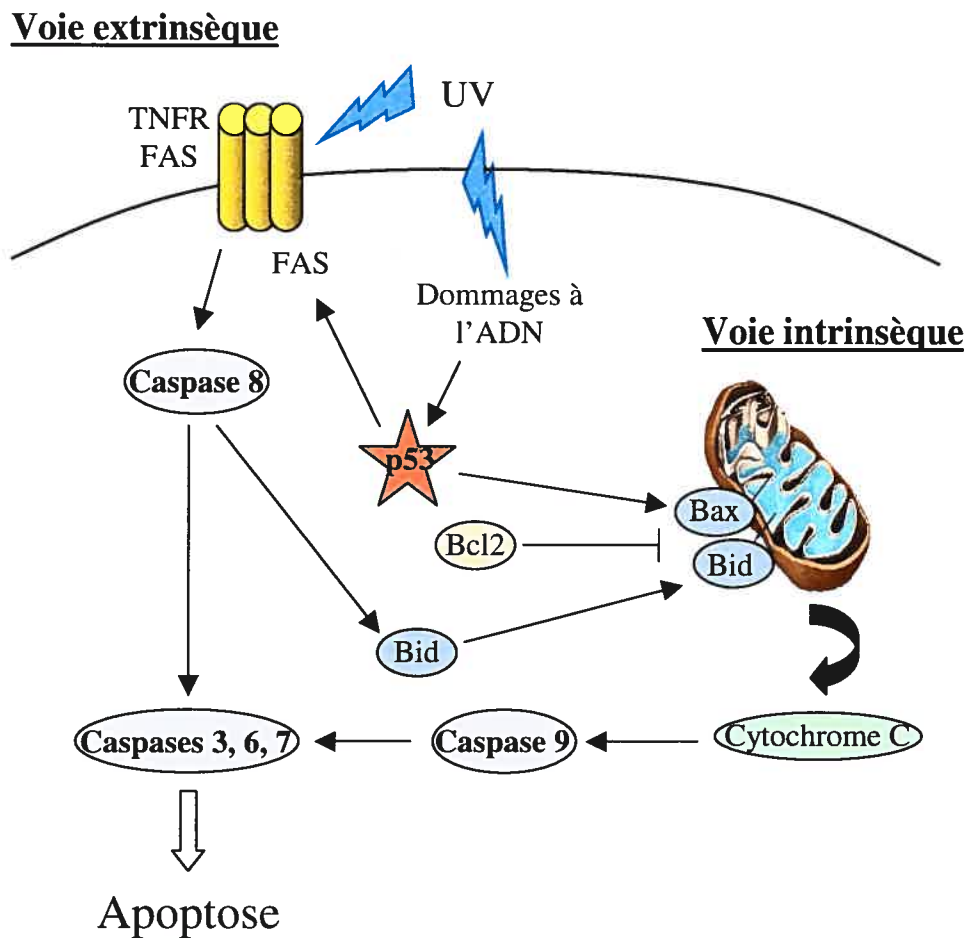


Figure 8. Rôle de p53 dans les voies de signalisation apoptotiques induites par les rayons UV.

5) Rôle de p53 dans la réparation de l'ADN

Outre son rôle majeur dans les voies apoptotiques et l'arrêt du cycle cellulaire, p53 joue aussi un rôle important dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, plusieurs études ont démontré que p53 joue un rôle crucial dans la voie NER. Le rôle de p53 dans la voie GNER est maintenant bien établi puisque plusieurs groupes ont montré que les cellules déficientes en p53 ont une voie GNER moins efficace que les cellules exprimant p53 sauvage, suite à une irradiation aux UV (166-168). Néanmoins, le rôle de p53 dans la voie TCNER dans la réparation des CPDs dans les cellules humaines semble être controversé. En effet, une étude a démontré qu'après irradiation aux UVC 254nm, les fibroblastes déficients en p53 ont un défaut en GNER uniquement, au niveau des gènes *dihydrofolate réductase (dhfr)* et p53 (169). D'autre part, une autre étude de notre laboratoire a établi qu'après irradiation des mêmes types cellulaires aux UVB polychromatiques, les cellules exprimant p53 mutée sont déficientes en TCNER par rapport aux cellules exprimant p53 sauvage (168). Cette controverse fut résolue par notre laboratoire, démontrant que ces divergences sont dues aux longueurs d'onde différentes employées dans ces deux études (voir article I et discussion). Comme mentionné plus haut, le rôle de p53 dans la voie GNER pourrait s'expliquer par l'interaction de p53 avec les protéines XPB et XPD, alors que son implication dans la voie TCNER pourrait être due à la liaison de p53 avec CSB (117). Néanmoins, le rôle précis de p53 dans la voie NER reste encore à être précisé.

Parmi les différents types de bases endommagées, les bases alkylées ou oxydées sont réparées par la voie de réparation par excision de bases (BER). La voie BER est initiée par la reconnaissance de la base endommagée par une glycosylase spécifique au type de dommage. Dans les cellules de mammifère, onze glycosylases possédant une spécificité de substrat ont été identifiées (170). Les étapes suivantes consistent en l'enlèvement de la base endommagée, créant un site apurinique/aprimidinique (AP), suivit d'une incision effectuée par l'AP endonucléase (APE), puis de l'insertion de nucléotides par pol β via la voie de réparation «longue» ou «courte». De plus, il semblerait que la voie BER, comme la

voie NER, possède aussi une sous-voie couplée à la transcription (171). Certaines évidences ont permis de montrer que la protéine p53 semble jouer un rôle important dans la voie BER. En effet, p53 stimule la voie BER *in vitro* en interagissant directement avec APE et pol β , stabilisant la liaison de pol β au site AP (172). Néanmoins, la nécessité de l'activité transcriptionnelle de p53 dans la voie BER n'est pas claire. Une étude a montré que la protéine p53 mutée ne possédant pas d'activité transcriptionnelle, est encore plus efficace que p53 sauvage dans la stimulation de la voie BER *in vivo* et *in vitro* (173). Par ailleurs, des cellules déficientes en p53 semblent réparer moins efficacement les bases alkylées induites par l'agent méthyl méthane sulfonate (MMS), probablement puisque celles-ci ont des niveaux de pol β plus faibles que les cellules p53 sauvage (174). De plus, les souris exposées à l'agent oxydant 2-nitropropane ont une augmentation de leurs niveaux de p53 et de pol β , ainsi qu'une activité BER augmentée (175). Il est intéressant de mentionner certaines études ayant suggéré un lien entre les voies de réparation NER et BER. En effet, les cellules de certains patients XPG seraient déficientes dans la réparation des dommages oxydatifs, suggérant un lien entre les voies NER et BER (79). De plus, la réparation efficace des dommages oxydatifs sur le brin transcrit nécessiterait les protéines XPG, TFIIH et CSB (176).

La troisième voie de réparation majeure dans les cellules de mammifère, est la voie de réparation des mésappariements, ou MMR. Certaines évidences sembleraient attribuer un rôle à la protéine p53 dans cette voie. La voie MMR répare les bases mal appariées lors de la réplication de l'ADN, et participe dans la réponse cellulaire induite par les bases oxydées, alkylées ou liées à un composé chimique (177-179). Les protéines hPMS1, hPMS2 et hMLH1 impliquées dans cette voie seraient stabilisées par ATM suite à des dommages à l'ADN (180). De plus, l'augmentation des niveaux des protéines hPMS1 et hMLH1 serait important pour la phosphorylation de p53 par ATM (180). Par ailleurs, hPMS2 interagit avec p73, un homologue de p53, dans des cellules exposées au cisplatine (181). Une autre étude suggère que p53 interagit avec la voie MMR suite à des dommages oxydatifs (182).

D'autre part, plusieurs études ont montré le rôle important de la protéine associée au cancer du sein BRCA1, dans les mécanismes de réparation de l'ADN. En

effet, des études sur des cellules embryonnaires de souris déficientes en BRCA1 ont montré que celles-ci possèdent une voie BER couplée à la transcription moins efficace que leurs homologues exprimant BRCA1 (183). Ainsi, BRCA1 serait impliquée dans la voie de réparation BER. Par ailleurs, une étude récente a démontré que BRCA1 stimulerait la voie NER en induisant les facteurs de reconnaissance des dommages (184). Or, BRCA1 interagit avec p53 et stimule son activité transcriptionnelle mais les mécanismes précis de stabilisation de p53 par BRCA1 restent encore à être élucidés (185).

Ainsi, en plus de son implication dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, p53 jouerait un rôle majeur dans les diverses voies de réparation des dommages à l'ADN.

6) Rôle de p53 dans la carcinogénèse

Étant donné le rôle majeur de la protéine p53 dans les mécanismes fondamentaux tels que le cycle cellulaire, l'apoptose, et la réparation de l'ADN, il est facile d'imaginer comment un défaut de cette protéine peut avoir des effets majeurs sur l'efficacité de ces mécanismes dans la protection contre la carcinogénèse. Le gène codant pour p53 est délété ou muté dans plus de la moitié des cancers retrouvés dans une grande variété de tissus (186-189). En fait, *p53* est le gène le plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines (187, 190). Un grand nombre de mutations dans le gène de p53 ont été rapportées et beaucoup d'entre elles résultent en la synthèse de dominants négatifs qui, en formant des tétramères avec des molécules sauvages, vont supprimer les fonctions de p53 (191). De plus, d'autres mutations peuvent entraîner un gain de fonction de p53 contribuant à la transformation cellulaire (192). Par ailleurs, le rôle crucial de p53 dans le maintien de la stabilité du génome est mis en évidence chez les patients atteints du syndrome héréditaire de Li-Fraumeni. En effet, ces individus possèdent des mutations dans le gène codant pour p53, et ont un risque élevé de développer une variété de cancers dont divers sarcomes, ainsi que des cancers des os, du sein et du cerveau, à un âge plus précoce que l'âge habituel d'apparition de ces tumeurs (193). De plus, des

études sur des souris possédant des allèles mutés de p53 ou déficientes en p53, vont se développer normalement mais ont une forte incidence de diverses tumeurs (194-197). La nature, la localisation et le type de mutations dans le gène p53 peuvent dépendre de divers facteurs comme le type de tissus atteint ainsi que le type de carcinogène endogène ou exogène, responsable de l'apparition de la mutation. La première corrélation entre un carcinogène particulier et une mutation spécifique du gène p53 fut révélée suite à l'identification de la haute fréquence de la transversion G→T au niveau du codon 249 de p53 dans les carcinomes hépatocellulaires en Asie et en Afrique (198). D'autres études ont permis de démontrer un lien important entre la mutation CC→TT dans les SCC et les rayons UV (20), ainsi qu'entre l'exposition à la fumée de cigarette et la transversion G→T.

Comme nous l'avons vu précédemment, p53 est un régulateur clé dans de nombreux processus cellulaires, dont le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN, suite à des dommages à l'ADN (voir paragraphes précédents). Ces fonctions cellulaires peuvent non seulement être affectées directement par des mutations dans le gène de p53, mais aussi indirectement par des mutations dans les protéines des voies de signalisation impliquant p53, ou encore *via* l'interaction de p53 avec diverses oncoprotéines virales. En effet, des mutations dans le gène codant pour le régulateur de p53 MDM2 entraînant sa surexpression, ont été retrouvées dans certains types de tumeurs (199). Par ailleurs, p53 interagit avec de nombreuses protéines virales affectant ses fonctions comme T de SV40, E1B de l'adénovirus, E6 du HPV ainsi que la protéine HBx du virus de l'hépatite B qui sera discutée en détail dans le paragraphe VI. Ces interactions protéine-protéine vont entraîner une inactivation des fonctions de p53 en inhibant sa liaison spécifique à l'ADN et/ou son activité transcriptionnelle, en séquestrant p53 dans le cytoplasme ou en stimulant sa dégradation (106, 107).

IV) Le cancer du foie ou hépatocarcinome

1) Généralités

L'hépatocarcinome ou carcinome hépatocellulaire (CHC) représente le 7^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme et le 9^{ème} chez la femme, et constitue 5% de tous les cancers dans le monde. On estime à plus de 500 000 le nombre de nouveaux cas et de décès par année (200). La prévalence de l'hépatocarcinome est inférieure à 5/100 000 en Europe et en Amérique du nord, et est supérieure à 15/100 000 dans la pluparts des pays d'Asie et en Afrique. Ces répartitions géographiques différentes peuvent être expliquées par l'exposition à des composés toxiques dont l'alcool en Europe et Amérique du nord, ainsi qu'à l'aflatoxine B₁ (AFB₁, voir paragraphe 2), en Afrique et en Asie (201). Outre ces composés, l'infection par les virus hépatiques B et C (HBV et HCV) respectivement en Afrique/Asie et en Europe/Amérique du nord, constitue un facteur de prédisposition majeur au CHC (201).

Le développement du CHC comporte plusieurs étapes, et l'origine de ce processus est multifactorielle. Ce processus peut prendre plus de 30 ans suivant l'infection au HBV ou HCV, ou l'exposition à l'AFB₁ (figure 9). Chez une fraction de patients infectés chroniquement par le HBV ou le HCV, la cirrhose et le CHC apparaissent très fréquemment (202, 203). Dans la majorité des cas, l'origine du CHC est une hépatite chronique, ou cirrhose, menant à la mort des hépatocytes, altérant ainsi le microenvironnement du foie. Les hépatocytes dont le phénotype est modifié suite à l'inflammation, formeront alors des foci et nodules (201, 204). Par ailleurs, de nombreuses anomalies chromosomiques ont été décrites chez des patients atteints de CHC, témoignant ainsi d'une instabilité génétique (204). Ces altérations génomiques semblent se développer de façon aléatoire et mènent à la formation de lésions préneoplasiques se développant ensuite en hépatocytes dysplasiques, puis en CHC. L'hétérogénéité des lésions génomiques des CHC suggère que les hépatocarcinomes seraient générés à la suite d'altérations à la fois génétiques et épigénétiques, compromettant ainsi une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

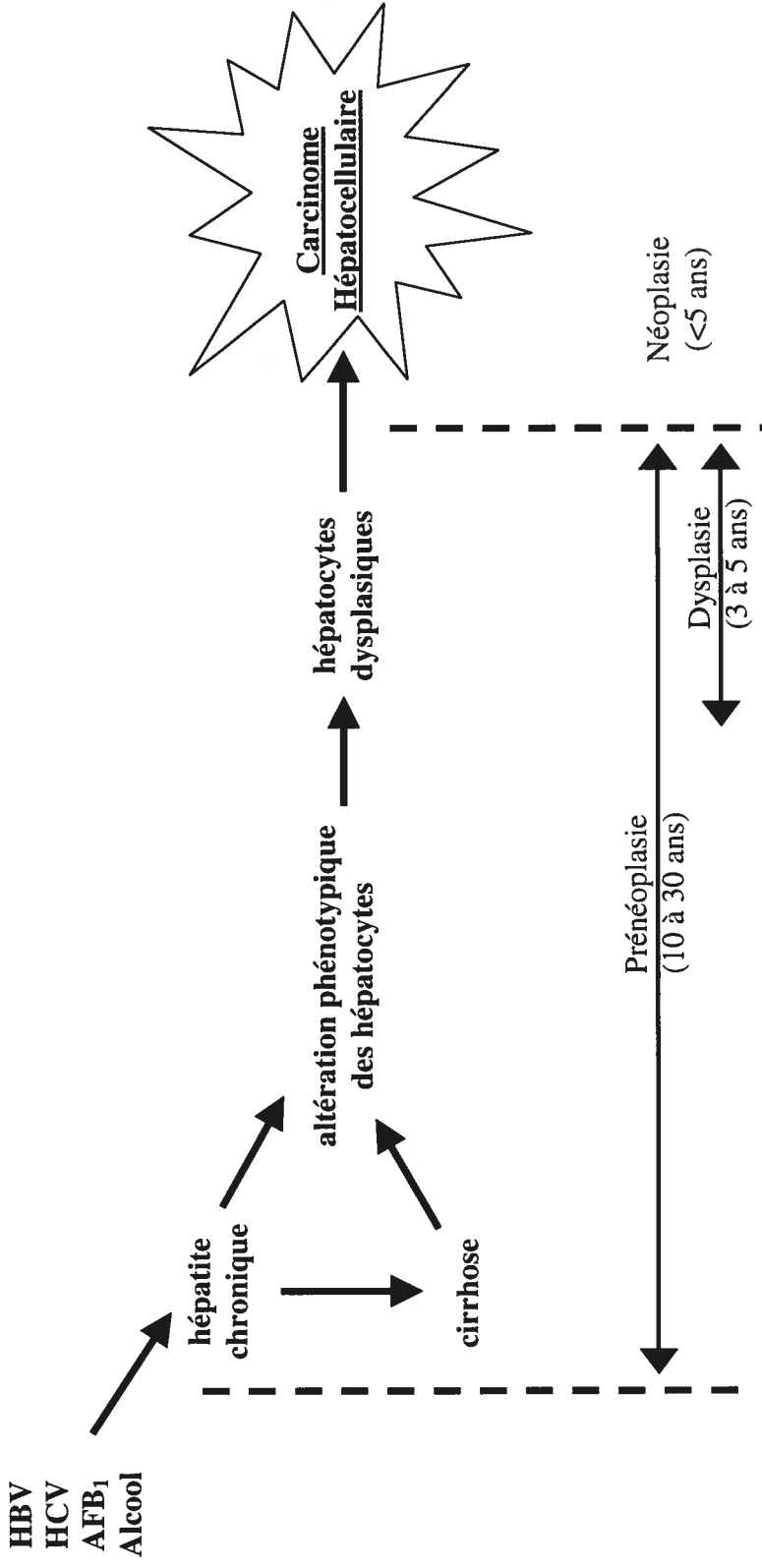


Figure 9. Séquences chronologiques des lésions cellulaires menant au développement du carcinome hépatocellulaire.

L'identification de pertes alléliques sur plusieurs chromosomes, 17p le plus fréquemment, suggère l'implication de gènes suppresseurs de tumeurs dans l'apparition des CHC. En effet, l'inactivation bi-allélique (perte d'hétérozygotie) du suppresseur de tumeurs p53, a été observée dans 20 à 50% de CHC (205). Par ailleurs, les CHC liés à une exposition à l'aflatoxine B1 montrent des fréquences de mutation dans p53 beaucoup plus élevées (206), alors que la distribution des anomalies chromosomiques ne diffère pas selon l'origine virale (HBV ou HCV) du CHC (207). Même si les causes et le développement du CHC sont de mieux en mieux connues, les bases moléculaires de la pathogénèse du CHC sont néanmoins encore majoritairement inconnues.

Le pronostic de ce type de cancer demeure mauvais. La transplantation hépatique est le traitement le plus efficace. Celle-ci élimine la cirrhose mais pas le risque d'apparition de métastases. Néanmoins, le nombre de donneurs limite ce type de traitement. Il est donc essentiel de mieux comprendre les bases moléculaires du CHC afin d'améliorer la prévention et les moyens de traitement.

2) L'aflatoxine B₁ et l'hépatocarcinome

L'aflatoxine B₁ est un métabolite fongique produit par *Aspergillus flavus* (figure 10 A) et contaminant les réserves de nourriture, notamment de riz, de maïs et d'arachide, principalement dans les régions chaudes et humides d'Asie et d'Afrique (208). AFB₁ est potentiellement hépatocarcinogène chez une variété d'espèces animales (209) et doit être métabolisé (activé) par les cytochromes P450 (210) afin de former le composé AFB₁-8,9-époxyde (figure 2 B) capable de lier l'ADN de façon covalente, préférentiellement en position N⁷ de la guanine (AFB₁-N7-Gua) (211, 212). La formation de cet adduit va entraîner une dépurination résultant en la création d'un site apurinique (site AP). En outre, l'adduit AFB₁-N7-guanine peut former une structure chimiquement et biologiquement plus stable, AFB₁ formamidopyrimidine (AFB₁-FAPY) (figure 10 B). Alors qu'il est bien déterminé aujourd'hui que l'adduit AFB₁-N7-Gua a des propriétés mutagéniques (213), trop peu d'études ont été effectuées sur les autres adduits pour conclure

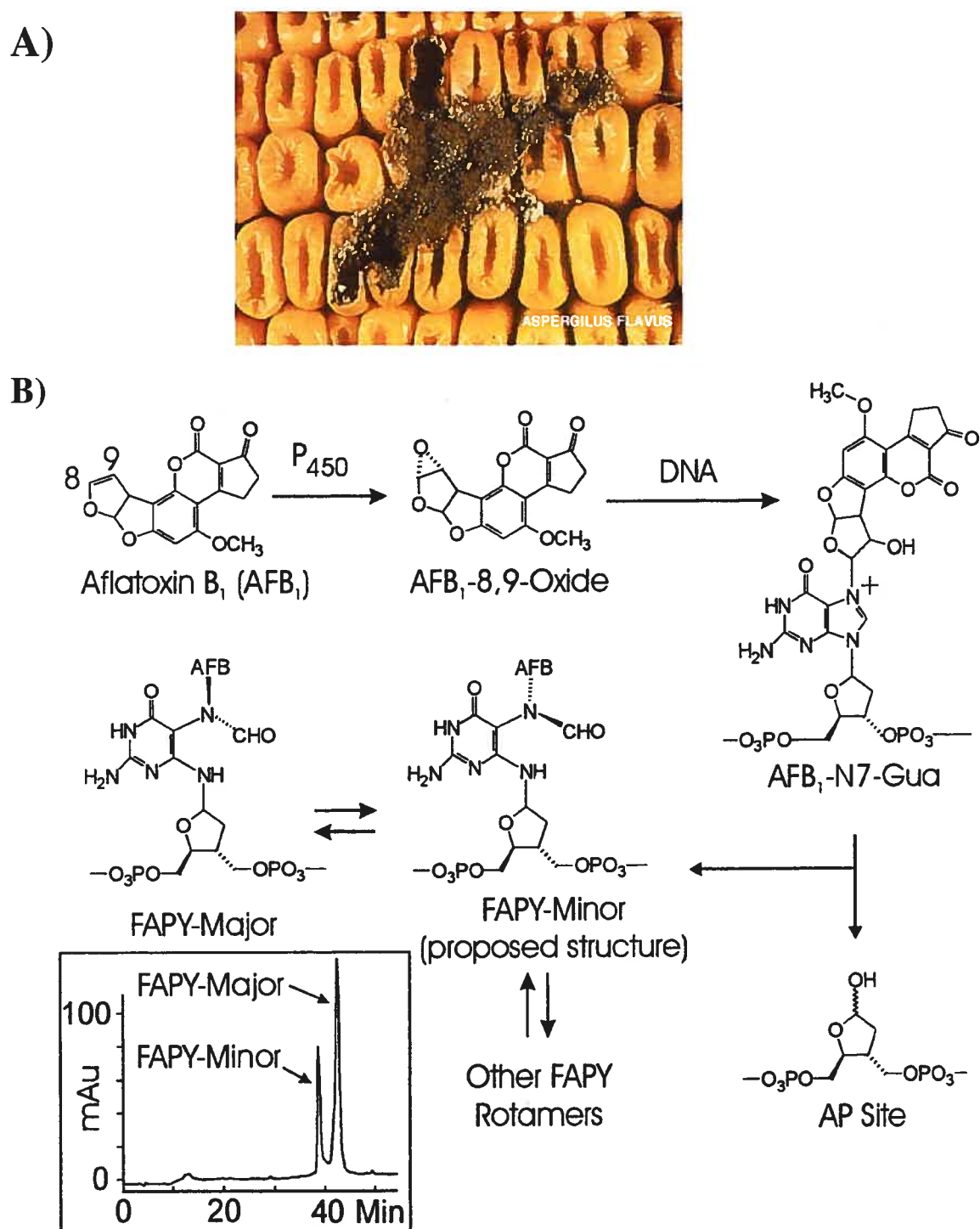


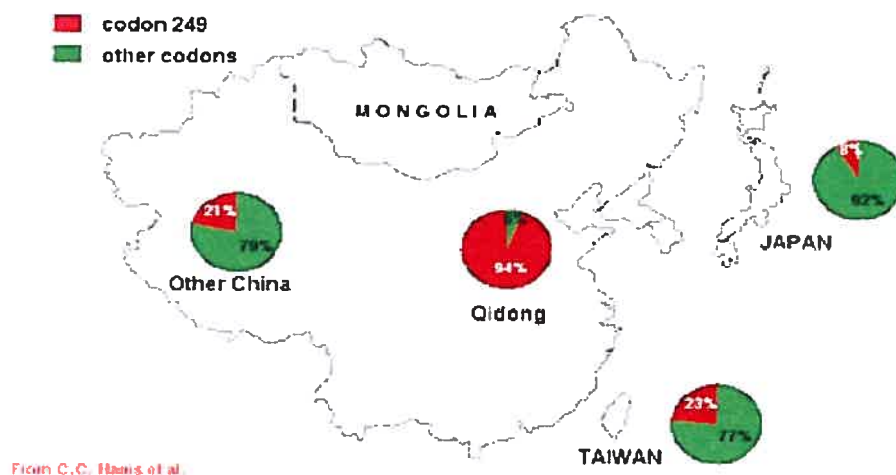
Figure 10. A) photo de *Aspergillus flavus*, B) voie d'activation métabolique de AFB₁ menant à la formation d'adduits avec l'ADN.

D'après Smela et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA .

définitivement à un rôle significatif dans l'hépatocarcinogénèse due à AFB₁. Néanmoins, une étude indique que les lésions de type AFB₁-FAPY joueraient un rôle majeur dans la mutagénèse menant au CHC (214). D'autres lésions peuvent aussi être créées par AFB₁, mais en quantité moindre (215). Ces adduits, s'ils ne sont pas réparés, vont mener à des changements génétiques (mutations) participant à la génération de cellules tumorales. Malgré la grande variété d'adduits formés dans les cellules exposées à l'AFB₁, la modification génétique majeure induite par l'AFB₁ est la transversion GC→TA. Plus particulièrement, on retrouve dans plus de 50% des cas de CHC analysés dans ces régions du monde (figure 11), la mutation caractéristique G→T à la troisième position du codon 249 du gène suppresseur de tumeur p53 (198, 206), résultant en la modification Arg→Ser. Cette mutation semble être spécifique aux tumeurs du foie induites par AFB₁ puisqu'elle n'est pas retrouvée fréquemment dans d'autres types de tumeurs induites par d'autres carcinogènes. De plus, une étude a démontré que l'homologue de la mutation au codon 249 de p53 chez la souris (p53ser246) peut transformer des cellules en culture et est déficient dans ses fonctions d'activateur de transcription (216). D'autre part, un autre groupe a montré qu'un niveau significatif d'adduits peuvent aussi survenir dans différents codons des exons 7 et 8 du gène p53 (217). Le fait que cette mutation spécifique soit une cible particulière de AFB₁ ou que celle-ci soit sélectionnée ultérieurement reste encore à déterminer. De plus, la transversion GC→TA a aussi été retrouvée dans le proto-oncogène humain *Ha-ras* (218), dont l'activation serait impliquée dans de nombreux types de cancers (219). Par ailleurs, AFB₁ inhibe l'ARN polymérase II ainsi que la synthèse d'ARN nucléolaire (220) en altérant la conformation des régions transcriptionnellement actives de la chromatine (221).

Différents facteurs peuvent influencer la mutagénèse induite par AFB₁ menant à l'apparition du carcinome hépatocellulaire. Le facteur le plus important est certainement l'efficacité avec laquelle les lésions au niveau de l'ADN seront réparées. Les lésions causées par AFB₁ sont réparées par le système de réparation par excision de nucléotides. En effet, des études effectuées sur des cellules déficientes

Prévalence de la mutation du codon 249 en Asie



Prévalence de la mutation du codon 249 en Afrique

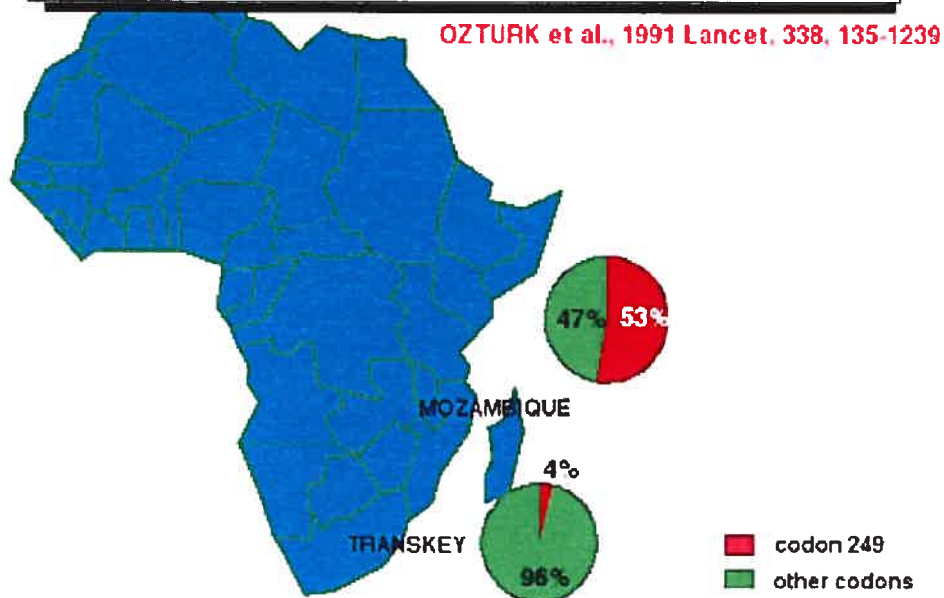


Figure 11. Prévalence de la mutation du codon 249 du gène p53 en Asie et en Afrique.

déficiences en NER ont montré que celles-ci réparaient les lésions induites par AFB₁ de façon moins efficace (53, 222, 223). De plus, des souris transgéniques déficientes en NER sont beaucoup plus susceptibles à l'hépatocarcinogénèse induite par l'AFB₁ (224). Par ailleurs, il est maintenant bien établi que la protéine x du virus de l'hépatite B (HBx) (voir paragraphe III) inhibe la voie de réparation NER (225-227), favorisant la persistance des lésions induites par AFB₁ chez les patients infectés par HBV et leur susceptibilité au CHC. D'autre part, la mutagenèse induite par AFB₁ peut être influencée par la structure de l'ADN qui peut rendre plus ou moins accessible certains sites (228).

3) Les virus hépatiques et les hépatocarcinomes

Les tumeurs associées à des virus constituent environ 15% de toutes les tumeurs humaines dans le monde. En plus de l'exposition à l'aflatoxine B₁, l'infection par les virus de l'hépatite B et/ou C (HBV et HCV respectivement) constitue un facteur de risque considérable dans le développement du CHC. En effet, ces infections sont présentes dans 80% des cas de CHC dans le monde. La prévalence des infections par le HBV ou le HCV diffère géographiquement (229). Par exemple, les infections au HBV se retrouvent surtout en Asie et en Afrique, régions où on retrouve aussi la plus forte exposition à AFB₁ ainsi les fréquences de mutation au codon 249 de p53 les plus élevées. Par contre, l'infection par le HCV jouerait un rôle majeur dans l'étiologie du CHC dans les régions d'Amérique du nord, d'Europe et du Japon. La prévalence de l'infection par le virus HCV chez les patients atteints de CHC dans ces régions varie de 80% au Japon à 30 % aux Etats-Unis (230, 231). Ainsi, le virus HCV est devenu la cause majeure de CHC dans un grand nombre de pays. Ce phénomène est certainement dû au fait qu'il existe un vaccin efficace contre le HBV, largement utilisé dans les pays « développés », alors qu'aucun vaccin n'est disponible à ce jour contre le HCV. Par ailleurs, il existerait une corrélation entre les différents génotypes du HBV et la réponse clinique des patients dont ceux atteints de CHC (232, 233).

Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer le rôle des virus HBV et HCV dans l'hépatocarcinogénèse. La première hypothèse résiderait dans le fait que le génome viral du HBV s'intégrerait dans une région du génome cellulaire qui entraînerait l'activation de proto-oncogène(s). HBV agirait ainsi comme un mutagène insertionnel. Néanmoins, l'analyse de tumeurs obtenues chez des patients infectés par le HBV n'a pas révélé de site préférentiel d'insertion du génome viral, même si certaines études ont montré que le génome pouvait s'intégrer proche ou à l'intérieur de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (234, 235). La deuxième hypothèse, et certainement la plus probable, serait que HBV et HCV, comme d'autres virus oncogéniques tel que le virus du papillome humain (HPV), contiendraient un ou plusieurs oncogène. En effet, une étude a démontré que la transfection de l'ADN du HBV dans des hépatocytes permet de rendre ces cellules immortelles, transformées et capables de former des tumeurs dans des souris nu (236). Des études ultérieures effectuées ont permis de démontrer que la protéine HBx de HBV était nécessaire et suffisante pour la transformation des cellule hépatiques (237) et l'induction de tumeurs du foie dans des souris transgéniques (238). De même, une étude a démontré que l'expression de la protéine core de HCV (HCVcore) dans des souris transgéniques entraînait l'apparition de carcinomes hépatocellulaires (239). Il est important de noter par ailleurs, que dans les études citées précédemment, les niveaux d'expression des protéines virales étaient largement supérieurs à ceux observés chez les patients atteints de CHC et pourraient ainsi amplifier les effets réels de ces protéines sur la carcinogénèse.

D'autre part, les coinfections avec HBV et HCV sont relativement fréquentes et associées avec des symptômes hépatique plus sévères, un risque de CHC augmenté d'environ cinq fois ainsi qu'une résistance accrue aux traitements (240-243). Certaines études ont montré une collaboration entre HBx et HCVcore dans l'efficacité de transformation de fibroblastes (244), ainsi que dans la répression du gène p21 impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire (245).

V) Le virus de l'hépatite B

1) **Épidémiologie**

Le virus de l'hépatite B (HBV) infecte chroniquement environ 5% de la population mondiale. L'infection par le HBV constitue un problème de santé mondiale puisqu'elle est responsable d'un million de décès par année (246). Par ailleurs, des estimations récentes montrent qu'il y aurait plus de 350 million d'individus porteurs du HBV. Parmi ceux-ci, 30% vont développer une cirrhose et 5 à 10 %, un hépatocarcinome (247). La prévalence de l'infection par le HBV est très variable géographiquement et coïncide fortement avec la prévalence des cas de CHC (de 10% en Asie à moins de 0.5% aux Etats-Unis et en Europe) (247). En effet, les porteurs chroniques du HBV ont un risque de développer le CHC multiplié par 100 (248, 249). Les voies de transmission de HBV peuvent être verticales (mère à enfant *via* le placenta), ou horizontales (transfusions sanguines ou contact avec les sécrétions d'un individu atteint). En Amérique du nord et en Europe, la transmission horizontale est la plus fréquente, majoritairement *via* des rapports sexuels non protégés (250-252). Contrairement à l'Asie où la transmission verticale est importante (253), l'infection par le HBV chez les nouveaux nés est moins fréquente en Afrique (254) où les enfants sont surtout infectés de façon horizontale *via* la salive et le sang (255).

Les virus de l'hépatite B infectant les humains dans différentes régions géographiques du monde sont classés en six géotypes différant entre eux par la séquence nucléotidique de leur génome. Les géotypes A et D ont une distribution globale, les géotypes B et C sont prédominants en Asie de l'est et du sud-est, le géotype E en majoritaire en Afrique, et le géotype le plus divergent, F, se retrouve exclusivement parmi les populations indigènes d'Amérique centrale et du sud (256, 257).

2) Pathologie

Les infections transitoires par le virus de l'hépatite B durent généralement un à six mois et comprennent une période asymptomatique d'incubation, souvent accompagnée d'une virémie élevée (jusqu'à 10^{10} par ml), pouvant elle-même durer plusieurs semaines. Pendant cette période, le système immunitaire est incapable de prendre le contrôle de l'infection, et peut permettre l'infection de tous les hépatocytes du foie à partir de seulement quelques hépatocytes infectés initialement (258, 259). Puis, en quelques semaines le virus est éliminé du sérum, accompagné de l'élimination des hépatocytes infectés et du remplacement de ceux-ci par des hépatocytes sains (260).

Les infections chronique par le virus HBV sont définies par la présence de l'antigène de surface HbsAg dans le sérum d'un individu pendant six mois ou plus (261). L'infection chronique prend place lorsque la réponse immunitaire n'est pas assez efficace pour éliminer le virus de l'organisme. La combinaison de la durée de vie prolongée des hépatocytes (6 à 12 mois) et d'une interaction stable entre le virus et la cellule hôte, assure la persistance de l'infection chez les individus dont la réponse immunitaire est inefficace. Ainsi, l'infection est presque toujours chronique chez les enfants de moins d'un an et les individus immunocompromis. Néanmoins, une infection chronique peut aussi survenir chez 5% des individus en santé contractant le HBV. Pour beaucoup de porteurs chroniques du HBV infectés à l'âge adulte, le pronostic est mauvais. En effet, 10 à 20 % décèderont d'un cancer du foie ou d'une cirrhose. Il y a actuellement deux agents thérapeutiques approuvés pour le traitement des infections chroniques : l'interféron alpha ($IFN-\alpha$) et la lamivudine (un analogue de la cytosine). $IFN-\alpha$ agit en supprimant directement la réplication du virus à l'intérieur des hépatocytes en induisant la dégradation des ARNm viraux(262), et indirectement en stimulant le système immunitaire et réduisant l'inflammation (263, 264). Néanmoins, beaucoup de patients ne répondent pas avec succès à l' $IFN-\alpha$. Pour ces patients, la lamivudine peut être un traitement efficace. La lamivudine supprime la réplication virale, mais certains patients vont développer une résistance après un an ou plus de thérapie (265-268).

Lorsque les thérapies s'avèrent inefficaces dans le traitement des infections chroniques, les patients atteints (5 à 10 %) peuvent développer la pathologie la plus sévère associée au HBV, le cancer du foie. Comme mentionné dans les paragraphes précédents, de nombreuses études démontrent un lien entre l'infection par HBV et le CHC (248, 249). Plus particulièrement, de nombreux laboratoires ont rapporté la présence d'ADN du HBV parmi l'ADN extrait de CHC ou de lignées dérivées de CHC (269-271). L'intégration de l'ADN viral dans le génome des hépatocytes ainsi que l'expression d'oncoprotéines virales contribueraient fortement au développement du CHC chez les patients infectés chroniquement.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le HBV n'infecte pas seulement le foie. En effet, comme pour le HCV, le HBV peut se répliquer dans divers tissus extrahépatiques dont les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (272-274). Plusieurs études ont montré une forte prévalence des infections au HBV, variant de 3% à 30%, chez des patients atteints de lymphome de type non-Hodgkin (275-278). Plus particulièrement, une étude suggère que les porteurs de HBV ont un risque augmenté de développer un lymphome de type non-Hodgkin par rapport aux individus non infectés par HBV (279). Ainsi, ces résultats suggèrent que le HBV pourrait jouer un rôle non seulement dans l'hépatocarcinogénèse mais aussi dans la lymphomagénèse.

Le développement d'un vaccin contre le HBV basé sur l'antigène de surface HbsAg, dans les années 1980 (280), a permis la réduction considérable de la fréquence d'infection par le HBV dans les régions du monde où le vaccin est accessible facilement à la population (Amérique du nord, Europe de l'ouest, Japon) (281-283). Néanmoins, la vaccination ne constitue pas un traitement pour les patients infectés chroniquement. De plus, le coût des programmes de vaccination freine l'accès aux vaccins dans les régions les plus touchées du monde.

3) Biologie

Le virus de l'hépatite B est le prototype de la famille de virus appelée *Hepadnaviridae*, dont ne fait pas partie le virus de l'hépatite C. À cause de la

similarité des séquences d'ADN (environ 70% d'homologie) et de l'organisation de leur génome, les virus appartenant à cette famille et infectant les mammifères sont regroupés dans le genre *orthohepadnavirus*. Le HBV étant un virus hépatotropique, les hépatocytes, principal type cellulaire du foie, sont le site principal d'infection et de réplication du virus. D'autres sites d'infection ont été identifiés dont certaines cellules du pancréas, des reins et du système lymphoïde, notamment les lymphocytes (284-290). Bien que les hépatocytes soient des cellules complètement différenciées, elles possèdent la capacité d'une prolifération extensive lorsque le foie est endommagé.

Le virus de l'Hépatite B est un virus enveloppé à ADN partiellement double brin et contenant un génome d'environ 3200 paires de bases. Les particules virales, ou virions, mesurent 42 nm de diamètres (particules de Dane). Une caractéristique particulière de l'infection par le HBV est la production en très grande quantité de particules subvirales de 22 nm contenant l'antigène de surface HbsAg (figure 12) (291). Le cycle du virus HBV est caractérisé par la synthèse d'ADN circulaire relâché (rcDNA) partiellement double brin par transcription inverse d'un ARN intermédiaire, le pré-génome (figure 13) (291, 292). Une autre caractéristique du cycle de réplication du HBV est la formation d'ADN circulaire et clos de façon covalente (cccDNA) à partir du rcDNA, ou de molécules d'ADN super-enroulé sous la forme d'un mini-chromosome viral (293, 294), qui agit comme patron principal pour la transcription (figure 13). Le mécanisme de réparation d'ADN impliqué dans la conversion du rcDNA en cccDNA est encore inconnu. L'ARN polymérase II de la cellule hôte va générer plusieurs copies d'ARN, incluant l'ARN pré-génomique qui sera alors transcrit de façon inverse et répliqué dans les capsides virales immatures afin de produire une molécule d'ADN double-brin circulaire relâchée contenant une brèche simple brin (rcDNA) (292). Les particules ainsi formées vont alors être enveloppées au niveau du réticulum endoplasmique et exportées à l'extérieur de la cellule (295).

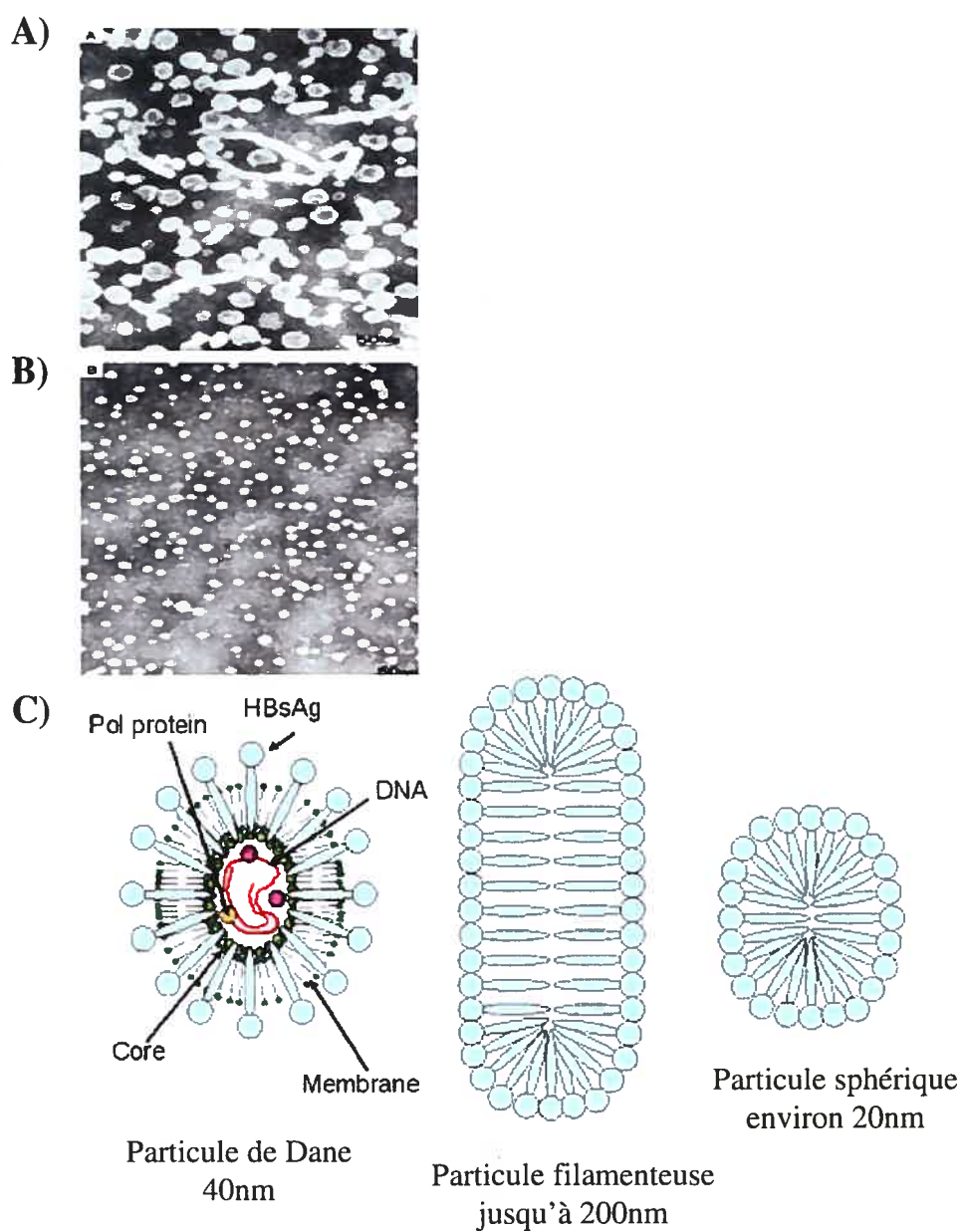


Figure 12. Structure des particules virales du virus de l'hépatite B.

A) virions HBV (particules de Dane, B) particules subvirales de 22 nm contenant HbsAg. (Ganem et al. (2004) N Engl J Med.), C) représentation schématique des particules virales

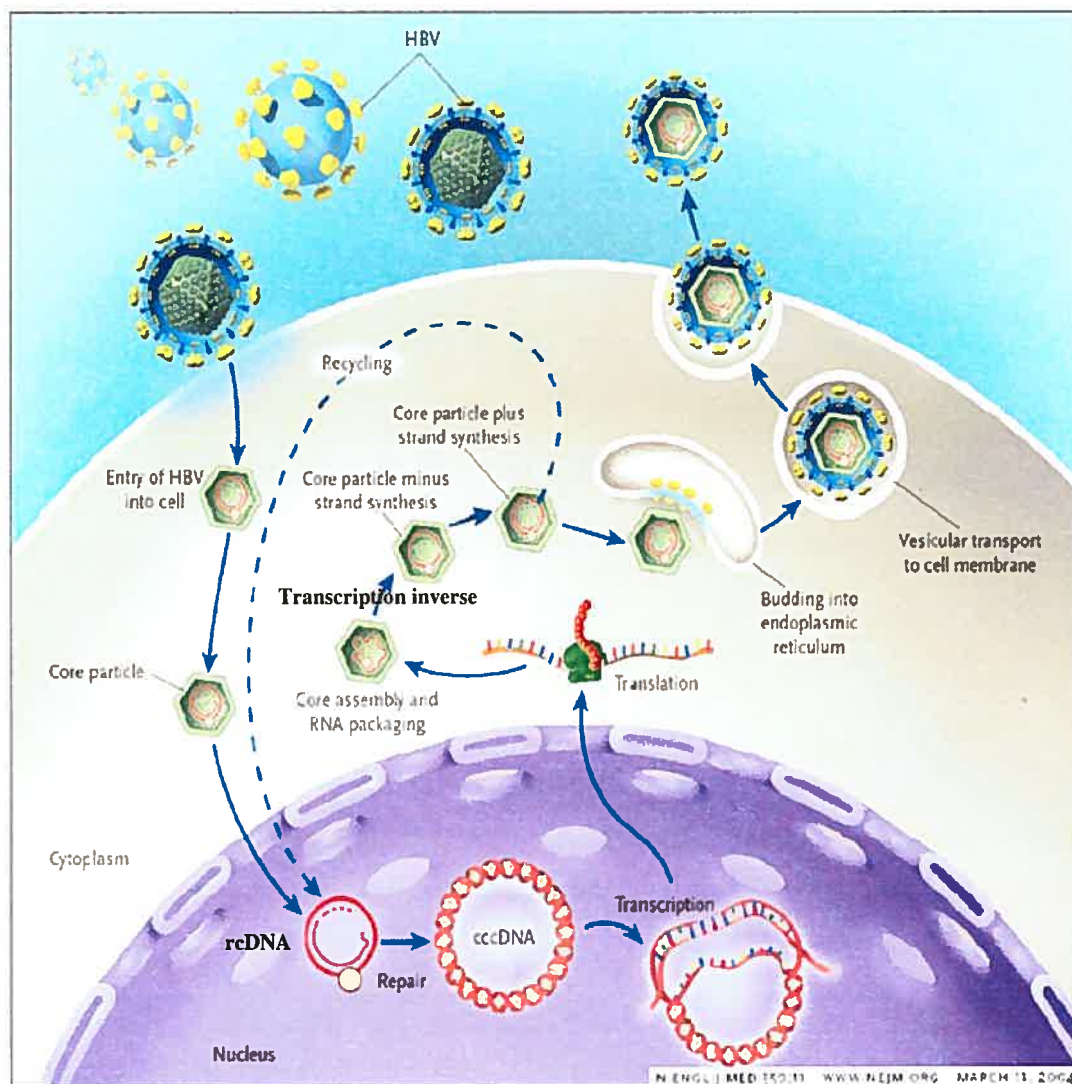


Figure 13. Cycle de vie du virus de l'hépatite B.

Adapté de Ganem et al. (2004) N Engl J Med.

4) Génome et protéines du HBV

Le génome du HBV a seulement quatre cadres de lecture ouverts (ORFs) (figure 14). La région préS-S (présurface-surface) code pour les trois antigènes de surface du virus, par initiation de la traduction différentielle à chacun des trois codons d'initiation (296, 297). La protéine la plus abondante est la protéine S de 24 kD, ou HBsAg. Les deux autres antigènes de surface produits sont les protéines M (ou préS2) et L (ou préS1). La fonction de la protéine M est encore inconnue tandis que la protéine L jouerait un rôle dans la liaison du virus aux récepteurs de la cellule hôte (298), ainsi que dans l'assemblage du virion et son relargage de la cellule (299).

La région préC-C (précore-core) code pour l'antigène core (HBcAg) et pour l'antigène e (HBeAg), aussi dérivés d'initiation alternative de la traduction (296). Le premier codon AUG code pour la protéine C de 21 kD, la protéine structurale de la capsid virale, alors que le deuxième codon va permettre la production de la protéine préC de 24 kD permettant la production d'une séquence signal dirigeant la protéine vers la voie sécrétoire. Lorsque la protéine traverse l'appareil de Golgi, celle-ci sera clivée par des protéases cellulaires pour générer HBeAg, dont la fonction est encore mystérieuse qui sera secrété dans le sang (300).

La région codante P est spécifique à l'ADN polymérase virale, enzyme multifonctionnelle impliquée dans la synthèse d'ADN et dans l'encapsidation de l'ARN (301, 302). D'autre part, le cadre de lecture ouvert X code pour la protéine virale HBx, qui module la transduction de signaux intracellulaires et peut affecter directement et indirectement l'expression de gènes viraux et cellulaires (voir paragraphe VI). De plus, l'activité de la protéine X est nécessaire à la réplication et la dispersion des particules virales (303).

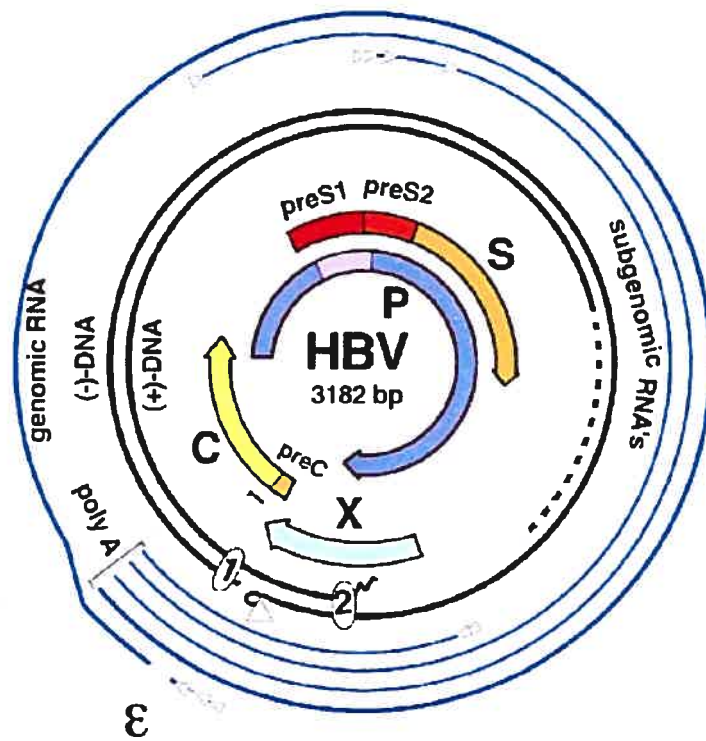


Figure 14. Organisation génomique du virus de l'hépatite B.

D'après C. Kuhn and H. Schaller.

VI) La protéine X du virus de l'hépatite B

1) Structure et localisation

La protéine non structurale X du virus de l'hépatite B, ou HBx, est composée de 154 acides aminés constituant une protéine de 16,5 kD, dont la structure et la fonction semblent bien conservées chez les hepadnaviruses infectant les mammifères (304). HBx possède neuf résidus cystéine dont huit forment des liens disulfures (305), et la région minimale pour l'activité de transactivation de HBx se situe dans la portion d'acides aminés 58 à 140 (306). Par ailleurs, la portion amino-terminale (acides aminés 1 à 20) aurait une fonction transrépressive (307). De plus, la protéine HBx peut subir des modifications post-traductionnelles telles que la *O*-glycosylation (308) ou la phosphorylation de divers résidus sérine (309). Chez les humains, la localisation intracellulaire de HBx est à la fois cytoplasmique et nucléaire (310, 311), même si HBx ne possède pas de signal de localisation nucléaire connu. Néanmoins, la localisation de la protéine HBx semblerait dépendre du niveau d'expression de celle-ci. En effet, HBx serait localisée majoritairement au niveau nucléaire lorsque faiblement exprimée, alors qu'une plus forte expression corrèlerait avec une accumulation de HBx dans le cytoplasme de la cellule infectée, notamment au niveau des mitochondries (312, 313). De plus, HBx serait capable de former des agrégats intracellulaires (312, 314) et entraînerait une distribution anormale des mitochondries dans la cellule (315). Par ailleurs, il est important de noter que chez les patients infectés chroniquement par HBV, les niveaux de HBx sont relativement faibles (316), même si HBx constitue le marqueur le plus fréquent chez les patients infectés par HBV et atteints de CHC (317) et est exprimée à tous les stades de l'infection virale. D'autre part, une étude récente suggère que les niveaux de HBx intracellulaires seraient modulés par les espèces oxygénées réactives (ROS) (318).

2) Fonctions

a) Rôle de HBx dans la réplication virale

HBx est une petite protéine régulatrice requise pour l'établissement de l'infection virale et peut activer une variété de promoteurs et d'enhancers (319-321). L'activité transcriptionnelle de HBx serait médiée par des interactions protéine-protéine puisque HBx ne lie pas l'ADN double brin et qu'aucune séquence consensus n'a été identifiée au niveau des gènes transactivés par HBx (316). L'une des premières fonctions de HBx identifiée est son rôle essentiel dans la réplication et la dispersion du HBV dans l'organisme. En effet, la délétion de HBx (mutation null) entraîne une impossibilité du virus à se répliquer et à se disperser dans le foie des animaux infectés (303). Néanmoins, le rôle précis de HBx dans le cycle de vie du HBV ainsi que les voies intracellulaires impliquant HBx dans la réplication virale restent encore à déterminer. D'autres part de nombreuses études ont permis d'identifier de multiples fonctions à la protéine HBx dans le but de mieux comprendre l'implication de HBx dans la carcinogénèse hépatique.

b) Rôle de HBx dans la carcinogénèse hépatique

L'une des évidences majeures suggérant que la protéine HBx jouerait un rôle primordial dans la carcinogénèse hépatique, réside dans le fait que HBx est capable de transformer des cellules en culture et d'induire des CHC ainsi que d'autres types de tumeurs dans des souris transgéniques (237, 238, 322-325). Par ailleurs, l'ADN chromosomique de tumeurs associées au HBV, possèdent des séquences de HBx dont la fonction transactivatrice est encore présente, suggérant l'importance de la transactivation médiée par HBx dans la carcinogénèse. En outre, HBx lierait l'ADN endommagé par les rayons UV (326). D'autre part, plusieurs études ont montré que HBx augmenterait la fréquence de mutations de souris transgéniques exposées à l'aflatoxin B1 ainsi qu'à d'autres carcinogènes, sans affecter leur fréquence de mutations spontanées (327-330). De plus, HBx interagit avec le suppresseur de tumeurs p53 et inhibe ses fonctions ainsi que sa transcription dans les cellules hépatiques (105, 106, 331). Néanmoins, le fait que HBx lie et inhibe p53 ne constitue pas l'unique indice d'un rôle majeur de HBx dans la carcinogénèse. En effet, HBx

interagit avec de nombreuses autres protéines intervenant dans plusieurs voies de signalisation cellulaires cruciales.

i) Rôle de HBx dans la voie NF- κ B

Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires par lesquels HBx contribuerait à la carcinogénèse, de nombreuses études ont montré une interaction de HBx avec plusieurs voies de signalisation cellulaires. Parmi celles-ci, la voie de signalisation impliquant le facteur de transcription NF- κ B est une cible majeure de HBx, ainsi que de multiples autres protéines virales dont la protéine core du virus HCV (332, 333). La voie de signalisation NF- κ B est impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation cellulaire incluant la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'oncogénèse (334-336). Plus particulièrement, la voie de signalisation NF- κ B serait activée constitutivement dans certains CHC, notamment ceux impliquant HBV (337). NF- κ B forme un complexe cytoplasmique latent avec le facteur I κ B en l'absence de stimulus. En réponse à divers stimuli, tels que des pathogènes viraux ou bactériens, des cytokines ou des facteurs de stress, le facteur I κ B est phosphorylé par le complexe kinase IKK, entraînant ainsi sa dégradation par la voie ubiquitine/protéasome (figure 15). Le facteur de transcription NF- κ B est alors libre d'être transloqué au noyau et de stimuler la transcription de plus d'une centaine de gènes cibles contenant une séquence consensus. NF- κ B est un homo- ou hétérodimère de cinq protéines reliées structurellement dont les protéines RelA (ou p65) et p50. HBx agirait sur la voie de signalisation impliquant NF- κ B en inhibant le facteur I κ B ainsi que l'inhibiteur de NF- κ B, p105 (338) (figure 15), et cette activation de NF- κ B serait amplifiée en présence d'éthanol (339). Plus précisément, une étude a démontré que la protéine HBx interagissait directement avec la seconde répétition ankyrine de I κ B (340). Par ailleurs, un groupe a récemment montré que l'activation de NF- κ B par HBx pouvait être inhibée par l'interféron alpha (IFN- α) mais pas par l'IFN- γ dans des cellules hépatiques (341). D'autre part, Waris *et al.* ont observé que les protéines HBx associées aux mitochondries activaient NF- κ B ainsi que le facteur de transcription

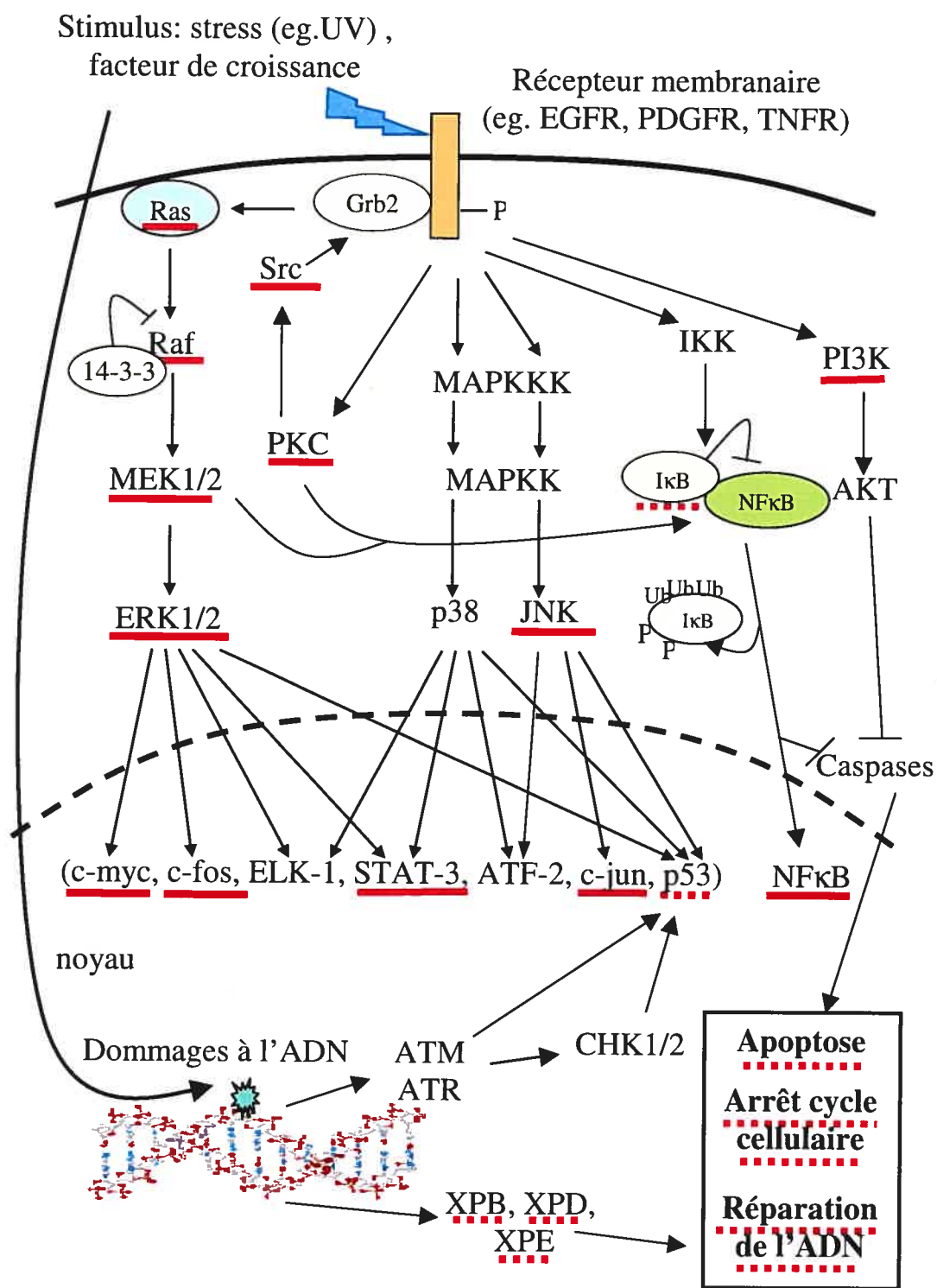


Figure 15. Voies de signalisation intracellulaires affectées par la protéine HBx.

Les protéines soulignées par un trait plein rouge sont activées par HBx alors que les protéines soulignées par un trait rouge pointillé sont inhibées ou interagissent avec HBx.

STAT-3 via la production de ROS (342). L'activation de NF- κ B par HBx a été montrée responsable de la transactivation du gène de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), résultant en la production de grandes quantités d'oxyde nitrique (NO) pouvant entraîner des effets cytotoxiques et carcinogènes (343). Ainsi, ces études sembleraient démontrer un rôle important de l'activation de la voie impliquant NF- κ B par HBx, dans la carcinogénèse hépatique.

ii) Rôle de HBx dans les voies MAPKs

Outre la voie impliquant NF- κ B, de nombreuses études suggèrent une interaction de HBx avec les voies de signalisation impliquant les MAPKs. Plusieurs études ont montré l'implication de ces voies dans la transformation cellulaire et la carcinogénèse, notamment dans les CHC (344-348). La voie de signalisation Raf/MEK/ERK est le prototype des voies MAPK (figure 15). Celle-ci est initiée par la transmission de signaux de facteurs de croissance *via* l'activation de la protéine G associée à la membrane, Ras.

L'action de HBx sur les voies MAPK se situerait à plusieurs niveaux. En effet, HBx semblerait activer Ras, résultant en l'activation de la voie MAPK/ERK (349) dans les cellules quiescentes, les forçant à entrer en phase S du cycle cellulaire (350). D'autre part, HBx induit la phosphorylation de c-Jun au niveau de la ser63 et l'activation de AP-1 (c-Jun/c-Fos) indépendamment de ERK (351). Il est aussi intéressant de mentionner une étude suggérant que HBx augmenterait les niveaux du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), ce qui pourrait entraîner une stimulation de la cascade EGFR/Raf/MEK/ERK (352). De même, HBx activerait le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α), membre de la famille des ligands de EGFR, dont la surexpression est associée à certains cancers humains dont les CHCs (353). Par ailleurs, HBx stimulerait la protéine kinase C (PKC) menant à l'activation de ERK puis à la transcription de gène du facteur de croissance insuline-like (IGF-II) dans les cellules hépatiques (354, 355). De plus, HBx agirait aussi sur SAPK/JNK en la stimulant, permettant l'activation de AP-1 (356, 357). Une étude a démontré que la région de HBx impliquée dans l'activation des MAPKs est comprise entre les

résidus 58 et 119 de la protéine (358). La protéine HBx utiliserait donc de multiples stratégies pour perturber les voies de signalisation intracellulaire impliquant les MAPKs, et entraîner des réponses cellulaires variées.

iii) Rôle de HBx dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose

Comme mentionné dans les paragraphes précédent, HBx interagit avec p53. Étant donné le rôle majeur de p53 dans les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire et d'apoptose, on peut très bien comprendre que la liaison de HBx avec p53 affecte ces mécanismes. En effet, des études ont montré que la modulation de l'apoptose et de la régulation du cycle cellulaire par HBx serait en partie dépendante de la protéine p53 (359-361). Néanmoins, HBx aurait aussi la capacité d'interagir avec ces mécanismes indépendamment de p53 (361, 362). En effet, HBx inhiberait la transcription de p21 et ce, indépendamment de p53 (363). De plus, le rôle précis de HBx sur l'apoptose reste incertain puisque certaines études suggèrent que HBx inhiberait l'apoptose alors que d'autres semblent montrer un effet proapoptotique (360, 364, 365). Il semblerait néanmoins que HBx aurait plutôt un effet antiapoptotique puisque des études sur des cellules humaines et de souris ont montré que cette oncoprotéine inhibe l'apoptose médiée par FAS ainsi que la relâche du cytochrome C de la mitochondrie, de même que la caspase 3 (357, 366). D'autre part, HBx stimulerait les voies de survie SAPK/JNK et PI3K (357, 367). Par ailleurs, l'augmentation d'expression de la cycline D ainsi que du complexe cycline A/CDK2 par HBx, déreglerait les points de contrôles du cycle cellulaire et stimulerait la prolifération cellulaire (325, 350, 368). Néanmoins, il est important de mentionner que toutes ces études ont été effectuées en l'absence de dommage à l'ADN, et que l'effet de HBx sur ces voies suite à des dommages à l'ADN reste donc encore à déterminer.

iv) Rôle de HBx dans la réparation des dommages à l'ADN.

Plusieurs groupes ont étudié l'expression de HBx dans des souris transgéniques. Ces études ont permis de montrer que HBx n'entraîne pas une augmentation significative des mutations spontanées, mais par contre augmenterait la fréquence de mutation des souris exposées à AFB1 ou à la diethylnitrosamine (327-329). Ainsi, la présence de dommages à l'ADN serait un facteur primordial dans la carcinogénèse induite par HBx.

En plus d'agir au niveau de certains facteurs de transcription dont p53, HBx influence directement la transcription de gènes cellulaires et viraux en interagissant avec la machinerie de transcription basale. En effet, des études ont montré que HBx interagit avec TFIIF et TFIIB (369-371). Plus particulièrement, HBx interagit avec les hélicases XPB et XPD du complexe TFIIF qui jouent un rôle important dans la transcription, mais aussi dans la réparation de l'ADN (voir paragraphe II 1)). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que HBx interfère avec la voie de réparation NER suite à une irradiation aux UVC, voie aussi influencée par la protéine p53 (226, 227). Ainsi, le rôle de HBx dans la voie NER pourrait être dépendant ou indépendant de p53 (372). Néanmoins, les études concernant l'effet de HBx sur la NER ont suggéré un impact important de l'oncoprotéine sur la voie GNER mais aucune étude n'avait démontré un rôle de HBx sur la voie TCNER. L'article II tente d'élucider ce point fondamental dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la carcinogénèse induite par le HBV.

VII) Objectifs de la thèse

Comme il a été mentionné dans l'introduction, le suppresseur de tumeurs p53 joue un rôle primordial dans les divers mécanismes intracellulaires impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome suite à des dommages au niveau de l'ADN. Ces mécanismes comprennent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Or, le gène codant pour la protéine p53 est muté dans la majorité des cancers chez l'humain, entraînant ainsi une perturbation de cet équilibre fondamental. Le rôle de p53 dans les mécanismes de réparation par excision de nucléotides suscite de nombreuses interrogations ces dernières années, notamment au niveau de la voie TCNER. En effet des études contradictoires ont été publiées identifiant ou non la protéine p53 comme nécessaire à l'efficacité de la voie TCNER. Ces études divergent principalement au niveau de la longueur d'ondes du rayonnement UV employé lors de l'irradiation des cellules, soit des UVC 254nm ou des UVB polychromatiques. Le premier objectif de cette thèse est de réconcilier ces études divergentes en démontrant que le rôle de p53 dans la voie TCNER est dépendant de la longueur d'ondes d'UV employée. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons employé des lignées isogéniques lymphoblastiques déficientes ou non en p53, irradiées avec des UVC 254nm ou des UVB polychromatiques à des doses générant une quantité similaire de CPDs. La technique de LMPCR (voir figure 30 en annexe) nous permet de mesurer la cinétique de réparation sur le brin transcrit (étude de la voie TCNER) ou non transcrit (voie GNER) d'un gène endogène.

L'objectif de la deuxième étude était d'identifier le rôle encore inconnu de la protéine HBx du virus de l'hépatite B sur la voie TCNER en utilisant les mêmes outils (lignées cellulaires et conditions d'irradiation) que ceux utilisés dans la première étude. De plus, nous avons voulu étudier l'effet de l'expression de HBx sur la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN au niveau des mécanismes d'apoptose et de survie clonogénique. Par ailleurs, nous avons tenté de déterminer si les effets de la protéine HBx sur ces mécanismes étaient dépendants ou non de la protéine p53 puisque HBx lie cette dernière.

CHAPITRE II
ARTICLE I

UV Wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells

Géraldine Mathonnet^{*†}, Caroline Léger^{*†}, Julie Desnoyers^{*}, Régen Drouin^{**}, Jean-Philippe Therrien^{*}, and Elliot A. Drobetsky^{*}

* Faculty of Medicine, University of Montreal, and Guy-Bernier Research Center, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada

** Faculty of Medicine, Laval University, and Research Center, Hôpital St. François d'Assise, Québec, Québec, Canada.

† These authors contributed equally to this work.

Contribution: Cet article est publié dans la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 Jun 10;100(12):7219-24.

J'ai contribué de façon majeure aux travaux de recherche (expériences d'étude de la réparation de l'ADN par LMPCR) ainsi qu'à l'analyse et l'interprétation des résultats de cette publication. De plus, j'ai participé à l'écriture de l'article ainsi qu'aux corrections nécessaires à la publication. Les auteures Caroline Léger et Julie Desnoyers ont aussi grandement participé à cette publication.

copyright ©1993-2004 by The National Academy of Sciences of the United States of America, all rights reserved.

Abstract

Nucleotide excision repair (NER) prevents skin cancer by eliminating highly-genotoxic cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) induced in DNA by the UVB component of sunlight. NER consists of two distinct but overlapping subpathways, *i.e.*, global NER (GNER) which removes CPD from the genome overall, and transcription-coupled NER (TCNER) which removes CPD uniquely from the transcribed strand of active genes. Previous investigations have clearly established that the p53 tumour suppressor plays a crucial role in the NER process. Here we employed the ligation-mediated PCR technique to demonstrate, at nucleotide resolution along two chromosomal genes in human cells, that the requirement for functional p53 in TCNER, but not in GNER, is dependent upon incident UV wavelength. Indeed, relative to an isogenic p53-wild type counterpart, p53-deficient human lymphoblastoid strains were shown to remove CPD significantly less efficiently along both the transcribed- and nontranscribed-strands of the *c-jun* and *hprt* loci following exposure to polychromatic UVB (290-320-nm). However in contrast, after irradiation with 254-nm UV, p53-deficiency engendered less efficient CPD repair only along the nontranscribed strands of these target genes. The revelation of this novel wavelength-dependent phenomenon reconciles an apparent conflict between previous studies which employed either UVB or 254-nm UV to claim, respectively, that p53 is required for, or plays no role whatsoever in, TCNER of CPD. Furthermore, our finding highlights a major caveat in experimental photobiology by providing a prominent example where the extensively-used “nonsolar” model mutagen 254-nm UV does not accurately replicate the effects of environmentally-relevant UVB.

I) Introduction

Nucleotide excision repair (NER) forestalls the accumulation of genetic mutations, thus guarding against neoplastic transformation, by eliminating helix-distorting “bulky” DNA adducts induced by diverse environmental carcinogens. Such adducts include highly-genotoxic (replication- and transcription-blocking) cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), which form through covalent linkage of adjacent pyrimidine bases subsequent to direct absorption of UV photons by DNA. Misreplication of CPDs induced by the UVB component of natural sunlight is the primary cause of mutations which are prerequisite to the development of skin cancer, the most frequent neoplasia in Caucasian populations (20, 373). Individuals afflicted with the rare autosomal recessive disorder *Xeroderma pigmentosum* (XP) carry mutations in any of seven different NER genes (designated XP-A through -G), and are therefore defective in CPD repair (374). As a consequence, XP patients exhibit extreme photosensitivity and UV hypermutability, coupled with a striking predisposition to both melanoma and nonmelanoma tumors (375).

NER is comprised of two distinct subpathways which manifest strong mechanistic overlap, *i.e.*, differing only in the lesion-recognition step (see ref. 5 for a comprehensive review of the NER pathway). Global NER (GNER) removes CPD from virtually anywhere in the genome, and is initiated when the XP complementation group-E gene product (XP-E), in conjunction with the XPC-hHR23B protein complex, recognize and bind the helical distortion introduced into DNA by CPDs or other bulky lesions. This initial event is followed by recruitment to the damaged site of the core NER pathway, which faithfully restores the integrity of the DNA through sequential steps of (i) strand separation mediated by the XP-B and XP-D helicases; (ii) incision on either side of the lesion *via* the structure-specific endonuclease activities of XP-G and XP-F/ERCC1, (iii) excision of the damaged base as part of a single-stranded oligonucleotide approximately 30 bp in length; (iv) DNA resynthesis (gap-filling) and ligation, using normal DNA replication factors and the intact complementary strand as template.

In contrast to the situation for GNER, the transcription-coupled NER (TCNER) subpathway removes only those lesions occurring along the transcribed strands of active genes, and is triggered when RNA polymerase II becomes stalled at positions where transcription-blocking CPDs occur (376). The CS-B and CS-A proteins then converge at the damaged sites, followed by removal or retraction of the polymerase. This facilitates completion of the repair process by the core NER pathway, as described immediately above for GNER. Deficiency in either CS-B or CS-A causes Cockayne's syndrome (CS) which, unlike XP, is characterized by defective TCNER but normal GNER, developmental abnormalities, and no predisposition to cutaneous tumors (78, 377).

The p53 tumor suppressor protein plays a critical role in the inhibition of multistage photocarcinogenesis in part by transactivating proapoptotic genes that stimulate the elimination of UV-damaged precancerous "sunburn" cells (19, 378). Moreover, p53 would be expected to inhibit skin cancer development in view of its demonstrated essential participation in NER. Indeed, a well-characterized Southern blot-based assay that measures DNA strand-specific repair at the level of the gene was employed to show that genetically-*p53*-deficient skin fibroblasts derived from Li-Fraumeni syndrome patients, or skin fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 (HPV-E6) oncoprotein that functionally inactivates p53 by accelerating its proteasomal degradation, are each defective in GNER (167, 169), (379). This defect was manifested by the inability of these p53-deficient strains to efficiently remove CPD from the nontranscribed strand (NTS) of the transcriptionally-active *dihydrofolate reductase* and *p53* genes following irradiation with the model mutagen 254-nm UV. At the same time, these latter investigations demonstrated that functional p53 was not required for TCNER, since p53-deficient skin fibroblasts were fully proficient in the removal of 254-nm UV-induced CPD from the transcribed strand (TS) of either *dihydrofolate reductase* or *p53*. Equivalent results on NER of UV-induced CPD were subsequently obtained for mammalian strains carrying homozygous null p53 mutations, including human colorectal carcinoma cells (380) and murine embryonic fibroblasts (381). In addition, it was demonstrated that human skin fibroblasts lacking functional p53 are defective only in

GNER, and not TCNER, of bulky DNA adducts induced by the environmental carcinogen benzo(a)pyrene diolepoxide (382). In providing some potential mechanistic explanation for the above findings, it was reported using 254-nm UV-exposed human cells that upregulation of the XP-C and XP-E proteins (which are required for lesion recognition during GNER only) is dependent on the presence of functional p53 (383, 384).

Notwithstanding the above investigations on 254-nm UV-exposed cells which convincingly demonstrated an essential role for p53 in GNER but not in TCNER, we originally postulated that p53 might actually regulate both NER subpathways. Indeed, p53 had been shown to interact with the XP-B and XP-D helicases which are required for strand separation during GNER and TCNER, as well as with the CS-B protein that participates in lesion recognition during TCNER only (117). In addition, after exposure to genotoxic agents, p53 transactivates a gene encoding the ribonucleotide reductase subunit p53R2 (385) which is essential for the DNA resynthesis step common to both NER subpathways. Finally, cells lacking functional p53 are deficient in the recovery of mRNA synthesis after UV treatment, indicating the relative inability of such cells to efficiently clear transcription-blocking CPD from the TS of active genes (386). With the above rationale in mind, we initially employed the ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) technique to demonstrate at nucleotide resolution that p53-deficient human fibroblasts, either derived from Li-Fraumeni patients or expressing HPV-E6, exhibit a substantial deficiency in both GNER and TCNER as measured at the endogenous *c-jun* and *p53* loci following treatment with polychromatic UVB (290-320-nm) (387). We reasoned that the apparent discrepancy between these latter data showing p53 dependence for TCNER in human skin fibroblasts, and those cited in the preceding paragraph which seemingly demonstrated the opposite, might be explained by the circumstance that in each case cells were irradiated with different UV sources, *i.e.* emitting, respectively, either environmentally-relevant polychromatic UVB, or monochromatic 254-nm (“germicidal”) UV which is virtually absent from terrestrial sunlight. Although important similarities have been documented regarding the types of premutagenic DNA photoproducts and concomitant genotoxic stress responses

elicited by 254-nm UV *vs.* UVB (388), these wavelengths manifest differential capacities to alter the cellular redox state and, as a consequence, to influence patterns of gene activation (see Discussion). In order to evaluate the intriguing possibility that p53 might regulate NER in a wavelength-dependent manner, we employed well-characterized isogenic human lymphoblastoid strains differing only in p53 status to study the kinetics of strand-specific CPD removal along two chromosomal genes, *i.e.*, *c-jun* and *hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt)*, following treatment with either 254-nm or UVB.

II) Materials and methods

Cell Strains

The p53 *+/+* human lymphoblastoid strain TK6, and its functionally p53-deficient counterpart TK6-5E (constitutively expressing the HPV-E6 oncoprotein derived from the high-risk HPV16 subtype), were kindly provided by Dr. J.B. Little (Harvard School of Public Health). NH32, a homozygous p53-knockout derivative of TK6, was a generous gift of Dr. H.L. Liber (Massachusetts General Hospital). All three strains were routinely maintained in suspension culture in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) supplemented with 10% inactivated horse serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin.

UV irradiations

Approximately 5×10^6 exponentially-growing lymphoblastoid cells were washed once with PBS (containing Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺), resuspended in 10 ml PBS, and added directly to 100-mm petri dishes. Replicate cultures were then irradiated with acute doses of either polychromatic UVB (290-320-nm) or monochromatic 254-nm UV at room temperature. The UVB source consisted of two fluorescent tubes (F15T8 UVB lamp; UV Products, Upland, CA) generating a dose rate of 6.5 J/m²/s. The incident UVB was filtered using a sheet of cellulose acetate (Kodacel TA-407 0.015 inch; Eastman Kodak Co.) in order to virtually eliminate contaminating wavelengths below 290-nm. In the case of 254-nm UV, cells were irradiated with a G25T8

germicidal lamp (Sankyo Denki, Japan) at a dose rate of $0.2 \text{ J/m}^2/\text{s}$. UVB and 254-nm UV fluences were measured with a Spectroline DRC 100x digital radiometer equipped with DIX 300 and DIX 254 sensors, respectively. It should be noted that the UVB lamp emitted some measurable incident energy within the UVA range (320-400 nm) which could not be eliminated. While we cannot categorically rule out that this UVA component exerted some effect, the total UVA output under our exposure conditions, *i.e.*, approximately 50 J/m^2 , was unlikely to elicit any significant biological response given that UVA is approximately 50,000-fold less genotoxic than UVB on a per joule basis.

Enzymatic CPD cleavage and ligation-mediated polymerase chain reaction

LMPCR is a genomic sequencing method that allows quantification, at nucleotide resolution along chromosomal genes, of any DNA adduct that can be revealed either chemically or enzymatically as a ligatable strand break. The basic LMPCR protocol employed here to investigate CPD repair rates along the TS and NTS of either *c-jun* or *hprt* has been described in detail (389, 390). Briefly, replicate cultures were irradiated with either 20 J/m^2 254-nm UV or 450 J/m^2 UVB, and incubated for varying times (0-24 h) to allow repair. Genomic DNA was then purified and digested firstly with T4 endonuclease V which efficiently induces single-strand breaks immediately adjacent to CPD sites with high specificity, and secondly with *Escherichia coli* photolyase in order to convert these breaks to ligatable 5' termini. As described previously (391), aliquots of this enzyme-digested DNA were run on denaturing agarose gels to show that 20 J/m^2 of 254-nm UV and 450 J/m^2 of UVB induced initial global CPD frequencies of 1.6 and 2.4 CPD/10kb, respectively (data not shown). Following denaturation of the DNA, a gene-specific oligonucleotide was annealed downstream of the region to be analyzed, and a set of genomic cleavage products (*i.e.*, terminating precisely at sites where T4 endonuclease V incised the DNA adjacent to CPDs) was generated *via* primer extension with cloned *Pfu* polymerase. An asymmetric double-stranded oligonucleotide linker was ligated to the phosphate groups at the fragment termini, thus providing a common sequence on the 5' end of all fragments. An

oligonucleotide primer complementary to this linker, in conjunction with another gene-specific primer, were then used in a PCR reaction to amplify the gene-specific cleavage products of interest. These products were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels alongside a Maxam and Gilbert sequencing ladder, transferred to nylon membranes, hybridized to a ^{32}P -labelled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. All bands corresponding to dipyrimidine sites, and yielding a measurable signal above background, were quantified using a Bio-Rad GS-525 phosphorimager (Bio-Rad Canada Ltd.). Variations in DNA sample loading were carefully controlled for by quantitatively assessing the relative intensities of non-specific signals between lanes. The LMPCR primer sets used for quantification of NER rates at the *c-jun* locus have been described (392, 393), while those used at the *hprt* locus have not been previously published and are listed in Table 1.

III) Results and discussion

Despite the general accord that functional p53 is essential for efficient GNER of UV-induced CPD, apparently divergent claims initially emerged that this tumor suppressor is either also required for TCNER (169), or plays no role whatsoever in this process (387). Although essentially the same p53-proficient-*vs.* -deficient human skin fibroblast strains were compared in these two sets of studies, there were some potentially significant differences in experimental design. For example in each case a distinct strand-specific repair assay was employed, *i.e.*, LMPCR, a PCR-based genomic sequencing method that has been adapted to measure repair of DNA adducts at nucleotide resolution (394), *vs.* an extremely well-characterized Southern blot-based assay that measures repair at the level of the gene (60). We reasoned that this methodological difference is unlikely to account for the observed contrariety in experimental outcome since each of the aforementioned assays has been rigorously validated as a means to evaluate NER rates along the TS and NTS of active genes in living cells. For example using LMPCR we previously reproduced the expected result, initially obtained *via* the Southern blot-based method (377), that CS-B cells

are deficient in TCNER but not GNER of UV-induced CPD (395). Finally, we note that each of the above-mentioned assays quantifies precisely the same event, *i.e.*, the lesion recognition/incision step of NER as manifested by the disappearance of T4 endonuclease V-sensitive sites.

A more likely and indeed intriguing explanation to account for the perceived discrepancy regarding the role of p53 in strand-specific NER concerned the use of different CPD-inducing wavelengths, *i.e.*, either 254-nm UV or polychromatic UVB in the case of studies showing no role or an important role, respectively, for p53 in TCNER. To investigate this possibility, we employed the p53^{+/+} human lymphoblastoid strain TK6 and two isogenic p53-deficient derivatives, *i.e.*, NH32, carrying a homozygous knockout of *p53*; and TK6-5E, which constitutively expresses the HPV-E6 oncoprotein that functionally inactivates p53. The p53 status and phenotype of these lymphoblastoid strains have been verified in our laboratory (396), and by others (397, 398). Specifically, in response to DNA damaging agents, it was shown that NH32 and TK6-5E manifest clear defects in hallmark p53-regulated functions including cell cycle arrest, apoptosis, and induction of the p53 downstream effector p21^{waf1}.

Following treatment of TK6, TK6-5E, and NH32 with polychromatic UVB, or TK6 and NH32 with 254-nm UV, we employed LMPCR to compare the rate of CPD removal in each strain at nucleotide resolution along the TS and NTS of the autosomal *c-jun* protooncogene, a locus routinely utilized for LMPCR studies. However, *c-jun* is known to be transcriptionally-upregulated in a variety of cell types at early times following UV exposure (32), thereby introducing a potential bias when this particular gene target is used for investigations on transcription-coupled repair of UV-induced DNA damage. In addition, it must be taken into account that NER rates may predictably be modulated in a locus-specific manner, possibly due to variations in local chromatin structure. We therefore also developed and applied the LMPCR technique to investigate the kinetics of strand-specific CPD repair along the X-linked *hprt* locus, *i.e.*, a nonessential housekeeping gene which to our knowledge is not regulated by DNA damage.

Figure 16 shows a sample LMPCR autoradiogram reflecting CPD repair rates at individual nucleotide positions along a portion of the TS of the *hprt* gene in NH32, TK6-5E, and TK6 following irradiation with 450J/m² of UVB. (Autoradiograms depicting repair along other regions of the TS or NTS of either *c-jun* or *hprt* in UVB-exposed cells are not shown.) The arrows on the right side of this representative figure indicate dipyrimidine sites manifesting a clear signal above background, *i.e.*, which could be precisely quantified by phosphorimager analysis. For any given site, the percentage of CPD remaining at various times post-irradiation was calculated by comparing the intensities of bands produced at these times to that of the corresponding band at time zero (*i.e.*, no opportunity for repair, 100% of CPD remaining). Graphical compilations of all repair rate determinations along the TS and NTS of both *hprt* and *c-jun* for each UVB-exposed lymphoblastoid strain are presented in figure 17. At least two different regions along each strand of each gene were independently evaluated on separate autoradiograms, and 10-20 dipyrimidine sites were quantified per region to arrive at a total of 25-40 sites analyzed/strand/gene. Each data point on the graphs represents a mean value calculated for these 25-40 sites. The results clearly show that following irradiation with polychromatic UVB, human lymphoblastoid cells wherein p53 is genetically or functionally inactivated are significantly less proficient relative to an isogenic wild-type counterpart in the removal of CPD from the TS of either *c-jun* or *hprt* (Figures 17A and 17B, respectively), as well as from the NTS of these target genes (Figures 17C and 17D). This provides critical confirmation for our previous finding that p53 regulates TCNER (in addition to GNER) at the *c-jun* and *p53* loci in human skin fibroblasts (22).

Sample LMPCR autoradiograms are shown in figures 18 and 19 which depict CPD repair rates along portions of the NTS and TS, respectively, of the *hprt* gene in TK6 *vs.* NH32 following treatment with 20J/m² of 254-nm UV. In essentially the identical manner as for the UVB studies described above, the kinetics of strand-specific repair at the *c-jun* and *hprt* loci were determined and displayed graphically (Figure 20). Relative to wild-type TK6, p53-null NH32 manifested defective CPD removal from the NTS of either *c-jun* or *hprt* following 254-nm UV exposure,

whereas these strains displayed no difference whatsoever in repair along the TS of either target gene (Figures 20A and 20B). This result is in complete accord with the previous investigations (cited in the Introduction) on various human and murine strains exposed to 254-nm UV, but is in contrast to the situation described in the preceding paragraph for UVB-irradiated human lymphoblastoid or fibroblast strains where efficient repair of both the TS and NTS display strict p53 dependence.

Our overall data clearly demonstrate, in a well-defined isogenic system at two chromosomal loci, that loss of functional p53 significantly reduces the efficiency of GNER and TCNER in human cells exposed to polychromatic UVB; however following treatment with monochromatic 254-nm UV, p53 is essential for efficient GNER but absolutely dispensable for TCNER. The revelation of this striking wavelength-dependent effect apparently explains the perceived discrepancy discussed in detail earlier regarding the role of p53 in transcription-coupled repair. Although the underlying mechanism remains unknown, we suggest a plausible general model based on the capacity of photonic energy in the form of 254-nm UV, but not of UVB, to compensate for loss of functional p53 by stimulating the induction/activation of one or more proteins (normally also regulated by p53) that are required for TCNER. We further postulate that this process would constitute part of the so-called “mammalian UV-response”, which comprises a plethora of protective UV-inducible signalling cascades triggered *via* autophosphorylation of plasma membrane-associated growth-factor receptors (399). Evidence to support such a model has been provided by the demonstration that activation of jun-NH2 terminal kinase, *i.e.*, a major early event in the mammalian UV-response, may be required for efficient removal of cisplatin-induced DNA damage which is an NER-dependent process (400, 401). In addition, primary CS-B fibroblasts but not XP fibroblasts were shown to be impaired in jun-NH2 terminal kinase activation (402), suggesting a possible role for this event specifically in TCNER.

In further support of the above model, previous investigations have demonstrated that UV-induced signal transduction originating at the plasma membrane can be subject to wavelength-dependent regulation. Of particular significance given the example rendered in the preceding paragraph is that 254-nm

UV was shown to be considerably more potent than UVB in the activation of jun-NH2 terminal kinase in human cells (48, 403). In addition, UVB but not 254-nm UV induces significant activation of the MAP kinase pathway in either human primary melanocytes (404) or murine keratinocytes (405). The occurrence of such wavelength-dependent phenomena may be explained based on the fact that, to a far greater extent than 254-nm UV, polychromatic UVB is able to significantly alter the cellular redox state through the production of reactive oxygen species (406). Furthermore, it is well established that shifts in cellular redox potential *per se* can exert highly significant effects at the level of activation or inhibition of major stress-responsive signalling pathways (51). In any event, eventual characterization of the precise basis for the UV wavelength-dependent regulation of CPD removal observed here may be expected to reveal novel mechanistic information regarding the control of transcription-coupled repair in humans.

Finally, our results have important implications regarding experimental photobiology. 254-nm UV is virtually completely absorbed by the atmosphere, and therefore not a biologically-significant component of terrestrial sunlight. On the other hand UVB is present in the natural environment and constitutes the primary mediator for the most deleterious effects of solar radiation including erythema, immunosuppression, mutagenesis, and skin cancer (407, 408). Despite the above, since the inception of modern-day photobiological research, a vast *in vitro* and *in vivo* database has accumulated on the genotoxic and carcinogenic effects of 254-nm UV. Considerably fewer investigations have focused on UVB, and fewer still have rigorously compared the effects of UVB vs. 254-nm UV. The convenience and ready availability of germicidal lamps emitting 254-nm UV, coupled with the popular assumption that 254-nm UV and polychromatic UVB elicit similar biological responses, has perpetuated this situation. We note that the majority of previous studies employing the “nonsolar” model mutagen 254-nm UV may indeed stand the test of time with respect to physiological relevance. Nonetheless, in presenting one prominent example where 254-nm UV does not accurately replicate the effects of UVB, our data strongly emphasize the need to exercise much greater caution when choosing appropriate experimental models for skin cancer development in humans.

IV) Acknowledgements

This work was supported by grants held by E.A.D. from the National Cancer Institute of Canada (with funds from the Canadian Cancer Society) and from the Canadian Institutes of Health Research. E.A.D. and R.D. are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. J.P.T. is the recipient of a postdoctoral fellowship from the National Cancer Institute of Canada.

Table I Oligonucleotide primer sets for LMPCR analysis of the human *hprt* gene

Primer*	Sequence	Strand/Exon	T _m (°C)
HA-1	5'-ATCCAATCAAATGTTTGTATC	TS, exon 2	50.2
HA-2	5'-GTTTGTATCCTGTAATGCTCTCATTGAAAC		60.6
HB-1	5'-GAAGATTTTAGAAAGCATCAG	NTS, exon 2	52.1
HB-2	5'-CCTAGTTTATGTTCAAATAGCAAGTACTCAG		60.7
HC-1	5'-TTGGTGTGGAAGTTTAATG	TS, exon 3	51.0
HC-2	5'-GTGGAAGTTTAATGACTAAGAGGTGTTTG		60.6
HD-1	5'-GAAAATATAAGAAAACCTACTG	NTS, exon 3	50.7
HD-2	5'-GAAAACCTACTGTTGCCACTAAAAGAATC		60.6

* The first oligonucleotide of each pair is used for primer-extension while the second one is used for the amplification step. (See material and methods.) Primers are located within introns closely adjacent to the indicated exon.

T_m, melting temperatures used for primer annealing reactions.

V) Figure legends

Figure 16:

Repair rates at individual sites (exon 3, primer HC, nucleotides 16740 to 16880; genebank accession #M26939) are depicted for NH32 (left side), TK6-5E (middle) and TK6 (right side). The first four lanes on the left show LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. For each strain, the following seven lanes show LMPCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells that have undergone repair for the indicated times. The last lane for each strain shows LMPCR of unirradiated DNA followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion (background). The arrows indicate dipyrimidine sites that were quantified using a GS-25 Phosphorimager (BioRad), equipped with the MultiAnalyst program version 1.1.

Figure 17:

A, transcribed strand of *c-jun*; each data point represents the mean of 39 sites using primers JE (nucleotides +100 to +190; genebank accession #J09111), JX (nucleotides +1748 to +1910) and JS (nucleotides +233 to +389). **B**, transcribed strand of *hprt*; mean of 25 sites using primers HA (exon 2, nucleotides +14890 - +14980) and HC (exon 3, nucleotides +16740 - +16880). **C**, nontranscribed strand of *c-jun*; mean of 39 sites using primers JY (nucleotides +1644 - +1820) and JB (nucleotides -360 to -215). **D**, nontranscribed strand of *hprt*; mean of 20 sites using primer HB (exon 2, nucleotides +14850 - +14967). The standard error of the mean, calculated for each data point, was less than +/-3.0% in all cases. ■ TK6, □ TK6-5E, ▲ NH32

Figure 18:

Repair rates at individual sites using primer HD (exon 3, nucleotides 16510 to 16630) are depicted for NH32 (left side) and TK6 (right side). The lane designations and arrow indications are the same as for figure 1.

Figure 19:

Repair rates at individual sites using primer HA (exon 2, nucleotides 14890 to 14980) are depicted for NH32 (left side) and TK6 (right side). The lane designations and arrow indications are the same as for figure 1.

Figure 20:

A, transcribed and nontranscribed strand of *c-jun* using primers JE (nucleotides +100 - +190) and JS (nucleotides +233 - +389) for the transcribed strand and primers JT (nucleotides +230 - +310) and JY (nucleotides +1644 - +1820) for the nontranscribed strand. Each data point represents the mean of 25 sites for the transcribed strand and 27 sites for the nontranscribed strand. **B**, transcribed and nontranscribed strand of *hprt* using primers HA (exon 2, nucleotides 14890-14980) and HC (exon 3, nucleotides +16740 - +16880) for the transcribed strand, and primers HB (exon 2, nucleotides +14850 - +14967) and HD (exon 3, nucleotides +16510 - +16630) for nontranscribed strand. Each data point represents the mean of 38 sites for the transcribed strand and 45 sites for the nontranscribed strand. The standard error of the mean, calculated for each data point, was less than +/- 3.0% in all cases. Open and closed symbols depict repair of the transcribed and nontranscribed strand, respectively. □,■ TK6; △,▲ NH32 .

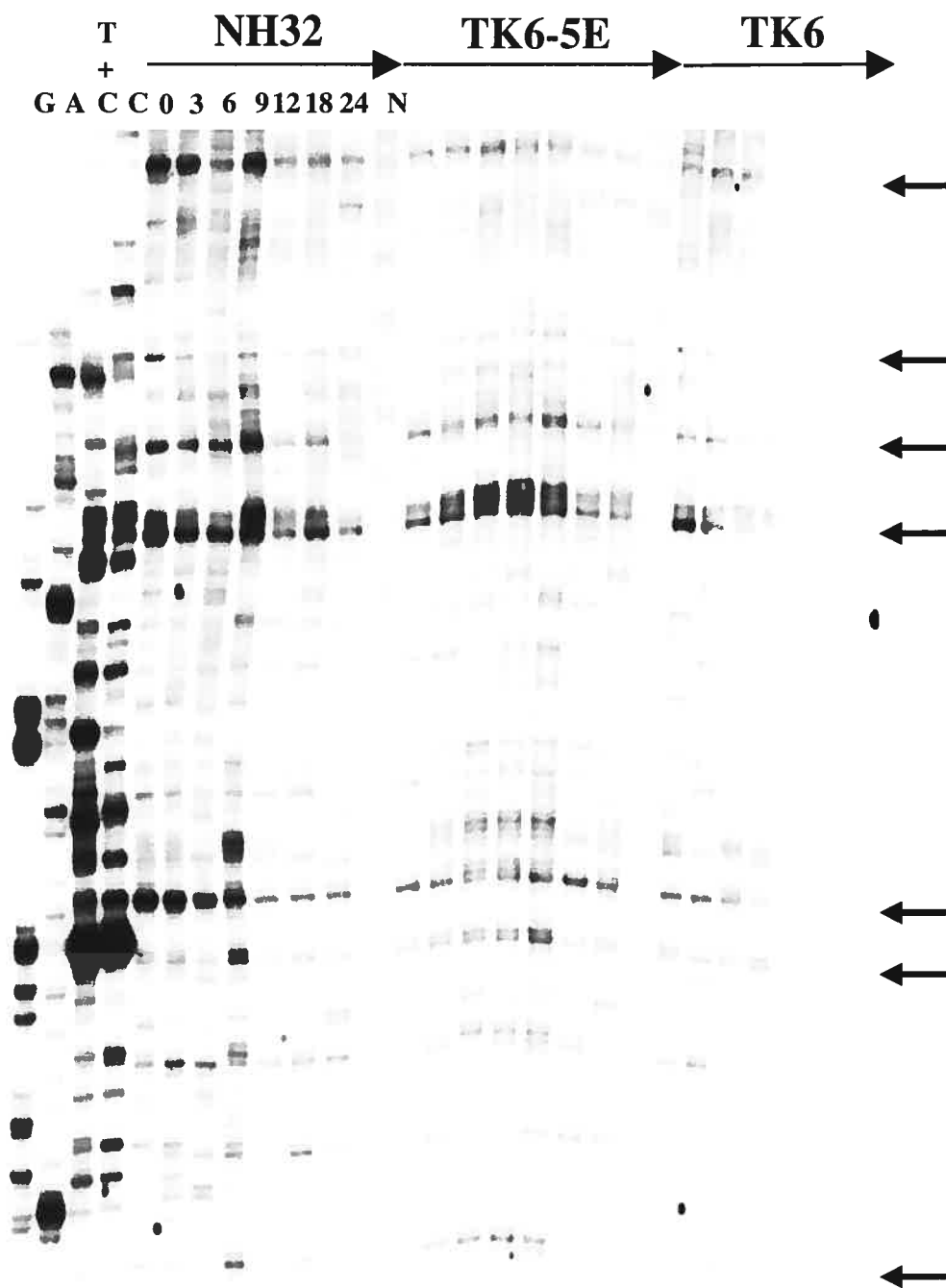


Figure 16. Repair of UVB-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the TS of the human *hprt* gene in TK6, TK6-5E, and NH32.

See figure legend for details.

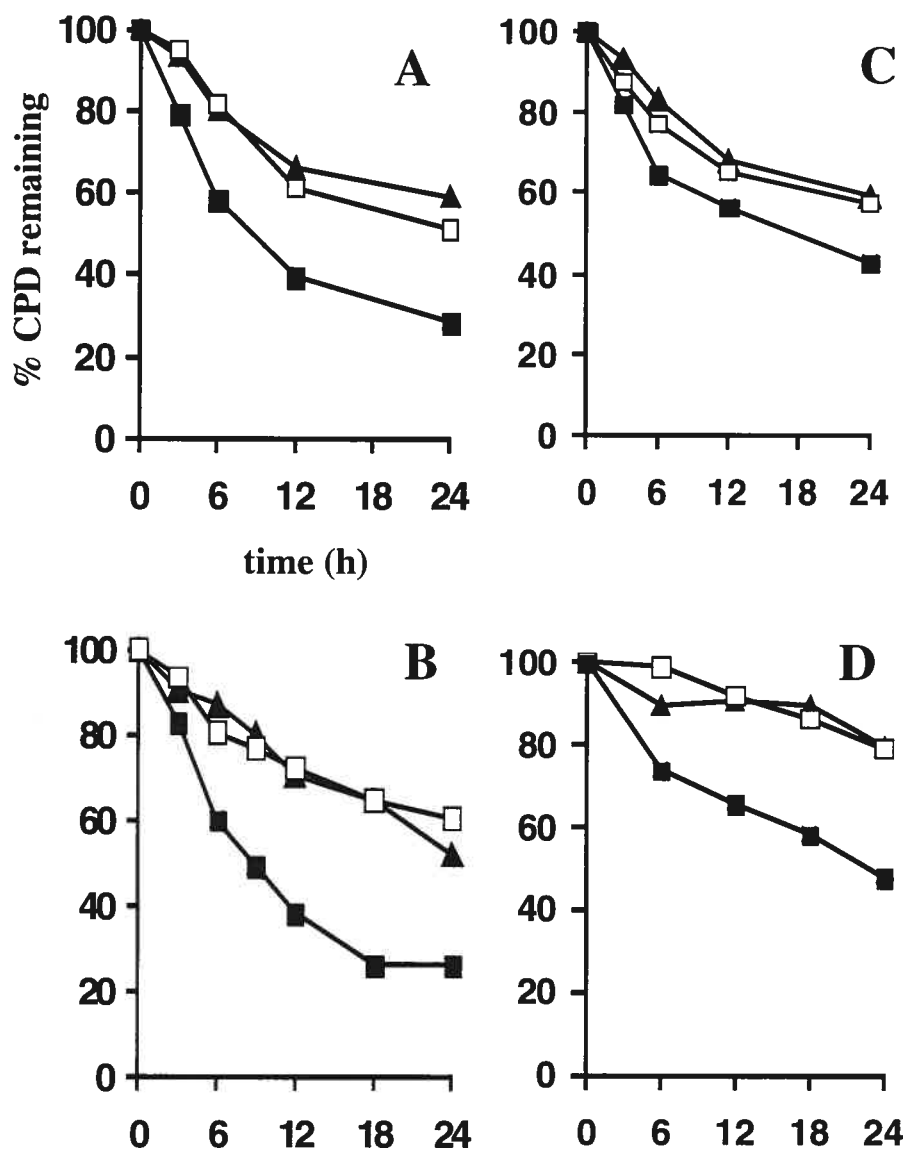


Figure 17. Influence of p53 status on CPD removal along the transcribed and nontranscribed strands of the *c-jun* and *hprt* loci in TK6, TK6-5E, and NH32 treated with polychromatic UVB.

See figure legend for details.

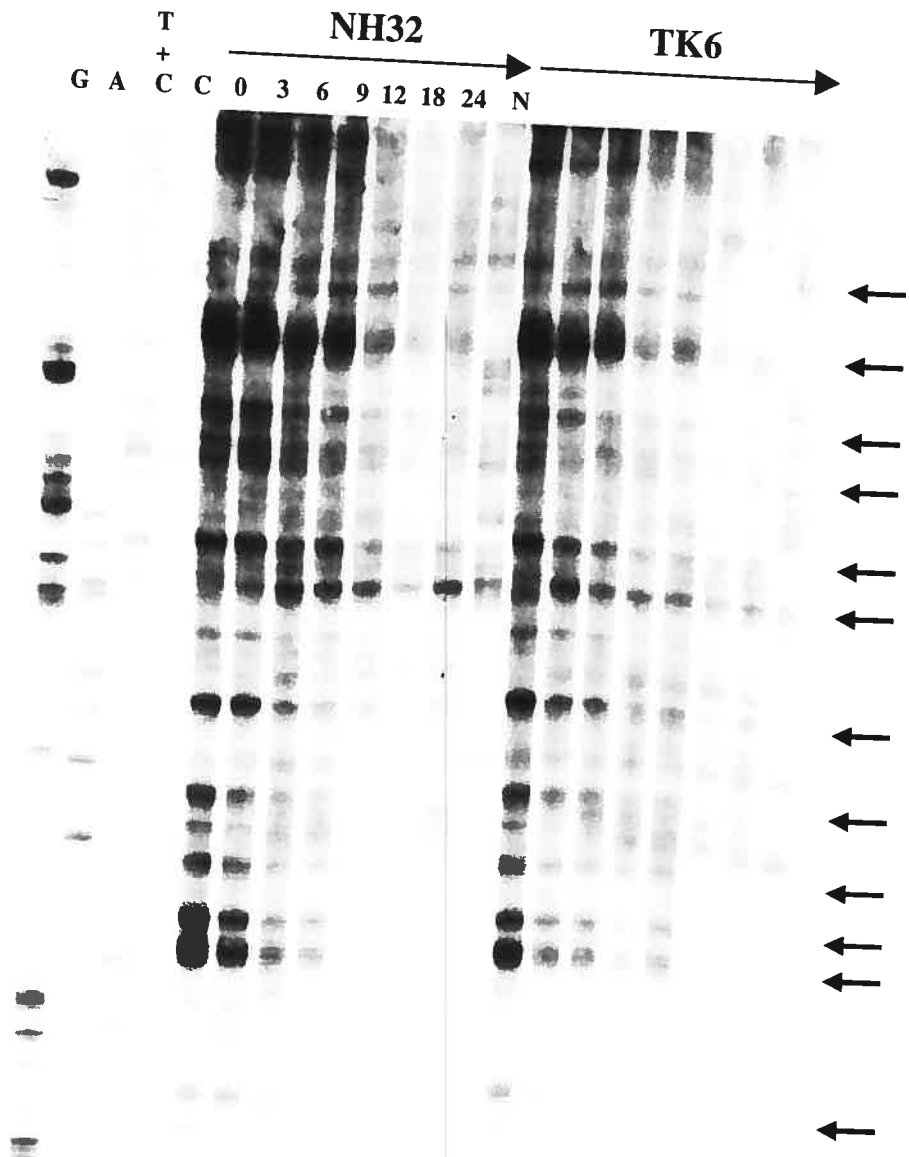


Figure 18. Repair of 254-nm UV-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the NTS of the human *hprt* gene in TK6 and NH32.

See figure legend for details.

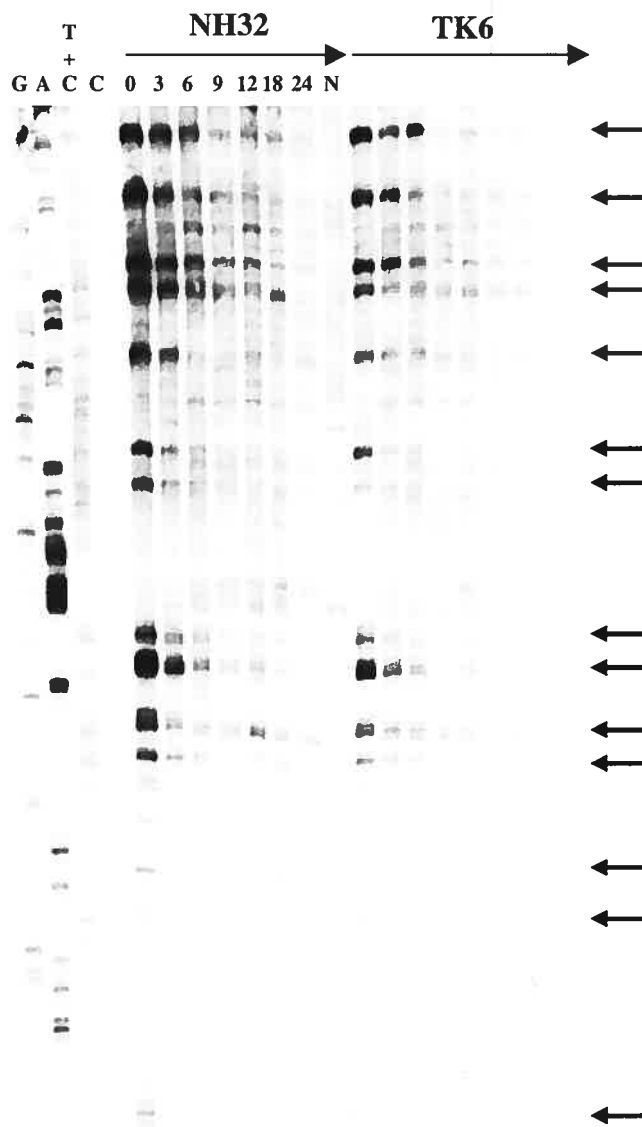


Figure 19. Repair of 254-nm UV-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the TS of the human *hpert* gene in TK6 and NH32.

See figure legend for details.

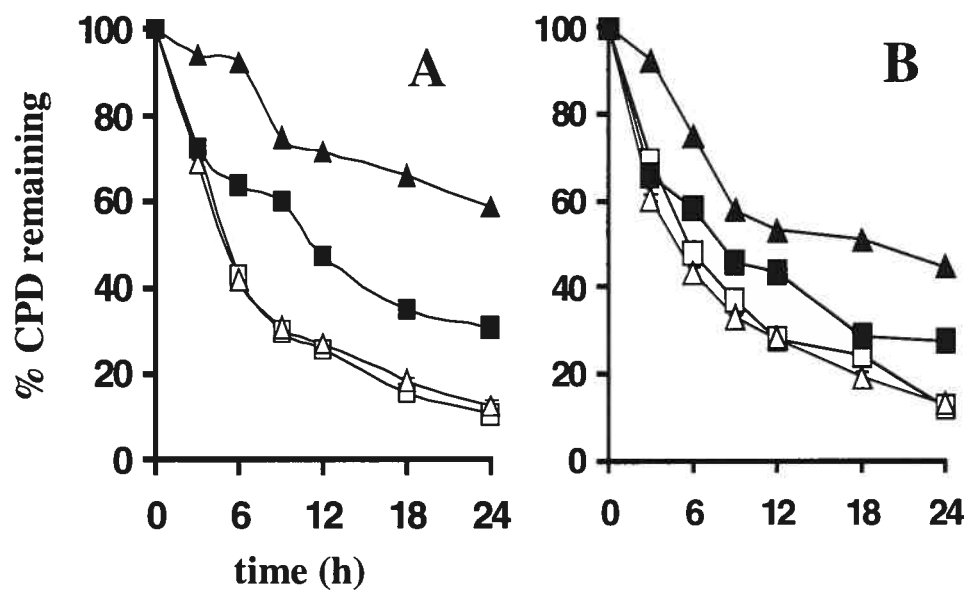


Figure 20. Influence of p53 status on CPD removal along the transcribed and nontranscribed strands of *c-jun* and *hppt* in TK6 and NH32 treated with monochromatic 254nm-UV.

See figure legend for details.

CHAPITRE III
ARTICLE II

Expression of hepatitis B virus X oncoprotein inhibits transcription-coupled nucleotide excision repair in human cells

Géraldine Mathonnet*, Silvana Lachance*, Moulay Alaoui-Jamali**,
and Elliot A. Drobetsky*

* Faculty of Medicine, University of Montreal and Guy-Bernier Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4

** Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1E2

Contribution: Cet article est publié dans la revue *Mutation Research. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 2004 Oct 4;554(1-2):305-18. Ma contribution à cette publication fut majeure puisque j'ai effectué 90% des expériences présentées ainsi que leur analyse et interprétation, en plus d'avoir contribué à l'écriture de l'article ainsi qu'aux corrections nécessaires. Les lignées exprimant la protéine HBx ont été réalisées par le laboratoire de Dr. Alaoui- Jamali, et les expériences de «northern blot» ont été effectuées avec l'aide de Mme Silvana Lachance.

Abstract

The hepatitis B virus X protein (HBx) is implicated in liver cancer development, and this presumably involves its ability to bind and functionally inactivate the p53 tumour suppressor. For example expression of HBx in cultured cells has been shown to inhibit global nucleotide excision repair, a p53-dependent subpathway of nucleotide excision repair (NER) which eliminates helix-distorting DNA adducts, *eg.*, UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), from the genome overall. However it remains undetermined whether HBx also interferes with transcription-coupled NER (TCNER), another NER subpathway which removes DNA adducts uniquely from the transcribed strand (TS) of active genes. To address this, we employed the model human lymphoblastoid strain TK6 and its isogenic p53-null counterpart NH32, in conjunction with derivatives of these strains constitutively expressing HBx (TK6-HBx and NH32-HBx). Relative to TK6, following exposure to either UVB (290-320-nm) or UVC (254-nm), TK6-HBx, NH32 and NH32-HBx manifested significantly reduced apoptotic capacity to varying degrees, although no striking differences in clonogenic survival between the four strains were observed. As previously documented in our laboratory (G. Mathonnet *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci., 100, 7219-7224), ligation-mediated PCR analysis revealed NH32 to be deficient compared with TK6 in CPD removal along the TS strand of the chromosomal *c-jun* locus following UVB exposure, but to be proficient in this respect following UVC exposure, *i.e.*, the requirement for p53 in TCNER exhibits wavelength dependence in human cells. Remarkably however, in contrast to the situation for NH32, TK6-HBx and NH32-HBx manifested defective repair along the TS of *c-jun* after irradiation with either UVB or UVC. The data demonstrate that HBx expression can reduce the efficiency of TCNER in addition to GNER in human cells *via* p53-independent as well as -dependent pathways.

I) Introduction

Chronic infection with hepatitis B virus (HBV) is a primary determinant in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) (409), one of the most frequent malignancies worldwide with approximately 500,000 new cases each year (410). HBV possesses a 3.2 kb double-stranded DNA genome comprised of four open reading frames, including one encoding the X regulatory protein (HBx) which apparently plays a major role in HCC development. Indeed, exogenous HBx expression has been linked to neoplastic transformation of rodent cells *in vitro* (322, 411) and to the induction of liver tumors in transgenic mice (238, 412). While the mechanisms underlying its procarcinogenic activity remain unclear, a burgeoning literature is revealing HBx to be a promiscuous transcriptional cofactor which, through modulation of multiple cellular signaling cascades and/or direct protein interactions, regulates critical nuclear transcription factors such as AP-1/-2, CREB/ATF2, and NF κ B (354, 413-418). It may be particularly noteworthy that HBx strongly binds the p53 tumor suppressor, thereby interfering with the latter's capacity to transactivate target genes, and to engage in protein-protein-interactions, in response to cellular stress (105). For example HBx expression has been shown to attenuate p53-dependent apoptosis in human cells (359, 360, 419), although not surprisingly given its highly pleiotropic properties, HBx can also either activate or inhibit apoptotic pathways which do not require p53 (357, 362, 412, 420).

Aside from apoptosis, another critical antineoplastic process known to be influenced by both p53 and HBx (see below) is nucleotide excision repair (NER). NER eliminates highly-promutagenic DNA lesions that characteristically distort the sugar-phosphate backbone and block transcription, including (i) the UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) which constitutes the preeminent model lesion for experimental evaluation of NER capacity in living cells (389), and (ii) the 8,9-dihydro-8 (N7-guanyl)-8-hydroxyaflatoxin B1 adduct (AFB1-N⁷-Gua adduct) induced by the liver-specific carcinogen aflatoxin B1 (AFB1; see Discussion). NER is comprised of two distinct but strongly overlapping subpathways: transcription-coupled NER (TCNER) removes DNA adducts exclusively from the transcribed strand (TS) of active genes, whereas global NER (GNER) removes DNA adducts

from virtually anywhere in the genome including from the nontranscribed strand (NTS) of active genes. GNER is initiated when the XP-E and XP-C/HR23B proteins recognize the helical distortion introduced into DNA by, *eg.*, CPDs or AFB1-N⁷-Gua adducts, and bind to the damaged site (421). In contrast, TCNER is triggered when the progression of RNA polymerase II becomes blocked at adducted positions along the TS of active genes, whereupon the CS-B and -A proteins converge possibly to facilitate displacement of the polymerase (376). Following these unique lesion recognition events in the case of either GNER or TCNER, the common “core NER pathway” is recruited and accomplishes error-free restoration of the DNA through sequential steps of (i) strand unwinding mediated by the XPB and XPD helicases; (ii) incision on either side of the lesion *via* the endonuclease activities of XP-G and XP-F/ERCC1; (iii) excision of the lesion as part of a single-stranded oligonucleotide ≈30 bp in length; and finally (iv) DNA resynthesis and ligation, using normal DNA replication factors and the undamaged complementary strand as template.

A series of investigations in human and murine cell lines irradiated with monochromatic 254-nm UVC (hereafter referred to as UVC) has revealed that functional p53 is required for efficient removal of CPDs from the NTS of transcriptionally-active target genes (reflecting the rate of GNER), but is completely dispensable for CPD removal along the TS (reflecting the rate of TCNER) (167, 169, 379, 381, 422). However more recently it has been demonstrated that the role of p53 in TCNER can vary strikingly according to the incident CPD-inducing UV wavelength. Indeed following exposure of human cells to polychromatic UVB (290-320-nm) (hereafter referred to as UVB), in contrast to the situation for UVC, elimination of CPDs along the TS (as well as the NTS) of active genes was shown to depend upon the presence of wild-type p53 (387, 423). In short, TCNER can be regulated by at least two distinct modes, *i.e.*, p53-dependent and -independent, as exemplified by the situation for UVB- and UVC-irradiated cells, respectively.

Of central importance here, previous studies employing assays of genome-overall repair have clearly indicated that exogenous HBx expression can interfere with GNER in cultured human or murine cells irradiated with UVC (225-227, 372), although a single dissenting study using transformed human liver cells did not reveal

any such effect (424). Since HBx can functionally inactivate p53, and furthermore p53 is strictly required for efficient global repair, it was reasonably postulated that HBx attenuates GNER in a p53-dependent fashion. However two of the aforementioned studies reported reduced repair of UV-induced DNA damage in p53-deficient (as well as -proficient) strains which express HBx (226, 372), indicating that HBx can also inhibit GNER independently of p53. In any case, no investigations to date have evaluated strand-specific NER along actively transcribed genes in HBx-expressing cells, and therefore any potential effect of this viral oncoprotein on TCNER remains to be determined. Here, following exposure to UVB or UVC, the ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) technique was used to directly quantify CPD removal at nucleotide resolution along the TS and NTS of the chromosomal *c-jun* locus in a model p53-wild-type human lymphoblastoid strain and an isogenic p53-null counterpart, in addition to derivatives of these strains constitutively expressing HBx. This approach allowed determination, for the first time, of the influence exerted by HBx on strand-specific nucleotide excision repair in human cells, and whether any such influence can be mediated *via* p53-dependent and/or -independent pathways.

II) Materials and methods

Cell Strains

The p53-proficient human lymphoblastoid strain TK6 and its isogenic p53-null counterpart NH32 were kindly provided by Dr. H.L.Liber (Colorado State University). The *HBx* coding sequence (derived from the HBV ayw subtype; nucleotides 1241-1991) was cloned into the bicistronic retroviral vector AP2 which also expresses enhanced green fluorescence protein (GFP) (425). In a manner described previously (330), TK6 and NH32 cells were infected with this *HBx*-bearing construct and, in addition, these two strains were each infected with the control AP2 vector expressing GFP alone. All retroviral infections yielded polyclonal populations where $\approx 90\%$ of the cells were GFP⁺ as determined by fluorescence microscopy. Each polyclonal population was subcloned in 96-well plates and, following 2 weeks growth, plates were screened under a fluorescence

microscope to select GFP⁺ clones. One such clone was ultimately chosen from each population and expanded for further analysis. Hereafter, the four expanded clones will be referred to as strains TK6, NH32, TK6-HBx, or NH32-HBx with the corresponding genotypes $p53^{+/+}GFP^+$, $p53^{0/0}GFP^+$, $p53^{+/+}HBx^+ GFP^+$, and $p53^{0/0}HBx^+ GFP^+$ respectively. All strains were maintained in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Invitrogen).

RT-PCR and reporter-gene transactivation assays

RT-PCR analysis was employed to confirm the presence or absence of intracellular HBx transcripts in each of TK6, NH32, TK6-HBx, and NH32-HBx. Briefly, 2×10^6 cells were lysed in 1 ml TRIzol[®] reagent (Invitrogen), and total RNA extracted using chloroform and isopropyl alcohol. Five µg of RNA were then reverse transcribed for 1 hr at 45°C in a reaction containing 24 U of Mo-MuLV reverse transcriptase (Invitrogen), 10 ng/µl oligo d(T)₁₂₋₁₈, and 500 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The resulting cDNA was then subjected to a standard PCR reaction using HBx-specific sense (5'-GGCTGCTAGGCTGTGCTGCC) and antisense (5'-GTTCCGGTGGGCGTTCACGG) oligonucleotide primers, as well as GAPDH-specific oligonucleotide primers as internal control, and visualized by agarose gel electrophoresis.

Whether HBx transcripts detected in the above manner encode a functional protein was evaluated by assessing the well-characterized capacity of HBx to modestly transactivate exogenous genes under control of an NFκB responsive element. For this purpose, a dual-luciferase reporter assay system was used according to manufacturer's instructions (Promega, WI). Briefly, cells were seeded in 24-well plates at 40,000 cells/well and incubated overnight. One microgram of the NFκB-driven *firefly* luciferase reporter plasmid pGL3 (kindly provided by Dr. R. Lin; McGill University) and 0.2 µg of the plasmid pRL-0 (encoding *renilla* luciferase for internal control) were cotransfected into each strain using Lipofectamine[®] reagent (Invitrogen). After 5 hours, the transfection mix was removed and cells were overlaid with complete RPMI medium. At 48 hrs post-

transfection, cells were lysed and luciferase activity determined using a Lumat LB-9507 luminometer (EG&G Berthold, Germany). Relative luciferase activity is expressed as the ratio of *firefly* luciferase expression (from pGL3) to *renilla* luciferase expression (from the control vector pRL-0). Reported values represent the average \pm SEM of six independent experiments.

UV Irradiation conditions

Prior to UV irradiation, exponentially-growing suspension cultures were washed thoroughly with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), resuspended in 5 ml PBS, and added to 100-mm culture dishes. Cells were irradiated with UVB using two fluorescent tubes (FS20T12/UVB/BP, Philips) delivering a dose rate of 6.5 J/m²/s. The incident UVB was filtered through a sheet of cellulose acetate (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch; Eastman-Kodak Co.) to virtually eliminate contaminating wavelengths below 290-nm. Alternatively, cells were exposed to UVC using an unfiltered Philips G25T8 germicidal lamp, at a fluence of 0.2 J/m²/s. UVB and UVC fluences were measured with a Spectroline DRC 100X digital radiometer equipped with DIX-300 and DIX-254A sensors, respectively (Spectronics Corp.).

Apoptosis analysis

Apoptosis was measured in TK6, TK6-HBx, NH32, and NH32-HBx by double staining with Hoechst 33342 (Sigma) and propidium iodide (PI; Molecular Probes) as previously described for strain TK6 (426). In this assay, the relative proportions of apoptotic vs. necrotic cells are distinguished based on differential dye permeability, *i.e.*, necrotic cells being permeable to both dyes whereas apoptotic cells are uniquely permeable to Hoechst 33342. Briefly, 5×10^5 exponentially-growing cells were irradiated in PBS with either 100 J/m² of UVB or 7.5 J/m² of UVC (equitoxic doses) and incubated in regular growth medium for 12 or 24 hrs. Cells were then centrifuged, resuspended in 100 μ l of PBS containing 1 μ g/ml Hoescht 33342, and incubated for 15 minutes at 37°C. The cells were again centrifuged and resuspended in 1 ml of PBS containing 5 μ g/ml of PI and 4 μ g/ml of RNase A, and immediately analysed by fluorescence-activated cell sorting using a FACStar

apparatus (Becton-Dickinson) equipped with a helium/cadmium laser emitting at 325-nm. Each time point represents the average \pm SEM of 4 independent experiments.

Clonogenic survival

Clonogenic survival assays were performed on TK6, NH32, TK6-HBx, and NH32-HBx following treatment in PBS with either UVB or UVC. Immediately after irradiation, cells were collected by centrifugation and resuspended in normal growth medium, followed by dilution and plating of appropriate cell numbers in replicate 96 well dishes. After 2 weeks incubation, dishes were scored for colony formation, and relative survival calculated on the basis of a Poisson distribution as previously described for strain TK6 (427). Results are expressed as the average \pm SEM of four independent experiments.

Ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR)

Using LMPCR, the rate of CPD removal was determined at nucleotide resolution along the TS and NTS of the chromosomal *c-jun* locus in TK6, NH32, TK6-HBx, and NH32-HBx following exposure to 450 J/m² UVB or 20 J/m² UVC. The LMPCR protocol has been previously described in detail (390, 428). Briefly, after UV irradiation and incubation of cells to allow repair, genomic DNA is isolated and digested with T4 endonuclease V to efficiently incise the DNA with high specificity at CPD sites. The DNA is then further digested with *Escherichia coli* photolyase to remove resulting 5'-pyrimidine overhangs, thus generating ligatable termini. A *c-jun* gene-specific oligonucleotide is annealed downstream of the break site, and the set of genomic cleavage products extended using *Pfu* exo⁻ DNA polymerase (Stratagene). An asymmetric double-stranded linker is ligated to the phosphate groups at the fragment termini, providing a common sequence on the 5' end of all fragments. A linker-specific primer, in conjunction with another gene-specific primer, is then used in a PCR to amplify the cleavage products of interest. These products are subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels alongside a Maxam and Gilbert sequencing ladder, transferred to nylon membranes (Roche),

hybridized to a ^{32}P -labeled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. Each experimental condition is assayed in duplicate. A screening sequencing gel is run using a portion of the DNA to ensure that there is no significant variation between the two samples, which are then pooled on a combined gel. All bands located at dipyrimidine sites, and yielding a measurable signal above background (*i.e.* above the signal in the “no UV” control lane representing unirradiated enzyme-digested DNA), were quantified using a Bio-Rad GS-525 phosphorimager (Bio-Rad Canada Ltd.). Each quantified band represents a nucleotide position where a break was induced by CPD cleavage, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position, *i.e.*, corresponding to the amount of damage remaining at this site relative to time 0. Variations in DNA sample loading were carefully controlled for by quantitatively assessing the relative intensities of non-specific signals between lanes in different regions of the gel. The LMPCR primer sets for studying repair at the *c-jun* locus (429), and the corresponding nucleotide positions along *c-jun* that can be analysed using each are:

1. To analyze repair rates along the TS, primer sets JS (+233 to +389) and JX (+1748 to +1910).
2. To analyze repair rates along the NTS, primer sets JB (-360 to -215) and JY (+1644 to +1820).

Northern Blot analysis

Induction of *c-jun* mRNA was analysed in our UV-exposed strains by Northern blotting according to standard protocols (430). Briefly, replicate cultures (1×10^7) cells treated with 450 J/m^2 UVB or 20 J/m^2 UVC, lysed at various time points post-irradiation in 1 ml TRIzol[®] reagent (Invitrogen), and total RNA extracted using chloroform and isopropyl alcohol. 15 μg of total RNA stained with ethidium bromide were separated on formaldehyde-agarose gels and transferred to nylon membranes. The membranes were hybridized overnight at 65°C with a ^{32}P -labeled *c-jun*-specific probe, and *c-jun* mRNA levels quantified *via* phosphorimager analysis. The 28S rRNA fraction was used to control for variations in sample loading.

III) Results

Construction and characterization of a model isogenic system to investigate the phenotypic consequences of HBx expression in human cells

We chose the extremely well characterized model human lymphoblastoid strain TK6 to study the influence of HBx expression on the cellular response to UV-induced DNA damage. Although HBV is mainly implicated in hepatocarcinogenesis, this virus is now known to be lymphotropic as well as hepatotropic and, moreover, recent studies have suggested that carriers are at higher risk for developing B-cell non-Hodgkin's lymphoma (278, 279) (as has now been more firmly established in the case of hepatitis C virus (431, 432)). In addition, we emphasize that primary human hepatocytes (*i.e.*, ideally the cellular model of choice) not only exhibit rapid loss of differentiated hepatic function in culture, but are also very difficult to obtain and characterized by extremely limited proliferative capacity, *i.e.*, are highly impractical for the types of studies currently described. Furthermore, it is apparent that commonly-used human hepatoma cell lines such as HepG2 bear little resemblance to their normal counterparts *in vivo*, *eg.*, displaying extensive downregulation of major liver-specific markers including activins (433) and drug metabolizing enzymes (434, 435). In summary, the TK6/NH32 system represents a convenient and physiologically-relevant model for investigating the effects of HBx expression in human cells.

Populations of TK6 or NH32 were infected with the bicistronic retroviral-based vector AP2 carrying the *HBx* and *GFP* open reading frames. The strains TK6-HBx and NH32-HBx were derived from the infected populations, and the presence of HBx mRNA confirmed by RT-PCR analysis (Figure 21A). On the other hand, no HBx transcripts could be detected in either TK6 or NH32 bearing AP2 vectors expressing only GFP. The four strains were then evaluated for their relative abilities to transactivate a luciferase reporter gene under control of an NF κ B promoter element. Consistent with prior studies (369, 419), HBx-expressing strains exhibited a 2 to 4 fold induction of luciferase reporter gene expression relative to either TK6 or NH32 (Figure 21B).

Influence of HBx expression on apoptosis and clonogenic survival

TK6, NH32, TK6-HBx, and NH32-HBx were treated with 100 J/m² of UVB and the apoptotic cell fractions measured *via* Hoechst 33342/propidium iodide staining followed by FACS analysis. All four strains manifested similar levels ($\approx 5\%$) of programmed cell death in the absence of UV treatment (data not shown). At 12 hrs. following UVB irradiation, TK6-HBx and NH32 manifested reductions in the proportion of cells undergoing apoptosis relative to TK6 (Figure 22A, left panel); moreover it is noteworthy that NH32-HBx was significantly deficient in apoptosis compared with NH32 ($p < 0.05$, unpaired t test with Welch correction). At 24 hrs post-UVB, NH32, TK6-HBx, and NH32-HBx exhibited more pronounced relative reductions in cellular apoptotic fraction, although at this particular time point no difference was noted between NH32 and NH32-HBx. Despite the above, similar levels of clonogenic survival were observed among the four strains after UVB exposure (Figure 22B, left panel). Treatment of cells with an equitoxic dose of UVC (7.5 J/m²) yielded a similar trend with respect to apoptosis induction in TK6 vs. TK6-HBx or NH32 (Figure 22A right panel). Moreover NH32-HBx showed significantly greater resistance to apoptosis than NH32 at either 12 or 24 hrs post-UVC ($p < 0.05$). However, as observed for UVB-exposed cells, no striking similarities in clonogenic survival were observed among the four strains following UVC irradiation (Figure 22B, right panel).

Influence of HBx expression on strand-specific NER of CPD following irradiation with UVB or UVC

LMPCR was employed to quantify CPD removal at nucleotide resolution along the NTS *vs.* the TS of the chromosomal *c-jun* locus in TK6, NH32, TK6-HBx and NH32-HBx following exposure to UVB or UVC. Figure 23 shows a sample LMPCR autoradiogram depicting CPD repair rates over a 24 hr period at individual nucleotide positions along a portion of the TS of *c-jun* in NH32, TK6-HBx, and TK6 following irradiation with 450 J/m² of UVB. (Autoradiograms reflecting CPD repair along other regions of the TS or NTS of *c-jun* in UVB- or UVC-exposed cells are not shown.) The arrows on the right side of this representative figure indicate

dipyrimidine sites manifesting a clear signal above background, *i.e.*, which could be precisely quantified by phosphorimager analysis. For any given site, the percentage of CPDs remaining at various times post-irradiation was calculated by comparing the intensities of bands produced at these times to that of the corresponding band at time zero (*i.e.*, no opportunity for repair, 100% of CPD remaining). Graphical compilations of all repair rate determinations along the TS and NTS of *c-jun* for each lymphoblastoid strain exposed to either UVB or UVC are presented in Figure 24. Two widely-spaced regions along each strand of *c-jun* (*i.e.* at the 5' and 3' ends) were independently evaluated on separate autoradiograms, and 10-20 dipyrimidine sites were quantified per region to arrive at a total of 20-40 sites analyzed/strand. Each data point on the graphs in Figure 24 represents a mean value calculated for these 20-40 sites. The results show that following irradiation with UVB or UVC, strains NH32, TK6-HBx and NH32-HBx are less proficient to equal extents compared with the isogenic wild-type counterpart TK6 in the removal of CPD from the NTS of *c-jun* (Figure 24A and 24C). This is consistent with prior studies (cited in the Introduction) indicating that HBx expression inhibits GNER in a p53-dependent manner. Moreover, as recently demonstrated in our laboratory (423), we reconfirm that p53-null NH32 is deficient in repair of the TS after UVB irradiation but completely normal in this respect after UVC irradiation (Figures 24B and 24D), *i.e.*, the requirement for p53 in TCNER of CPDs is UV wavelength dependent. Remarkably however, TK6-HBx and NH32-HBx exhibit similar reductions in repair of CPDs along the TS of *c-jun*, regardless of the incident CPD-inducing wavelength (Figures 24B and 24D).

Induction c-jun mRNA in UV-irradiated human lymphoblastoid cells

In order to investigate the possibility that any reductions in TCNER capacity observed here might be ascribed to attenuated transcription under our particular irradiation conditions, we measured the time course for c-jun mRNA induction in all of our strains by Northern blotting following exposure to 450J/m² UVB or 20J/m² UVC. After treatment with either wavelength, c-jun mRNA was strongly induced in TK6 and TK6-HBx, reaching a peak of 6-11-fold after 2 hours (Figure 25). Virtually

identical results were obtained for NH32 and NH32-HBx (data not shown). The results show that there is strong transcriptional activation of *c-jun* in all strains under each irradiation condition.

IV) Discussion

A number of previous investigations has demonstrated that HBx expression can significantly reduce the efficiency of GNER, apparently in a p53-dependent manner, in human or murine cultured cells exposed to UVC. In the current situation, we sought to investigate the heretofore unaddressed possibility that HBx also interferes with TCNER in human cells, and if so whether this interference may rely, or not, on HBx-mediated functional inactivation of p53. For this purpose we employed the human lymphoblastoid strain TK6 and an isogenic derivative carrying a homozygous *p53* gene knockout (NH32), in addition to derivatives of these strains constitutively expressing HBx (TK6-HBx and NH32-HBx). Following exposure to DNA damaging agents, NH32 was previously shown to exhibit hallmark p53-null phenotypes relative to TK6, including defects in each of G1/S arrest, apoptosis, and transactivation of p53 target genes (396, 397). In addition as shown here, compared with TK6, TK6-HBx and NH32-HBx manifest reduced levels of p53-dependent apoptosis following exposure to either UVB or UVC, as well as increased constitutive transactivation of an NFκB-driven luciferase reporter gene. These data provide assurance that retroviral-driven expression of HBx yields functional protein in a human lymphoblastoid cell background.

We have employed LMPCR here to directly demonstrate at nucleotide resolution that, relative to TK6, the efficiencies of CPD removal along both the NTS and TS of the chromosomal *c-jun* locus are attenuated to similar extents in TK6-HBx, NH32, and NH32-HBx following irradiation with UVB. This establishes for the first time that intracellular HBx expression can interfere with TCNER (in addition to GNER) in cultured human cells, and suggests that such interference may be attributable to functional inactivation of p53. However the further observation that CPD removal along the TS of *c-jun* is equally defective in TK6-HBx and NH32-HBx following UVC exposure, whereas this repair process proceeds normally (as

expected) in NH32, conclusively reveals that intracellular HBx expression can also inhibit TCNER independently of p53 in human cells. It should be noted that, as we showed previously (423), there is only a slight difference in the rate of repair of the TS vs. the NTS of *c-jun* in strain TK6 following irradiation with UVB (compare figures 24A and 24B). Interestingly however, after irradiation with UVC, preferential repair of the TS over the NTS of *c-jun* is considerably more apparent (compare figures 24B and 24D). The underlying basis for the wavelength difference in TCNER efficiency in p53-wild type TK6 after UVC vs. UVB exposure remains unknown, but this difference (in addition to the difference in TCNER capacity between TK6 and TK6-HBx), cannot be merely ascribed to a state of attenuated transcription under our irradiation conditions. Indeed the *c-jun* gene, an integral inducible component of the mammalian UV response, is known to be strongly activated at early times post-UV (32). Furthermore we have demonstrated here that all four strains exhibited strong patterns of *c-jun* mRNA induction whether exposed to 450 J/m² UVB or 20 J/m² UVC.

The NER defects in TK6-HBx, NH32, or NH32-HBx cannot be explained by active interference with DNA repair by apoptosis (as previously documented in murine cells (436)), since levels of programmed cell death induced by either UVB or UVC were reduced to varying degrees in these strains relative to TK6. Interestingly, although prior studies have clearly demonstrated a major role for p53 in UV-induced apoptosis (396, 437, 438), to our knowledge the current data are unique in documenting a decreased apoptotic response in the specific case of HBx-expressing human cells treated with an NER-dependent mutagen. Interestingly at most of the time points analyzed, TK6-HBx was somewhat more resistant than NH32 to UV-induced apoptosis, and NH32-HBx displayed even much stronger resistance. These data suggest that HBx attenuates apoptosis after DNA damage by both p53-dependent and -independent mechanisms. In any case, despite these anti-apoptotic effects, no striking differences in clonogenic survival were observed among the four lymphoblastoid strains after UV exposure. This lack of correlation between apoptosis and clonogenic survival may be explained by the multifunctional properties of HBx as these collectively influence the balance between cell death and survival in our

experimental system, *eg.*, in the case of TK6-HBx or NH32, a relative reduction in clonogenic survival attributable to defective NER of UV DNA photoproducts may well be offset by a concomitant enhancement of cellular viability accorded through suppression of DNA damage-induced apoptosis.

As emphasized above, the inhibitory effect of HBx on GNER in either UVC- or UVB-exposed cells may be largely explained by the capacity of this viral oncoprotein to bind and functionally inactivate p53. Indeed it has been demonstrated that induction of the GNER-specific proteins XPC and p48 (a UV-DDB subunit which is mutated in XPE patients) are p53-dependent in UVC-exposed human cells (383, 384). Moreover, possibly involving upregulation of gadd45 (381) and/or direct binding to the histone deacetylase p300 (439), functional p53 appears to be required for heterochromatin relaxation following UVC irradiation, which in turn is essential to allow access of the GNER lesion-recognition complex to sites of DNA damage. Such p53-dependent chromatin remodeling would be required for GNER, but not for TCNER where a “preexisting” open DNA conformation is presumably bestowed by the basal transcription machinery.

On the other hand, elucidation of the precise mechanism whereby HBx might inhibit either TCNER or GNER independently of p53 could be complicated by the highly multifunctional nature of this viral oncoprotein, although there are some definite possibilities. For example HBx may reduce GNER independently of p53 through its ability to directly bind the p127 subunit of UV-DDB (440). This latter interaction can promote UV-induced cell death (441, 442), but it is not clear if the cytotoxic effect is attributable to reduced GNER efficiency *per se* or to other functions of UV-DDB (443). In addition, HBx has been shown to directly bind the TFIIH components XPB and XPD (105, 444), which are required for basal transcription as well as for the strand-unwinding step of the core NER pathway. One investigation also reported that HBx expression can attenuate XPB and XPD expression at the mRNA and protein levels in transformed human cells (369). While the precise phenotypic consequences of these particular interactions remain to be clarified, sequestration and/or transcriptional down-regulation of XPB and XPD by HBx would be expected to reduce the efficiency of both GNER and TCNER

independently of p53. It is also conceivable that HBx influences GNER and/or TCNER without the participation of p53 through modulation of cellular signaling pathways, and/or through direct binding to a multitude of cellular transcription factors (see Introduction). For example, HBx was shown to interact with activating transcription-factor 2 (ATF-2; a downstream effector of the mitogen-activated protein kinase pathway), and to alter its promoter-binding specificity (414). Furthermore, evidence has been presented to indicate that jun NH₂-terminal kinase-dependent activation of ATF-2 plays a major role in the removal of cisplatin-induced DNA adducts *via* NER in human breast cancer cells (445). Finally we note that HBx directly binds basal transcription factors, not only TFIID as mentioned above, but also components of TFIIB (370) as well as the RNA polymerase subunit RPB5 (446). As a matter of speculation, such interactions with the cellular transcriptional machinery might also be expected to somehow affect the efficiency specifically of TCNER independently of p53.

As for most cancers, the initiation of multistage HCC can involve casual or occupational exposure over prolonged periods to environmental mutagens, many of which ostensibly induce highly genotoxic DNA adducts that are subject to removal *via* NER. As one well-characterized example, dietary exposure to the powerful mutagen AFB1 together with chronic HBV infection clearly play a preeminent synergistic role in the initiation of liver cancer in parts of Africa and Asia where HCC, HBV infection, and AFB1 contamination are all highly prevalent (447). Furthermore like CPDs, AFB1-N⁷-Gua adducts are repaired apparently exclusively *via* NER in human cells (53, 222). Therefore, as observed here for HBx-expressing cultured human cells irradiated with UV, inefficient TCNER (as well as GNER) coupled with defective apoptosis would be expected to occur in HBV-infected hepatocytes exposed to AFB1 *in vivo*. This in turn would favour the accumulation of genetically-damaged hepatocytes, thereby contributing to HCC development.

V) Acknowledgements

This work was supported by grants held by E.A.D. from the Canadian Institutes of Health Research and the National Cancer Institute of Canada (with funds from the Canadian Cancer Society). E.A.D. and M.A.-J. are scholars of Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). G.M. is the recipient of a fellowship from the Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal.

VI) Figure legends

Figure 21:

A, RT-PCR analysis of HBx and GAPDH expression in human lymphoblastoid cells. Samples were run on an agarose gel followed by staining with ethidium bromide. Lane 1, 100 bp ladder. Lanes 2-5, RT-PCR of TK6, TK6-HBx, NH32 and NH32-HBx, respectively. **B**, HBx-mediated transactivation of an NF- κ B-driven luciferase reporter gene in human lymphoblastoid cells. Values represent the mean of six independent experiments.

Figure 22:

A, Levels of apoptosis in TK6 (black bars), TK6 HBx (gray bars), NH32 (white bars) and NH32-HBx (striped bars) following irradiation with 100 J/m² UVB (left panel) or 7.5 J/m² UVC (right panel). The percentages of apoptotic cells were determined by double staining with Hoescht 33342 and propidium iodide, followed by FACS analysis. **B**, Clonogenic survival in TK6 (■), TK6-HBx (□), NH32 (▲) and NH32-HBx (Δ) following irradiation with UVB (left panel) or UVC (right panel). All values represent the mean of at least three independent experiments.

Figure 23:

Representative LMPCR autoradiogram depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the TS of *c-jun* (nucleotides +233 to +360, primer JS) in TK6, TK6-HBx and NH32 (NH32-HBx not shown). The first four lanes on the left show LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. For each strain, the next five lanes show LMPCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells that have undergone repair for the indicated times. The last lane for each strain shows LMPCR of DNA isolated from unirradiated cells that was digested with T4 endonuclease V/photolyase (background signal). The arrows on the right indicate dipyrimidine sites that were quantified using a GS-25 Phosphorimager (BioRad), equipped with the MultiAnalyst program version 1.1.

Figure 24:

Influence of *p53* status and HBx expression on GNER (**A**) and TCNER (**B**) in human lymphoblastoid strains following exposure to 450 J/m² UVB, and on GNER (**C**) and

TCNER (D) following exposure to 20 J/m^2 UVC. The percentage of CPDs remaining along the TS and NTS were determined using primers sets described in Materials and Methods. At least 15 to 40 dipyrimidine sites were quantified per strand for each of TK6 (■), TK6-HBx (□), NH32 (▲) and NH32-HBx (Δ).

Figure 25:

Irradiated (or mock irradiated) cells were collected at various time points and $15 \mu\text{g}$ of total RNA were subjected to Northern blot analysed as described in Materials and Methods.

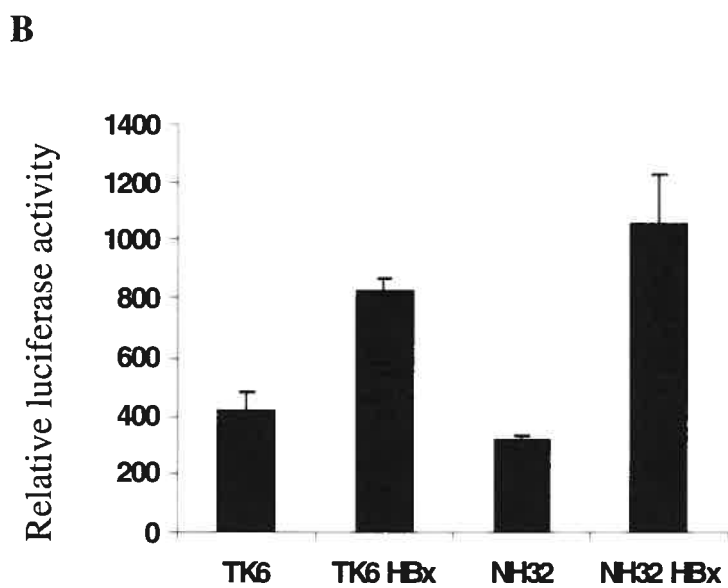
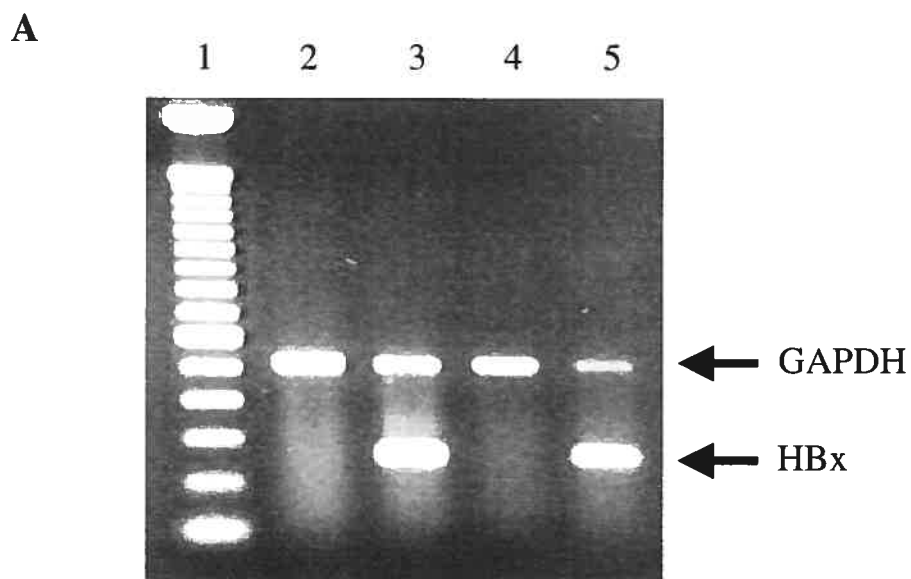


Figure 21. Analysis of HBx mRNA expression level and transcriptional activity in TK6 and NH32 strains.

See figure legend for details.

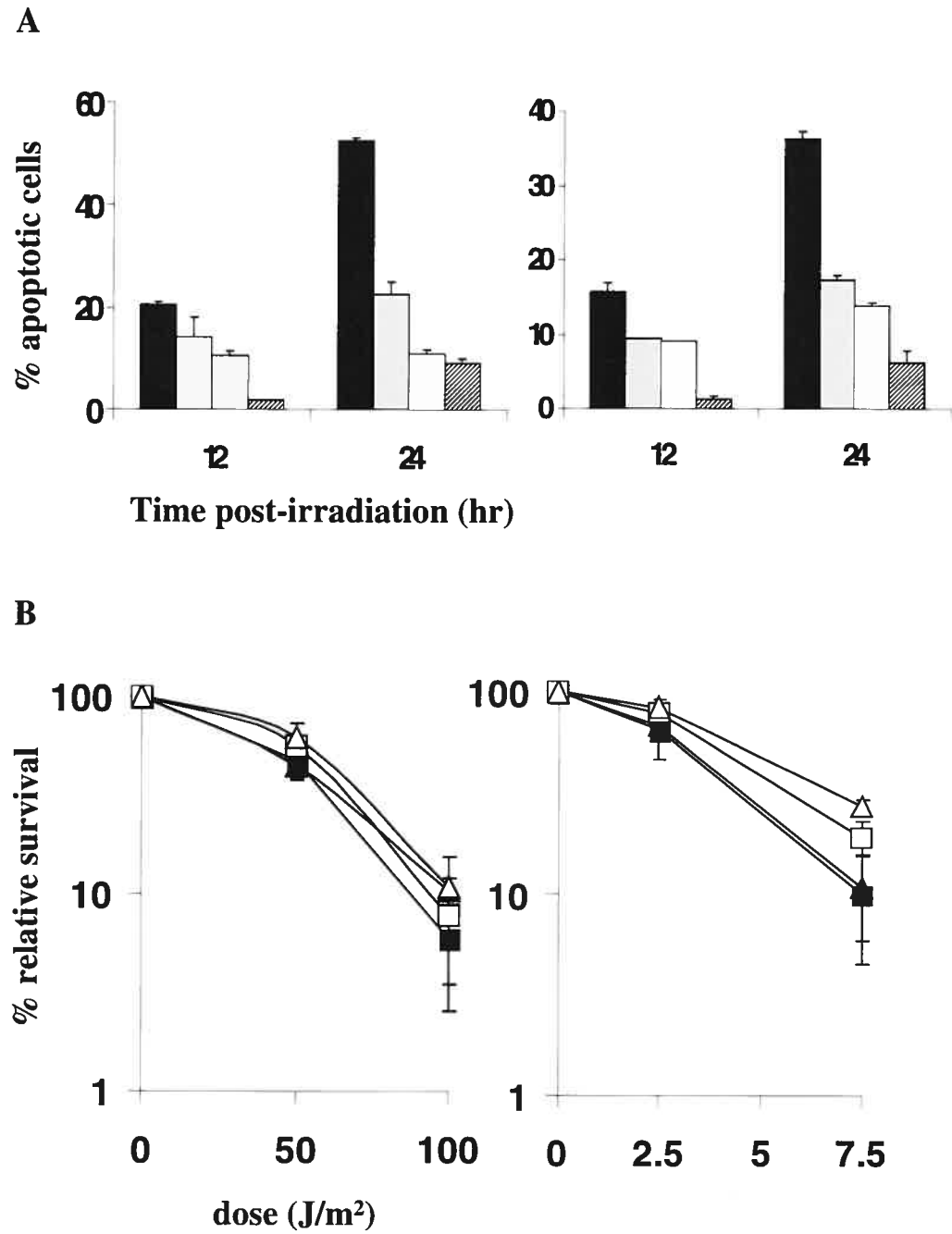


Figure 22. Influence of HBx expression and p53 status on apoptosis and clonogenic survival following UVB or 254-nm UV irradiation.

See figure legend for details.

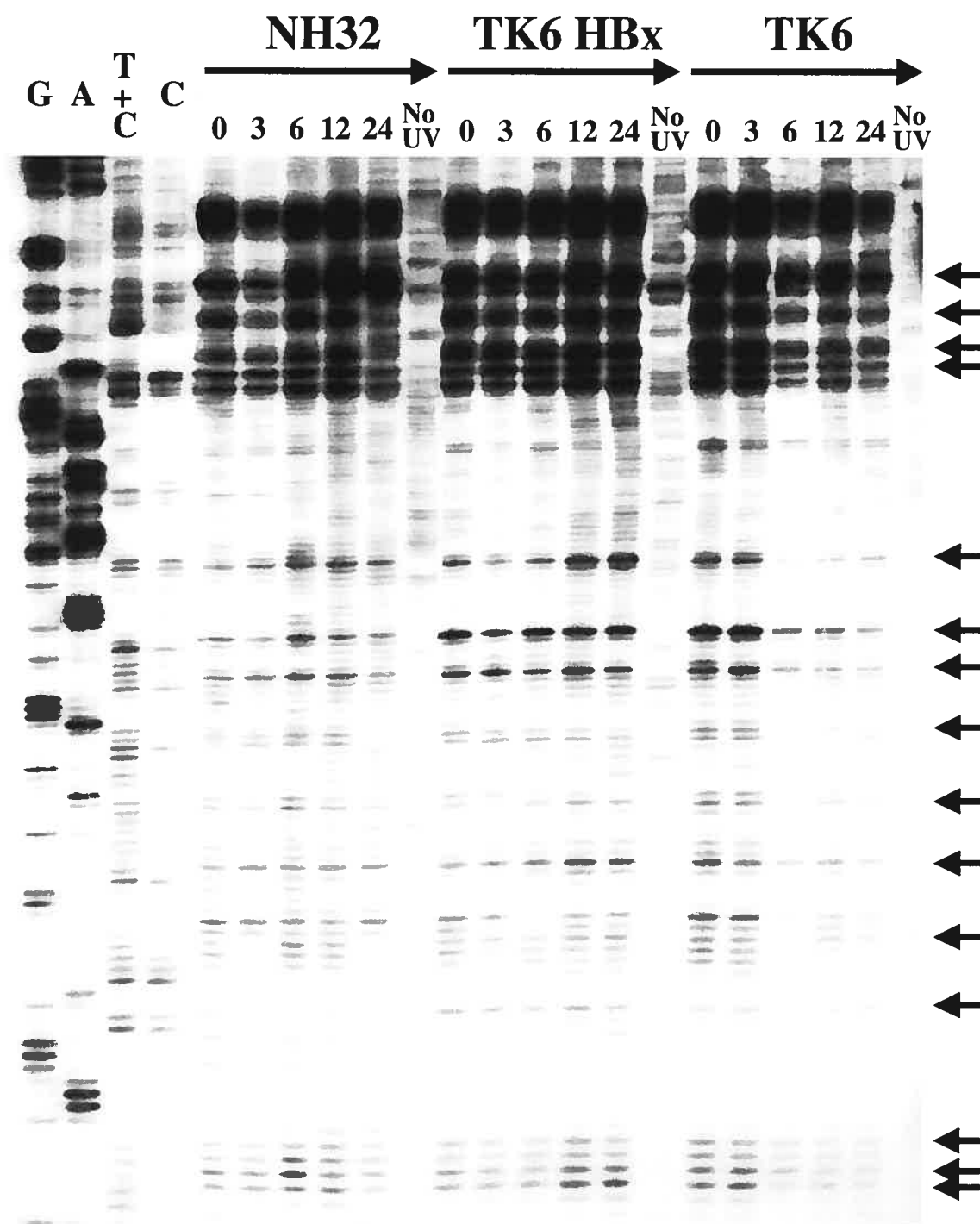


Figure 23. Repair of UVB induced CPDs on the transcribed strand of *c-jun* in TK6, TK6 HBx and NH32.

See figure legend for details.

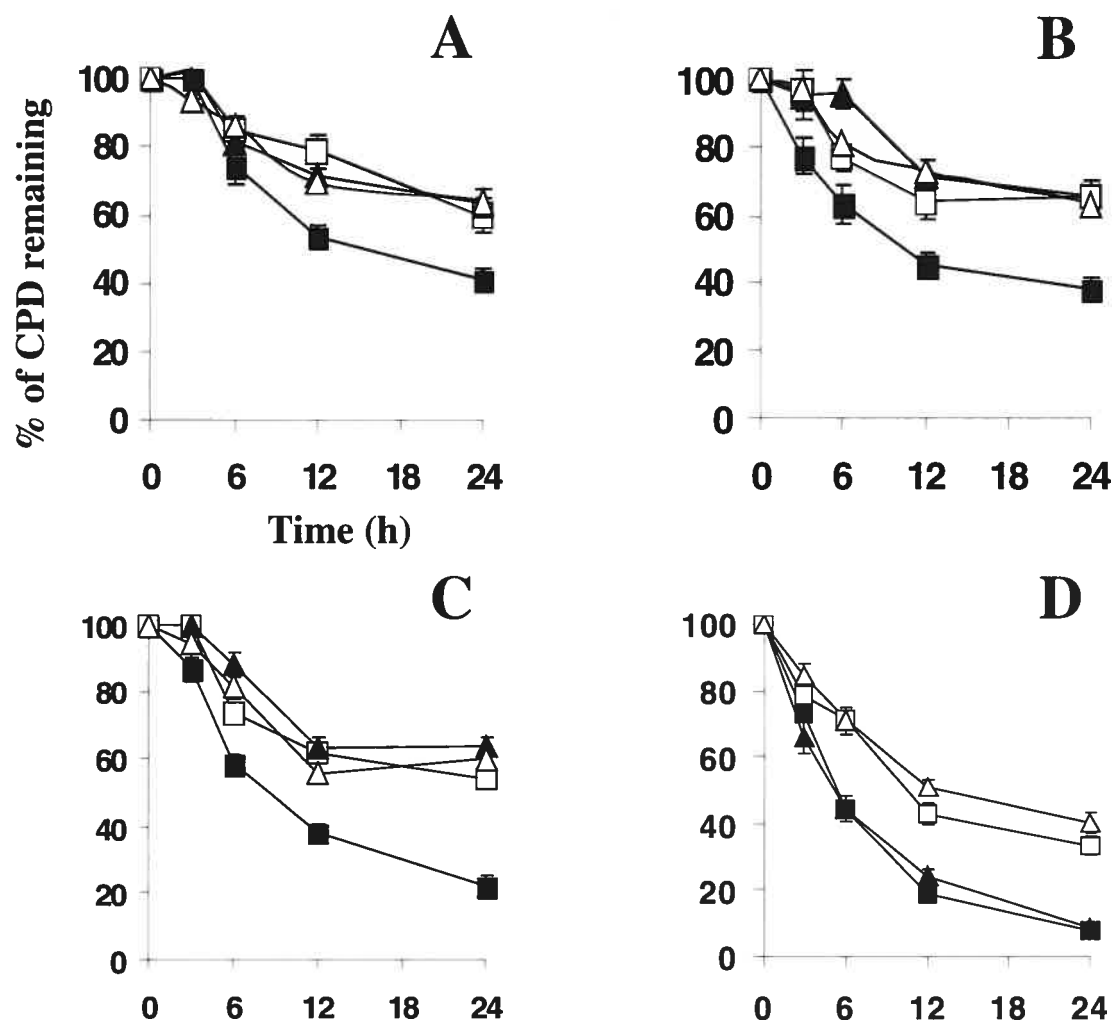


Figure 24. Influence of HBx and p53 expression on GNER and TCNER following UVB or 254 nm UV irradiation.

See figure legend for details.

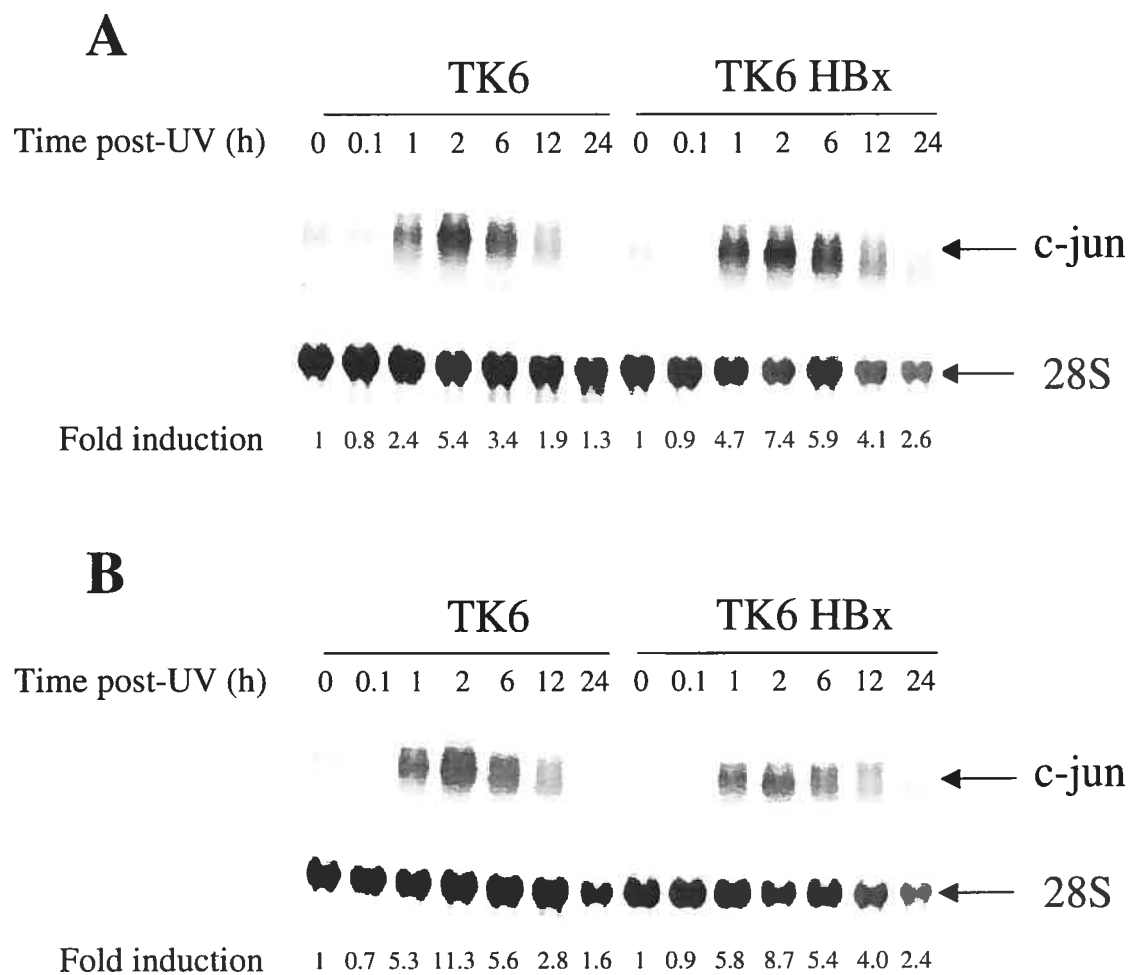


Figure 25. Time course for *c-jun* mRNA induction in TK6 and TK6-HBx irradiated with 450 J/m² UVB (A) or 20 J/m² UVC (B).

See figure legend for details.

CHAPITRE IV
DISCUSSION

Dans les études expérimentales, les rayons UV sont souvent utilisés comme outil pour l'étude de la réponse cellulaire au stress. Néanmoins, il est important de distinguer les études utilisant les UV comme un outil expérimental, de celles utilisant les UV pour mieux comprendre les effets physiologiques et pathologiques de ces radiations telle que la carcinogénèse environnementale. Malheureusement, ces dernières études sont souvent peu pertinentes car beaucoup d'entre elles utilisent des lampes germicides émettant des UVC de longueur d'onde 254nm. Or, ce type de rayonnement UV ne se retrouve pas à la surface de la Terre puisqu'il est bloqué par la couche d'ozone, et de plus, ne pénètre que superficiellement dans les tissus cutanés. D'autre part, les doses utilisées sont très souvent extrêmement élevées et entraînerait la mort de la majorité de types cellulaires. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré qu'il existe des différences fondamentales entre les UVB et les UVC au niveau physiologique. Alors que les UVC sont majoritairement absorbés par l'ADN, les UVB vont être absorbés par divers chromophores dont les protéines, en plus de l'ADN. Ainsi, afin de comparer les effets des rayons UVB et UVC au niveau cellulaire, il est nécessaire d'utiliser des doses équitoxiques, générant la même quantité de CPD au niveau de l'ADN. Or, dans très peu d'études publiées les auteurs ont pris cette précaution. De plus, les conséquences d'une irradiation aux UV dépendent non seulement de la longueur d'onde, mais aussi en grande partie de la dose utilisée ainsi que du type cellulaire étudié. Ainsi, les nombreux effets intracellulaires d'une irradiation aux UVB ou aux UVC rapportés dans la littérature sont extrêmement variables. Dans l'article I intitulé « UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair », nous avons voulu clarifier les données rapportées dans la littérature concernant les différences entre les rayons UVB et UVC 254nm au niveau du mécanisme de réparation de l'ADN et du rôle de p53 dans ce mécanisme. En effet, des études précédentes ont démontré que p53 joue un rôle majeur dans la voie GNER uniquement, alors que notre laboratoire a rapporté que cette protéine est nécessaire à l'efficacité des voies GNER et TCNER (168, 169, 423). Afin de résoudre ces divergences, nous avons comparé l'effet des UVC 254nm utilisés dans la première étude à celui des UVB utilisés dans la

dernière, sur le rôle de p53 dans les voies GNER et TCNER. Dans le but d'effectuer une comparaison adéquate des résultats obtenus après irradiation aux UVB et UVC 254nm, les cellules TK6 et leurs dérivés ont été irradiées avec des doses d'UV équitoxiques. En effet, 20 J/m² UVC 254nm produisent une quantité de CPDs semblable à la quantité générée par 450 J/m² UVB (figure 26).

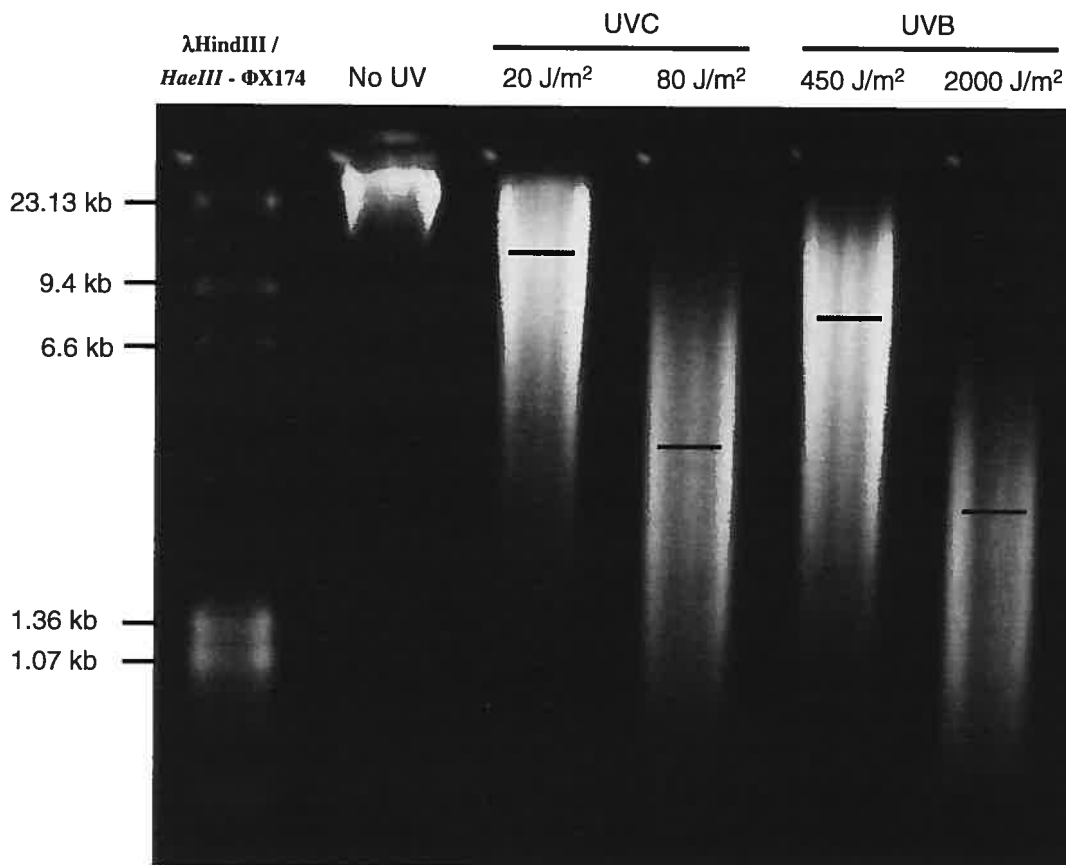


Figure 26. Analyse de la quantité de CPDs générés dans les cellules humaines TK6 après irradiation aux UVB ou aux UVC 254nm.

Les cellules TK6 ont été irradiées aux doses indiquées à une fluence de 0,2 J/m² et 6,5 J/m² pour les UVC ou les UVB respectivement. L'ADN extrait est ensuite digéré par l'enzyme T4 endoV qui clive spécifiquement au niveau des CPDs, puis migré sur un gel d'agarose dénaturant (gel alcalin).

Ainsi, tel que montré sur la figure 26, 20 J/m^2 UVC 254nm vont générer environ 0,8 cassures/10kb, alors que 450 J/m^2 créeront 1,2 cassures/10kb environ, après digestion de l'ADN irradié par l'enzyme T4 endoV. Les quantités de dommages générées par ces doses d'UVC et d'UVB sont donc similaires, nous assurant ainsi que les doses utilisées pour notre étude sont équitoxiques. Les résultats présentés dans l'article I nous ont permis de démontrer que suite à une irradiation aux UVB, la protéine p53 serait impliquée dans les voies GNER et TCNER (figure 17). Par contre, après exposition des cellules aux UVC 254nm, p53 est impliquée dans la voie GNER uniquement puisque les cellules isogéniques déficientes en p53 ont un taux de réparation identique aux cellules p53 normales sur les brins transcrits de c-jun et hprt (figure 20). Ainsi, ces résultats semblent résoudre les divergences précédentes concernant le rôle de p53 dans la voie TCNER. Néanmoins, il reste encore à déterminer le(s) mécanisme(s) précis permettant à la voie TCNER de demeurer efficace même en l'absence de p53, suite à une exposition aux UVC 254nm. L'élucidation de tels mécanismes serait d'importance majeure étant donné que la perte de fonction de la protéine p53 est un des événements précoces menant à l'apparition d'un cancer. La stimulation de cette voie encore indéterminée, permettrait aux cellules de réparer les dommages induits par les UV sur le brin transcrit, même en l'absence de p53.

Parmi les différences majeures existant entre les UVB et les UVC, la production de ROS semble être la plus importante. En effet, les UVB vont générer une quantité de ROS beaucoup plus importante que les UVC, à dose équitoxique (406). Il est ainsi raisonnable de penser que les ROS générés par les UVB inhiberaient la voie de signalisation permettant aux cellules déficientes en p53 de réparer efficacement le brin transcrit. Parmi ces voies de signalisation, les voies impliquant les MAPK sembleraient constituer une bonne piste dans l'étude de tels mécanismes. En effet, des études ont montré que JNK est activée de façon plus importante par les UVC que par les UVB (403-405). Ainsi, il serait intéressant de vérifier si un tel mécanisme est observé dans notre système, et si la modulation de cette voie aurait des effets au niveau de la voie TCNER. Dans ce but, il serait important de vérifier

l'activation des MAPK grâce à des anticorps spécifiques aux formes phosphorylées (actives) des MAPK, ainsi que leur activité en mesurant la phosphorylation de leurs substrats respectifs, après irradiation aux UVB ou aux UVC. De plus, il existe plusieurs inhibiteurs spécifiques de ces MAPK. L'étude de la voie TCNER en présence de tels inhibiteurs nous permettrait de déterminer quelle voie de signalisation MAPK stimulerait la réparation du brin transcrit en l'absence de p53 fonctionnelle. Il se pourrait néanmoins que ce mécanisme soit beaucoup plus complexe et que plusieurs voies de signalisation soient impliquées. Ainsi, l'article I a permis de révéler que les UVC et les UVB peuvent avoir des effets très différents au niveau intracellulaire, plus précisément au niveau de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides. Par conséquent, le mutagène UVC 254nm constitue un excellent modèle pour des études mécanistiques fondamentales mais devrait être substitué par les UVB ou les UVA pour les études reliées aux mécanismes de la carcinogénèse environnementale.

Les fonctions fondamentales de p53 peuvent être affectées par des oncoprotéines virales. Dans les cellules infectées par le virus de l'hépatite B, l'oncoprotéine virale HBx va lier et inhiber les fonctions de p53 (voir introduction paragraphe IV 2) a)). Comme mentionné dans le paragraphe IV, l'interaction de HBx avec p53 entraîne des conséquences majeures au niveau des processus cellulaires impliquant p53 comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Néanmoins, HBx n'agit pas uniquement *via* p53, mais interagit aussi avec de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Ainsi, HBx affecterait plusieurs mécanismes intracellulaires et ce, de façons dépendantes et/ou indépendantes du suppresseur de tumeurs p53.

Les précédentes études concernant le rôle de HBx dans la réparation par excision de nucléotides, ont permis de démontrer indubitablement que HBx interfère et inhibe la voie GNER. Néanmoins, aucune étude n'avait jusqu'à présent démontré un effet de la protéine HBx sur la voie TCNER. L'article II constitue ainsi une étude-pilote puisqu'il rapporte pour la première fois un rôle substantiel de la protéine HBx sur la réparation du brin transcrit d'un gène endogène actif. En effet, la mesure de la vitesse d'enlèvement des CPDs sur le brin transcrit du gène *c-jun* par la méthode de

LMPCR, a révélé un défaut important dans la voie TCNER dans les cellules lymphoblastiques humaines TK6 HBx comparées aux cellules isogéniques n'exprimant pas la protéine virale. De plus, cette étude suggère que l'effet de HBx sur le TCNER serait indépendant de la présence de la protéine p53 fonctionnelle. En effet, les cellules TK6 HBx sont déficientes en TCNER non seulement après irradiation des cellules aux UVB, mais aussi après exposition aux UVC. Ces résultats mettent en évidence un mécanisme majeur pouvant être impliqué dans la carcinogénèse hépatique. En effet, il est connu que le suppresseur de tumeurs p53 est inactif dans une grande partie des CHC, et constituerait un événement précoce de la carcinogénèse hépatique. Par ailleurs, on connaît le lien étroit entre l'infection par le HBV et l'apparition du CHC. Ainsi, on peut comprendre qu'une infection des cellules hépatiques par le HBV et l'expression de la protéine HBx, favoriseraient la carcinogénèse de manière considérable dans les cellules déficientes en p53 (suite à des mutations causées par AFB₁ par exemple), en agissant notamment au niveau des voies GNER et TCNER. Il est important de mentionner par ailleurs que les études présentées dans l'article II ont été effectuées dans le système modèle des cellules lymphoblastiques TK6. On pourrait penser que l'utilisation d'hépatocytes serait plus appropriée pour ce type d'étude. Néanmoins, les hépatocytes en culture perdent rapidement leurs propriétés spécifiques et ont une capacité de prolifération restreinte les rendant inutilisables pour les études de LMPCR nécessitant de très importantes quantités de cellules. Par ailleurs, certaines études ont rapporté l'infection possible de lymphocytes par le virus HBV pouvant mener à l'apparition de lymphôme. Ainsi, les cellules TK6 et leurs dérivés constituent un bon modèle pour l'étude des fonctions de HBx sur divers mécanismes cellulaires fondamentaux, dont la réparation de l'ADN. D'autre part, les UV étant un modèle d'étude de la voie NER, mais n'étant évidemment pas pertinents pour l'étude de la carcinogénèse hépatique, il serait intéressant de vérifier si les mêmes effets sont observés suite à une exposition à l'AFB₁. Néanmoins, les UV constituent un modèle pertinent pour l'étude de la lymphomagenèse induite par le HBV, puisque les lymphocytes peuvent être exposés aux UV dans les microcapillaires sanguins situés à la surface de la peau.

Il serait maintenant intéressant de comprendre les mécanismes par lesquels la protéine HBX inhiberait la voie TCNER indépendamment de p53. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, HBx affecte de nombreuses voies intracellulaires ne faisant pas intervenir la protéine p53, comme les voies NFκB et MAPKs. Aucun lien n'ayant été démontré entre la voie NFκB et la voie TCNER, il serait intéressant d'orienter les études futures sur les voies MAPKs. En effet, une étude récente suggèrent que la voie ERK stimulée par l'acétate de plomb, stimulerait la NER (448). Les précédentes études ont montré que HBx affecte les voies MAPK en l'absence de dommage à l'ADN (voir introduction paragraphe VI 2) b) ii)). Néanmoins, aucune étude n'a évalué l'effet de la protéine HBx sur l'activation des MAPKs suite à une irradiation aux UVB ou aux UVC. Afin de déterminer l'effet de la protéine HBx sur l'activation des MAPKs suite à l'induction de dommages à l'ADN, la phosphorylation des MAPK JNK et ERK a été analysée par immunobuvardage de type western grâce à des anticorps spécifiques aux résidus phosphorylés de celles-ci, après irradiation des cellules TK6 et TK6 HBx avec 20 J/m² d'UVC 254nm (dose identique à celle utilisée pour les expériences de réparation présentées dans l'article II). Comme le montre la figure 27 A), les cellules exprimant HBx démontrent une hyperactivation (hyperphosphorylation) de JNK suite à l'irradiation aux UVC, alors que les niveaux d'activation de base sont semblables. Après quantification de ces résultats (figure 27 B)), on constate que dans les cellules exprimant HBx, JNK est phosphorylée jusqu'à 50 fois plus que dans les cellules TK6, le pic d'activation se situant une heure après l'irradiation dans les deux lignées. Par ailleurs, l'analyse de la phosphorylation de ERK (figure 28), démontre que HBx activerait ERK en l'absence de dommage à l'ADN (comparer TK6 HBx NT avec TK6 NT, figure 28 A)), alors qu'il n'y aurait pas d'activation de ERK après irradiation avec des UVC dans les cellules TK6 HBx comparées aux cellules TK6 (figure 28 B)). Ainsi, ces résultats suggèrent que la protéine HBx agirait au niveau de la phosphorylation des MAPK. Étant donné que les MAPK jouent un rôle majeur dans plusieurs mécanismes intracellulaires, il serait intéressant de vérifier si l'hyperactivation de JNK en présence de HBx suite à une irradiation aux UVC, participerait à l'inhibition de la voie TCNER par l'oncoprotéine virale de manière

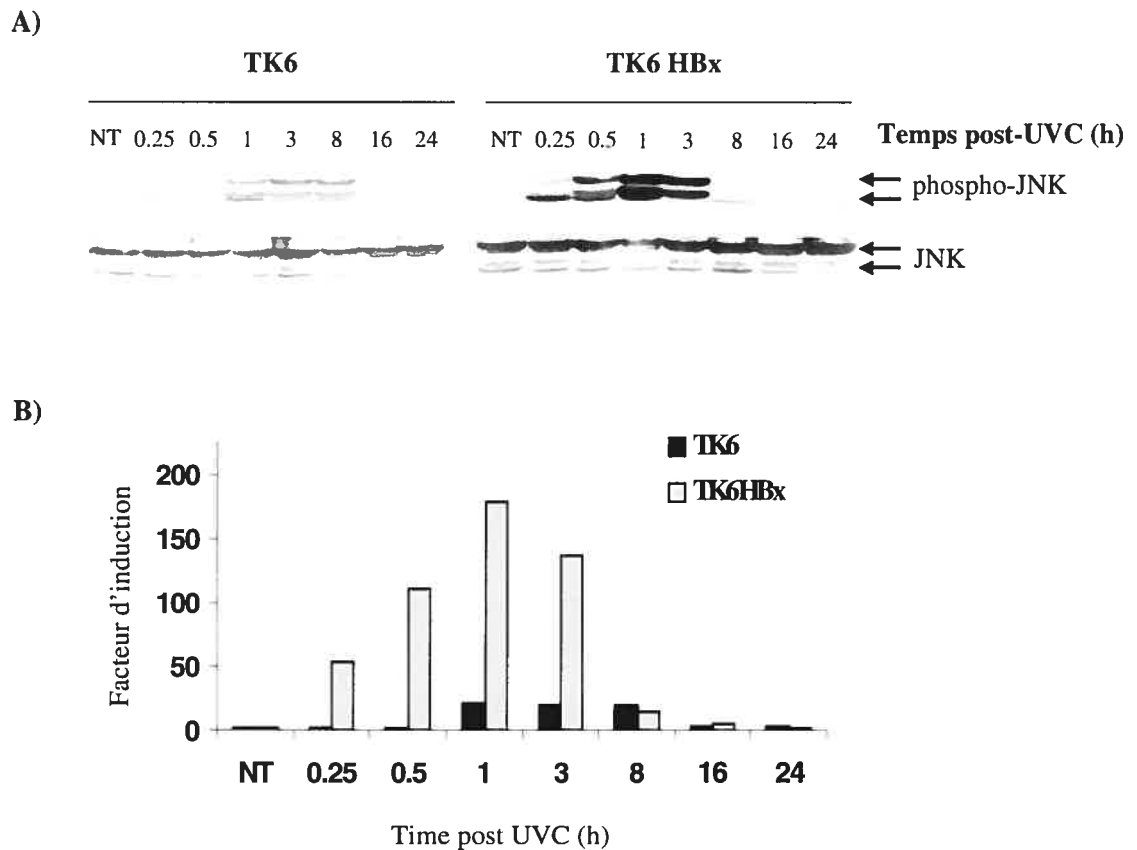


Figure 27. Analyse des niveaux de phosphorylation de JNK dans les cellules TK6 et TK6 HBx.

A) analyse par immunobuvardage de type western de la phosphorylation de JNK aux temps indiqués après irradiation avec 20 J/m^2 UVC 254nm. Les protéines extraites sont transférées sur une membrane PVDF (ImmobilonTM-P, Millipore), puis hybridées avec un anticorps primaire anti-phospho SAPK/JNK (Thr183/Tyr185, Cell Signaling Technology), et révélées par chimioluminescence grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. **B)** Quantification des données à l'aide du logiciel Alpha Imager (Alpha Innotech Corp).

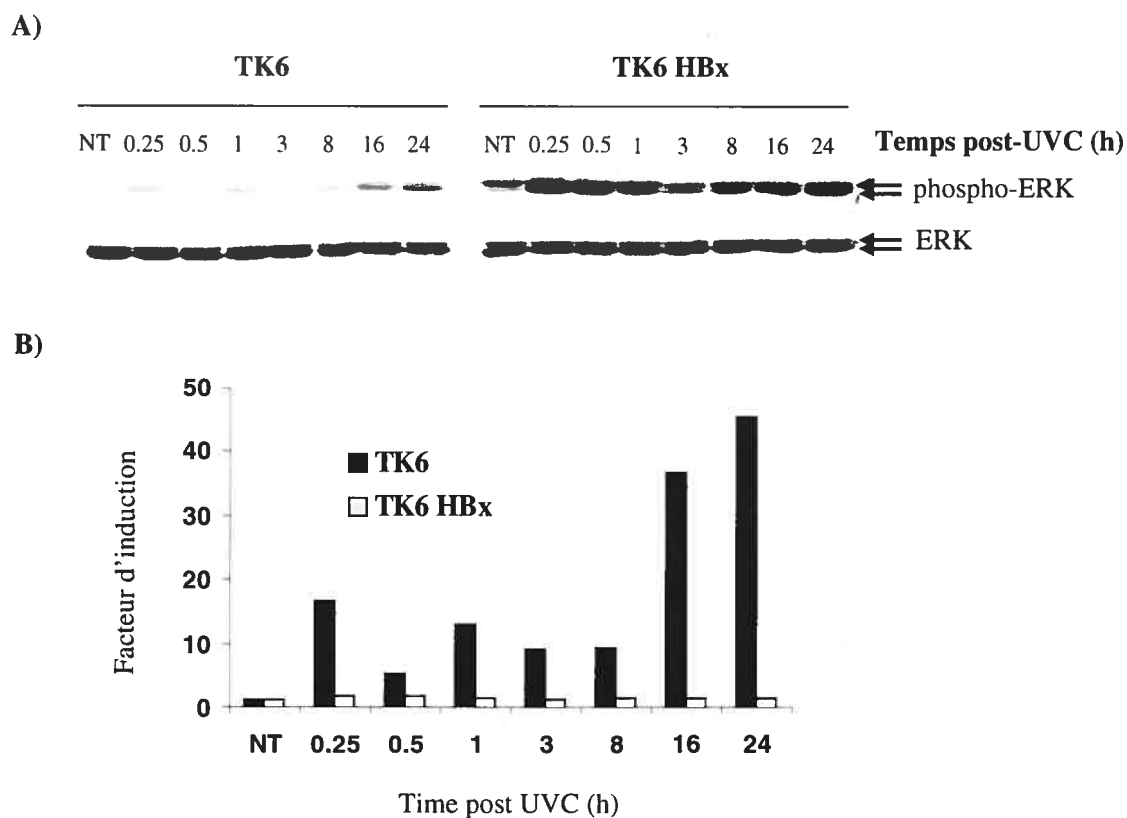


Figure 28. Analyse des niveaux de phosphorylation de ERK dans les cellules TK6 et TK6 HBx.

A) analyse par immunobuvardage de type western de la phosphorylation de ERK aux temps indiqués après irradiation avec 20 J/m^2 UVC 254nm. Les protéines extraites sont transférées sur une membrane PVDF (ImmobilonTM-P, Millipore), puis hybridées avec un anticorps primaire anti-phospho p44/p42 (Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology), et révélées par chimioluminescence grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. **B)** quantification des données à l'aide du logiciel Alpha Imager (Alpha Innotech Corp).

indépendante de p53. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de JNK, le SP600125, pourrait permettre de déterminer si cette hyperphosphorylation est responsable de l'inhibition de la voie TCNER par HBx. En effet, les divers mécanismes intracellulaires sont très finement régulés, et une perturbation de cet équilibre pourrait avoir des conséquences majeures, notamment au niveau de la réparation des dommages à l'ADN.

Outre son effet au niveau de la réparation de l'ADN et de l'apoptose, tels que démontrés dans l'article II, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la protéine HBx au niveau d'un autre mécanisme crucial de la réponse aux dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En effet, suite à une exposition aux radiations ionisantes, les cellules ayant une protéine p53 fonctionnelle vont arrêter leur cycle afin de permettre la réparation de leur ADN. Par contre, les cellules déficientes en p53 continueront leur cycle, permettant ainsi l'apparition de mutations menaçant l'intégrité du génome. Néanmoins, p53 ne serait pas impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à une irradiation aux UVC. Afin d'évaluer l'impact de la protéine HBx sur l'arrêt du cycle cellulaire, les cellules TK6 (p53 +/+) et NH32 (p53 -/-), exprimant ou non HBx ont été irradiées à des doses équitoxiques de 5 J/m² UVC 254nm et 150 rads d'IR. Les résultats obtenus présentés dans la figure 29 A) démontrent qu'après irradiation aux UVC les quatre lignées arrêtent leur cycle en G1 de façon similaire. Ces résultats confirment les études précédentes démontrant que p53 n'intervient pas dans l'arrêt en G1 après exposition des cellules aux UVC. De plus, HBx semblerait avoir soit aucun effet, soit un effet dépendant de p53, sur l'arrêt du cycle en G1 après irradiation avec 5 J/m² UVC 254nm. D'autre part, l'irradiation de ces mêmes lignées isogéniques avec 150 rads de rayons γ (figure 29 B)), entraîne un arrêt marqué du cycle cellulaire en G1 dans les cellules TK6, alors que, comme démontré dans des études précédentes, les cellules déficientes en p53 (NH32) ne procèdent pas à un arrêt de leur cycle. De plus, les cellules TK6 exprimant HBx ont un défaut dans l'arrêt de leur cycle cellulaire en G1. L'effet de la protéine HBx sur l'arrêt du cycle cellulaire en G1 semblerait être dépendant de p53 puisque les cellules NH32 HBx n'ont pas un défaut plus prononcé que les cellules NH32.

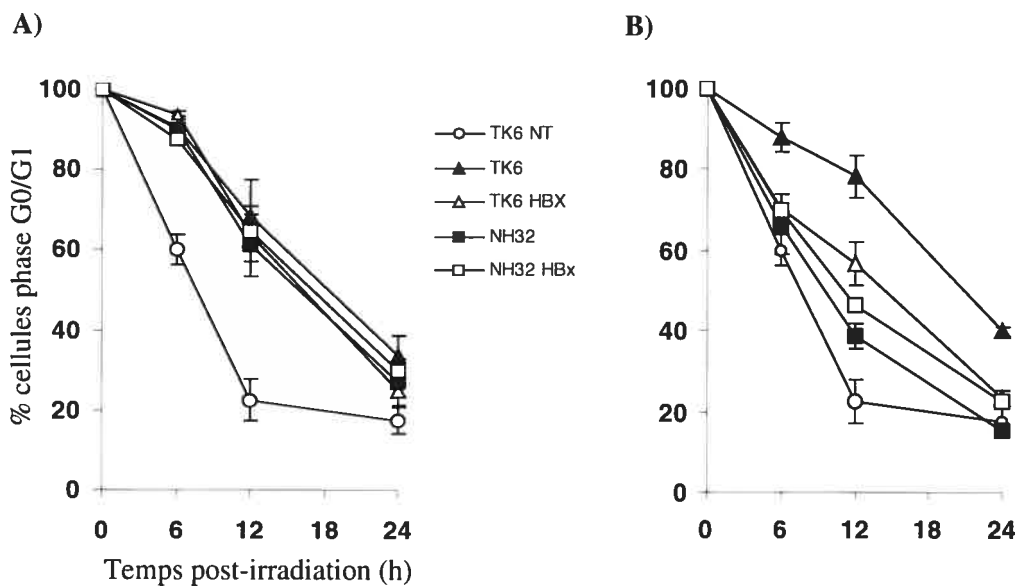


Figure 29. Pourcentage des cellules en phase G0/G1 après irradiation avec A) 5 J/m² UVC254nm ou B) 150 rads IR.

Après irradiation, les cellules sont récoltées puis fixées et finalement marquées au iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux. Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes lignées non traitées. NT : non traitées. Moyenne de six expériences indépendantes.

En conclusion, les travaux présentés dans cette thèse concernant l'élucidation du rôle de la protéine p53 dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides couplée à la transcription, ont permis de créer un lien entre les études précédentes aux résultats divergents. Notre étude a non seulement un impact direct sur la compréhension des mécanismes fondamentaux impliquant p53 en réponse aux dommages à l'ADN, mais a aussi permis de clairement déterminer que les UVC 254nm et les UVB polychromatiques génèrent des réponses cellulaires très différentes. Ainsi, ces travaux suggèrent qu'il serait beaucoup plus approprié d'employer un rayonnement de type UVB polychromatique plutôt que des lampes germicides générant des UVC, pour des études concernant l'impact environnemental des rayons UV sur diverses pathologies humaines, dont le cancer de la peau.

D'autre part, les données obtenues concernant l'impact de la protéine HBx sur les mécanismes cellulaires fondamentaux d'apoptose, d'arrêt du cycle cellulaire et de réparation de l'ADN ont permis, pour la première fois, de démontrer un rôle majeur de HBx dans la perturbation de ces mécanismes suite à des dommages à l'ADN. Ces résultats contribuent à mieux comprendre les mécanismes menant à la carcinogénèse hépatique chez les individus infectés par le virus de l'hépatite B. De plus, l'élucidation des mécanismes moléculaires exercés par HBx pourrait permettre l'élaboration de nouveaux traitements limitant les risques de développer des carcinomes hépatocellulaires chez ces mêmes patients

CHAPITRE V
RÉFÉRENCES

1. Tyrrell, R. M. and Pidoux, M. Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations. *Photochem Photobiol*, *49*: 407-412, 1989.
2. Tyrrell, R. M. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp*, *61*: 47-53, 1995.
3. Epstein, J. H. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol*, *9*: 487-502, 1983.
4. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays*, *18*: 221-228, 1996.
5. Sage, E. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol*, *57*: 163-174, 1993.
6. Pfeifer, G. P. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol*, *65*: 270-283, 1997.
7. Brash, D. E. and Havre, P. A. New careers for antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 13969-13971, 2002.
8. Mitchell, D. L., Haipek, C. A., and Clarkson, J. M. (6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res*, *143*: 109-112, 1985.
9. Nakagawa, A., Kobayashi, N., Muramatsu, T., Yamashina, Y., Shirai, T., Hashimoto, M. W., Ikenaga, M., and Mori, T. Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermatol*, *110*: 143-148, 1998.
10. Drobetsky, E. A. and Sage, E. UV-induced G:C-->A:T transitions at the APRT locus of Chinese hamster ovary cells cluster at frequently damaged 5'-TCC-3' sequences. *Mutat Res*, *289*: 131-138, 1993.
11. Mitchell, D. L. and Nairn, R. S. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol*, *49*: 805-819, 1989.

12. Drobetsky, E. A., Turcotte, J., and Chateauneuf, A. A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2350-2354, 1995.
13. Todd, P. A. and Glickman, B. W. Mutational specificity of UV light in *Escherichia coli*: indications for a role of DNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 4123-4127, 1982.
14. Brash, D. E. and Haseltine, W. A. UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature*, 298: 189-192, 1982.
15. Miller, J. H. Mutagenic specificity of ultraviolet light. *J Mol Biol*, 182: 45-65, 1985.
16. Sage, E., Lamolet, B., Brulay, E., Moustacchi, E., Chateauneuf, A., and Drobetsky, E. A. Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 176-180, 1996.
17. Tessman, I., Liu, S. K., and Kennedy, M. A. Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 1159-1163, 1992.
18. Brash, D. E. Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet*, 13: 410-414, 1997.
19. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., and Brash, D. E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372: 773-776, 1994.
20. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J., and Ponten, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10124-10128, 1991.
21. Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S., and Leffell, D. J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1: 136-142, 1996.
22. de Laat, J. M. and de Gruijl, F. R. The role of UVA in the aetiology of non-melanoma skin cancer. *Cancer Surv*, 26: 173-191, 1996.

23. Kraemer, K. H. Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*: 11-14, 1997.
24. Pathak, M. A. Ultraviolet radiation and the development of non-melanoma and melanoma skin cancer: clinical and experimental evidence. *Skin Pharmacol*, *4*: 85-94, 1991.
25. Gloster, H. M., Jr. and Brodland, D. G. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg*, *22*: 217-226, 1996.
26. Derrico, M., Calcagnile, A. S., Corona, R., Fucci, M., Annessi, G., Baliva, G., Tosti, M. E., Pasquini, P., and Dogliotti, E. P53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res*, *57*: 747-752, 1997.
27. Daya-Grosjean, L., Dumaz, N., and Sarasin, A. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol*, *28*: 115-124, 1995.
28. Hartmann, A., Blaszyk, H., Cunningham, J. S., McGovern, R. M., Schroeder, J. S., Helander, S. D., Pittelkow, M. R., Sommer, S. S., and Kovach, J. S. Overexpression and mutations of p53 in metastatic malignant melanomas. *Int J Cancer*, *67*: 313-317, 1996.
29. Moles, J. P., Moyret, C., Guillot, B., Jeanteur, P., Guilhou, J. J., Theillet, C., and Basset-Seguin, N. p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*, *8*: 583-588, 1993.
30. Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E., and et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*: 4216-4220., 1993.
31. Holbrook, N. J. and Fornace, A. J., Jr. Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol*, *3*: 825-833, 1991.
32. Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F., and Karin, M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol*, *11*: 2804-2811., 1991.

33. Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, 78: 963-972, 1994.
34. Coffey, P. J., Burgering, B. M., Peppelenbosch, M. P., Bos, J. L., and Kruijer, W. UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene*, 11: 561-569, 1995.
35. Rosette, C. and Karin, M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, 274: 1194-1197, 1996.
36. Karin, M. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann N Y Acad Sci*, 851: 139-146., 1998.
37. Chang, L. and Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410: 37-40, 2001.
38. Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369: 156-160, 1994.
39. Garrington, T. P. and Johnson, G. L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 211-218, 1999.
40. Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 76: 1025-1037, 1994.
41. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, 7: 2135-2148, 1993.
42. Huang, C., Ma, W. Y., and Dong, Z. The extracellular-signal-regulated protein kinases (Erks) are required for UV-induced AP-1 activation in JB6 cells. *Oncogene*, 18: 2828-2835, 1999.
43. Peus, D., Vasa, R. A., Beyerle, A., Meves, A., Krautmacher, C., and Pittelkow, M. R. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via

- reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, *112*: 751-756, 1999.
44. Huang, C., Ma, W. Y., Maxiner, A., Sun, Y., and Dong, Z. p38 Kinase Mediates UV-induced Phosphorylation of p53 Protein at Serine 389. *J Biol Chem*, *274*: 12229-12235, 1999.
 45. Le Panse, R., Dubertret, L., and Coulomb, B. p38 mitogen-activated protein kinase activation by ultraviolet A radiation in human dermal fibroblasts. *Photochem Photobiol*, *78*: 168-174, 2003.
 46. Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T., and Karin, M. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*, *71*: 1081-1091, 1992.
 47. Radler-Pohl, A., Sachsenmaier, C., Gebel, S., Auer, H. P., Bruder, J. T., Rapp, U., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *Embo J*, *12*: 1005-1012, 1993.
 48. Adler, V., Polotskaya, A., Kim, J., Dolan, L., Davis, R., Pincus, M., and Ronai, Z. Dose rate and mode of exposure are key factors in JNK activation by UV irradiation. *Carcinogenesis*, *17*: 2073-2076, 1996.
 49. Chen, Y. R., Shrivastava, A., and Tan, T. H. Down-regulation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase M3/6 and activation of JNK by hydrogen peroxide and pyrrolidine dithiocarbamate. *Oncogene*, *20*: 367-374, 2001.
 50. Huang, C., Li, J., Ding, M., Leonard, S. S., Wang, L., Castranova, V., Vallyathan, V., and Shi, X. UV Induces phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser-473 and Thr-308 in mouse epidermal Cl 41 cells through hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, *276*: 40234-40240, 2001.
 51. Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D., and Ronai, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, *18*: 6104-6111., 1999.
 52. Wood, R. D. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie*, *81*: 39-44, 1999.

53. Sarasin, A. R., Smith, C. A., and Hanawalt, P. C. Repair of DNA in human cells after treatment with activated aflatoxin B1. *Cancer Res*, *37*: 1786-1793, 1977.
54. Wood, R. D. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, *272*: 23465-23468, 1997.
55. Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M., and Wood, R. D. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, *80*: 859-868, 1995.
56. Hanawalt, P. C. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*, *21*: 8949-8956, 2002.
57. Bohr, V. A., Smith, C. A., Okumoto, D. S., and Hanawalt, P. C. 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*, *40*: 359-369, 1985.
58. Ford, J. M., Lommel, L., and Hanawalt, P. C. Preferential repair of ultraviolet light-induced DNA damage in the transcribed strand of the human p53 gene. *Mol Carcinog*, *10*: 105-109, 1994.
59. Hanawalt, P. C. Preferential DNA repair in expressed genes. *Environ Health Perspect*, *76*: 9-14, 1987.
60. Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, *51*: 241-249, 1987.
61. Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Hanaoka, F. HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol Cell Biol*, *16*: 4852-4861., 1996.
62. Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, *2*: 223-232., 1998.

63. Keeney, S., Chang, G. J., and Linn, S. Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E. *J Biol Chem*, 268: 21293-21300, 1993.
64. He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S., and Ingles, C. J. RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*, 374: 566-569, 1995.
65. Park, C. H., Mu, D., Reardon, J. T., and Sancar, A. The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor. *J Biol Chem*, 270: 4896-4902, 1995.
66. Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M., and Wood, R. D. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J*, 16: 6559-6573, 1997.
67. Wold, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, 66: 61-92, 1997.
68. de Boer, J., Donker, I., de Wit, J., Hoeijmakers, J. H., and Weeda, G. Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality. *Cancer Res*, 58: 89-94, 1998.
69. O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., and Wood, R. D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, 371: 432-435, 1994.
70. Sijbers, A. M., de Laat, W. L., Ariza, R. R., Biggerstaff, M., Wei, Y. F., Moggs, J. G., Carter, K. C., Shell, B. K., Evans, E., de Jong, M. C., Rademakers, S., de Rooij, J., Jaspers, N. G., Hoeijmakers, J. H., and Wood, R. D. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell*, 86: 811-822., 1996.
71. Shivji, M. K., Podust, V. N., Hubscher, U., and Wood, R. D. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry*, 34: 5011-5017, 1995.

72. Leadon, S. A. and Lawrence, D. A. Preferential repair of DNA damage on the transcribed strand of the human metallothionein genes requires RNA polymerase II. *Mutat Res*, 255: 67-78, 1991.
73. Venema, J., van Hoffen, A., Karcagi, V., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol Cell Biol*, 11: 4128-4134, 1991.
74. Mu, D. and Sancar, A. Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J Biol Chem*, 272: 7570-7573, 1997.
75. Donahue, B. A., Yin, S., Taylor, J. S., Reines, D., and Hanawalt, P. C. Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 8502-8506, 1994.
76. Henning, K. A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L. D., Reagan, M. S., Legerski, R., Schultz, R. A., Stefanini, M., Lehmann, A. R., Mayne, L. V., and et al. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell*, 82: 555-564, 1995.
77. Kraemer, K. H., De Weerd-Kastelein, E. A., Robbins, J. H., Keijzer, W., Barrett, S. F., Petinga, R. A., and Bootsma, D. Five complementation groups in xeroderma pigmentosum. *Mutat Res*, 33: 327-340, 1975.
78. Nance, M. A. and Berry, S. A. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet*, 42: 68-84., 1992.
79. Cooper, P. K., Nospikel, T., Clarkson, S. G., and Leadon, S. A. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science*, 275: 990-993, 1997.
80. Marionnet, C., Benoit, A., Benhamou, S., Sarasin, A., and Sary, A. Characteristics of UV-induced mutation spectra in human XP-D/ERCC2 gene-mutated xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy cells. *J Mol Biol*, 252: 550-562, 1995.

81. Lane, D. P. and Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278: 261-263, 1979.
82. Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, B., Givol, D., and Oren, M. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *Embo J*, 4: 1251-1255, 1985.
83. Jenkins, J. R., Rudge, K., and Currie, G. A. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 312: 651-654, 1984.
84. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, 312: 646-649, 1984.
85. Jenkins, J. R., Rudge, K., Chumakov, P., and Currie, G. A. The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature*, 317: 816-818, 1985.
86. Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A., and Benchimol, S. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature*, 314: 633-636, 1985.
87. Chow, V., Ben-David, Y., Bernstein, A., Benchimol, S., and Mowat, M. Multistage Friend erythroleukemia: independent origin of tumor clones with normal or rearranged p53 cellular oncogenes. *J Virol*, 61: 2777-2781, 1987.
88. Ben David, Y., Prideaux, V. R., Chow, V., Benchimol, S., and Bernstein, A. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene*, 3: 179-185, 1988.
89. Rovinski, B., Munroe, D., Peacock, J., Mowat, M., Bernstein, A., and Benchimol, S. Deletion of 5'-coding sequences of the cellular p53 gene in mouse erythroleukemia: a novel mechanism of oncogene regulation. *Mol Cell Biol*, 7: 847-853, 1987.
90. Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A., and Peacock, J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet*, 11: 505-510, 1985.

91. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, 320: 84-85, 1986.
92. McBride, O. W., Merry, D., and Givol, D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 130-134, 1986.
93. Soussi, T., Caron de Fromentel, C., Mechali, M., May, P., and Kress, M. Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*, 1: 71-78, 1987.
94. Soussi, T. and May, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*, 260: 623-637, 1996.
95. Lu, H. and Levine, A. J. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5154-5158, 1995.
96. Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R., and Tjian, R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, 267: 100-104, 1995.
97. Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature*, 365: 79-82, 1993.
98. Li, R. and Botchan, M. R. The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell*, 73: 1207-1221, 1993.
99. Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362: 857-860, 1993.
100. Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69: 1237-1245, 1992.
101. Thut, C. J., Goodrich, J. A., and Tjian, R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev*, 11: 1974-1986, 1997.

102. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387: 296-299, 1997.
103. Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7: 1126-1132, 1993.
104. Yew, P. R. and Berk, A. J. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, 357: 82-85, 1992.
105. Wang, X. W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M. A., Gu, J. R., and Harris, C. C. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 2230-2234, 1994.
106. Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., and Cromlish, J. A. Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol*, 69: 1851-1859, 1995.
107. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63: 1129-1136, 1990.
108. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1: 45-49, 1992.
109. Ruppert, J. M. and Stillman, B. Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol Cell Biol*, 13: 3811-3820, 1993.
110. Jenkins, J. R., Chumakov, P., Addison, C., Sturzbecher, H. W., and Wade-Evans, A. Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol*, 62: 3903-3906, 1988.
111. Iwabuchi, K., Bartel, P. L., Li, B., Marraccino, R., and Fields, S. Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 6098-6102, 1994.
112. Hainaut, P. and Milner, J. A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res*, 53: 1739-1742, 1993.

113. Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M., and Montenarh, M. Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol*, *62*: 4737-4744, 1988.
114. Pietsenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*: 1998-2002, 1994.
115. Hupp, T. R., Sparks, A., and Lane, D. P. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*, *83*: 237-245, 1995.
116. Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Strom, M., Groner, B., Grafstrom, R. C., and Wiman, K. G. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med*, *3*: 632-638, 1997.
117. Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., and et al. p53 modulation of TfiIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature Genetics*, *10*: 188-195, 1995.
118. Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, *12*: 2831-2841, 1998.
119. Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E., and Xie, D. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*, *36*: 10117-10124, 1997.
120. Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*, *12*: 921-930, 1996.
121. Maltzman, W. and Czyzyk, L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol*, *4*: 1689-1694, 1984.

122. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, *51*: 6304-6311, 1991.
123. Price, B. D. and Calderwood, S. K. Increased sequence-specific p53-DNA binding activity after DNA damage is attenuated by phorbol esters. *Oncogene*, *8*: 3055-3062, 1993.
124. Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. Dna Damage-Induced Phosphorylation Of P53 Alleviates Inhibition By Mdm2. *Cell*, *91*: 325-334, 1997.
125. Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *Embo J*, *18*: 1805-1814, 1999.
126. Kapoor, M. and Lozano, G. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 2834-2837, 1998.
127. Lu, H., Taya, Y., Ikeda, M., and Levine, A. J. Ultraviolet radiation, but not gamma radiation or etoposide-induced DNA damage, results in the phosphorylation of the murine p53 protein at serine-389. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 6399-6402, 1998.
128. Zhang, Y., Ma, W. Y., Kaji, A., Bode, A. M., and Dong, Z. Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem*, *277*: 3124-3131., 2002.
129. Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., and Kastan, M. B. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*, *11*: 3471-3481, 1997.
130. Lakin, N. D., Hann, B. C., and Jackson, S. P. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*, *18*: 3989-3995, 1999.
131. Unsal-Kacmaz, K., Makhov, A. M., Griffith, J. D., and Sancar, A. Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 6673-6678, 2002.

132. Artuso, M., Esteve, A., Bresil, H., Vuillaume, M., and Hall, J. The role of the Ataxia telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1(p21)- and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene*, *11*: 1427-1435, 1995.
133. Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., and Shkedy, D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 14973-14977, 1999.
134. Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E., and Oren, M. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*, *15*: 1067-1077., 2001.
135. Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T. D. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, *14*: 278-288, 2000.
136. Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S. J. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*: 10389-10394., 2000.
137. D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., and Soddu, S. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, *4*: 11-19, 2002.
138. Waterman, M. J., Stavridi, E. S., Waterman, J. L., and Halazonetis, T. D. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*, *19*: 175-178, 1998.
139. Gu, W. and Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, *90*: 595-606, 1997.
140. Liu, G., Schwartz, J. A., and Brooks, S. C. p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE [In Process Citation]. *Biochem Biophys Res Commun*, *264*: 359-364, 1999.

141. Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., and Kastan, M. B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 7491-7495, 1992.
142. Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597, 1992.
143. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, 8: 2540-2551, 1994.
144. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75: 817-825, 1993.
145. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82: 675-684, 1995.
146. Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A., and Xiong, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene*, 9: 2261-2268, 1994.
147. Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R. E., Lee, E. Y., Bradley, A., Li, W., Bertino, J. R., and Wahl, G. M. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5436-5440, 1995.
148. Suzuki-Takahashi, I., Kitagawa, M., Saijo, M., Higashi, H., Ogino, H., Matsumoto, H., Taya, Y., Nishimura, S., and Okuyama, A. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene*, 10: 1691-1698, 1995.
149. Dimri, G. P., Nakanishi, M., Desprez, P. Y., Smith, J. R., and Campisi, J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor

- p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, 16: 2987-2997, 1996.
150. Dulic, V., Stein, G. H., Far, D. F., and Reed, S. I. Nuclear accumulation of p21(Cip1) the onset of mitosis - a role at the G(2)/M-phase transition. *Mol Cell Biol*, 18: 546-557, 1998.
 151. Medema, R. H., Klompaker, R., Smits, V. A., and Rijksen, G. p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, 16: 431-441, 1998.
 152. Winters, Z. E., Ongkeko, W. M., Harris, A. L., and Norbury, C. J. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene*, 17: 673-684, 1998.
 153. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res*, 57: 3390-3394, 1997.
 154. Loignon, M. and Drobetsky, E. A. The initiation of UV-induced G(1) arrest in human cells is independent of the p53/p21/pRb pathway but can be attenuated through expression of the HPV E7 oncoprotein. *Carcinogenesis*, 23: 35-45., 2002.
 155. Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362: 849-852, 1993.
 156. Lotem, J. and Sachs, L. Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood*, 82: 1092-1096, 1993.
 157. Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., Kruzel, E., and et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*, 15: 3032-3040, 1995.

158. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, *9*: 1799-1805, 1994.
159. Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, *81*: 495-504, 1995.
160. Schulze-Osthoff, K., Krammer, P. H., and Droge, W. Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *Embo J*, *13*: 4587-4596, 1994.
161. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, *74*: 609-619, 1993.
162. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, *80*: 285-291, 1995.
163. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, *94*: 491-501, 1998.
164. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, *94*: 481-490, 1998.
165. Sheikh, M. S., Antinore, M. J., Huang, Y., and Fornace, A. J., Jr. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene*, *17*: 2555-2563, 1998.
166. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O. Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*, *10*: 1053-1059, 1995.

167. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem*, 272: 28073-28080, 1997.
168. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A. Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 15038-15043., 1999.
169. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8876-8880, 1995.
170. Scharer, O. D. and Jiricny, J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*, 23: 270-281, 2001.
171. Leadon, S. A. and Cooper, P. K. Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 10499-10503, 1993.
172. Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., and Prives, C. A role for p53 in base excision repair. *Embo J*, 20: 914-923., 2001.
173. Offer, H., Milyavsky, M., Erez, N., Matas, D., Zurer, I., Harris, C. C., and Rotter, V. Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene*, 20: 581-589., 2001.
174. Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R., and Smith, M. L. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene*, 21: 731-737., 2002.
175. Cabelof, D. C., Raffoul, J. J., Yanamadala, S., Guo, Z., and Heydari, A. R. Induction of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in response to oxidative stress in vivo. *Carcinogenesis*, 23: 1419-1425, 2002.
176. Le Page, F., Kwoh, E. E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S. A., Sarasin, A., and Cooper, P. K. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine:

requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell*, *101*: 159-171, 2000.

177. Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M., and Modrich, P. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*: 6443-6447, 1996.
178. Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R., and Essigmann, J. M. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol*, *3*: 579-589, 1996.
179. Ni, T. T., Marsischky, G. T., and Kolodner, R. D. MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, *4*: 439-444, 1999.
180. Luo, Y., Lin, F. T., and Lin, W. C. ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol Cell Biol*, *24*: 6430-6444, 2004.
181. Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R. D., and Wang, J. Y. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*: 2420-2425, 2003.
182. Lin, X., Ramamurthi, K., Mishima, M., Kondo, A., and Howell, S. B. p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol*, *58*: 1222-1229, 2000.
183. Gowen, L. C., Avrutskaya, A. V., Latour, A. M., Koller, B. H., and Leadon, S. A. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*, *281*: 1009-1012, 1998.
184. Hartman, A. R. and Ford, J. M. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet*, *32*: 180-184, 2002.

185. Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Bi, D., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, *16*: 1713-1721, 1998.
186. Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., and et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, *244*: 217-221, 1989.
187. Caron de Fromentel, C. and Soussi, T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, *4*: 1-15, 1992.
188. Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C. C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, *22*: 3551-3555, 1994.
189. Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., and et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, *342*: 705-708, 1989.
190. Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R., and Harris, C. C. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Research*, *24*: 141-146, 1996.
191. Milner, J., Medcalf, E. A., and Cook, A. C. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol*, *11*: 12-19, 1991.
192. Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A. J. Gain of function mutations in p53. *Nature Genetics*, *4*: 42-46, 1993.
193. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, *250*: 1233-1238, 1990.

194. Lavigueur, A., Maltby, V., Mock, D., Rossant, J., Pawson, T., and Bernstein, A. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol*, 9: 3982-3991, 1989.
195. Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356: 215-221, 1992.
196. Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A., and Donehower, L. A. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet*, 5: 225-229, 1993.
197. Purdie, C. A., Harrison, D. J., Peter, A., Dobbie, L., White, S., Howie, S. E., Salter, D. M., Bird, C. C., Wyllie, A. H., Hooper, M. L., and et al. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene*, 9: 603-609, 1994.
198. Bressac, B., Kew, M., Wands, J., and Ozturk, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350: 429-431., 1991.
199. Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358: 80-83, 1992.
200. Parkin, D. M., Bray, F. I., and Devesa, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 37 *Suppl* 8: S4-66, 2001.
201. Bosch, F. X., Ribes, J., and Borrás, J. Epidemiology of primary liver cancer. *Semin Liver Dis*, 19: 271-285, 1999.
202. Takano, S., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tagawa, M., and Omata, M. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. *Hepatology*, 21: 650-655, 1995.
203. Chu, C. M. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 15 *Suppl*: E25-30, 2000.

204. Buendia, M. A. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*, *10*: 185-200, 2000.
205. Debuire, B., Paterlini, P., Pontisso, P., Basso, G., and May, E. Analysis of the p53 gene in European hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*, *8*: 2303-2306, 1993.
206. Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J., and Harris, C. C. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature*, *350*: 427-428., 1991.
207. Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., Zucman-Rossi, J., Bayer, J., Perret, C., and Balabaud, C. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis
Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Gastroenterology*, *120*: 1763-1773, 2001.
208. Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey, E. A., and Essigmann, J. M. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *22*: 535-545, 2001.
209. Robens, J. F. and Richard, J. L. Aflatoxins in animal and human health. *Rev Environ Contam Toxicol*, *127*: 69-94, 1992.
210. Guengerich, F. P. Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch Biochem Biophys*, *409*: 59-71, 2003.
211. Essigmann, J. M., Croy, R. G., Nadzan, A. M., Busby, W. F., Jr., Reinhold, V. N., Buchi, G., and Wogan, G. N. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*: 1870-1874, 1977.
212. Groopman, J. D., Croy, R. G., and Wogan, G. N. In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*: 5445-5449, 1981.

213. Bailey, E. A., Iyer, R. S., Stone, M. P., Harris, T. M., and Essigmann, J. M. Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*: 1535-1539, 1996.
214. Smela, M. E., Hamm, M. L., Henderson, P. T., Harris, C. M., Harris, T. M., and Essigmann, J. M. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 6655-6660, 2002.
215. Croy, R. G. and Wogan, G. N. Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B1. *Cancer Res*, *41*: 197-203, 1981.
216. Ghebraniou, N., Knoll, B. J., Wu, H., Lozano, G., and Sell, S. Characterization of a murine p53ser246 mutant equivalent to the human p53ser249 associated with hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure. *Mol Carcinog*, *13*: 104-111., 1995.
217. Denissenko, M. F., Cahill, J., Koudriakova, T. B., Gerber, N., and Pfeifer, G. P. Quantitation and mapping of aflatoxin B1-induced DNA damage in genomic DNA using aflatoxin B1-8,9-epoxide and microsomal activation systems. *Mutat Res*, *425*: 205-211, 1999.
218. Riley, J., Mandel, H. G., Sinha, S., Judah, D. J., and Neal, G. E. In vitro activation of the human Harvey-ras proto-oncogene by aflatoxin B1. *Carcinogenesis*, *18*: 905-910, 1997.
219. Bos, J. L. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res*, *195*: 255-271, 1988.
220. Yu, F. L. Mechanism of aflatoxin B1 inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. *J Biol Chem*, *252*: 3245-3251, 1977.
221. Yu, F. L. Studies on the mechanism of aflatoxin B1 inhibition of rat liver nucleolar RNA synthesis. *J Biol Chem*, *256*: 3292-3297, 1981.
222. Leadon, S. A., Tyrrell, R. M., and Cerutti, P. A. Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res*, *41*: 5125-5129, 1981.

223. Alekseyev, Y. O., Hamm, M. L., and Essigmann, J. M. Aflatoxin B1 formamidopyrimidine adducts are preferentially repaired by the nucleotide excision repair pathway in vivo. *Carcinogenesis*, 2004.
224. Takahashi, Y., Nakatsuru, Y., Zhang, S., Shimizu, Y., Kume, H., Tanaka, K., Ide, F., and Ishikawa, T. Enhanced spontaneous and aflatoxin-induced liver tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice. *Carcinogenesis*, 23: 627-633, 2002.
225. Becker, S. A., Lee, T. H., Butel, J. S., and Slagle, B. L. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol*, 72: 266-272, 1998.
226. Jia, L., Wang, X. W., and Harris, C. C. Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *Int J Cancer*, 80: 875-879, 1999.
227. Prost, S., Ford, J. M., Taylor, C., Doig, J., and Harrison, D. J. Hepatitis B x protein inhibits p53-dependent DNA repair in primary mouse hepatocytes. *J Biol Chem*, 273: 33327-33332, 1998.
228. Johnson, W. W. and Guengerich, F. P. Reaction of aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide with DNA: kinetic analysis of covalent binding and DNA-induced hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 6121-6125, 1997.
229. Abe, K., Edamoto, Y., Park, Y. N., Nomura, A. M., Taltavull, T. C., Tani, M., and Thung, S. N. In situ detection of hepatitis B, C, and G virus nucleic acids in human hepatocellular carcinoma tissues from different geographic regions. *Hepatology*, 28: 568-572, 1998.
230. Ruiz, J., Sangro, B., Cuende, J. I., Beloqui, O., Riezu-Boj, J. I., Herrero, J. I., and Prieto, J. Hepatitis B and C viral infections in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 16: 637-641, 1992.
231. Yu, M. C., Tong, M. J., Coursaget, P., Ross, R. K., Govindarajan, S., and Henderson, B. E. Prevalence of hepatitis B and C viral markers in black and white patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst*, 82: 1038-1041, 1990.
232. Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., and Chen, D. S. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol*, 40: 1207-1209, 2002.

233. Tsubota, A., Arase, Y., Ren, F., Tanaka, H., Ikeda, K., and Kumada, H. Genotype may correlate with liver carcinogenesis and tumor characteristics in cirrhotic patients infected with hepatitis B virus subtype adw. *J Med Virol*, 65: 257-265, 2001.
234. Wang, J., Chenivresse, X., Henglein, B., and Brechot, C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 343: 555-557, 1990.
235. Wang, J., Zindy, F., Chenivresse, X., Lamas, E., Henglein, B., and Brechot, C. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 7: 1653-1656, 1992.
236. Hohne, M., Schaefer, S., Seifer, M., Feitelson, M. A., Paul, D., and Gerlich, W. H. Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA. *Embo J*, 9: 1137-1145, 1990.
237. Seifer, M., Hohne, M., Schaefer, S., and Gerlich, W. H. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol*, 13 Suppl 4: S61-65, 1991.
238. Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 351: 317-320, 1991.
239. Moriya, K., Fujie, H., Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Tsutsumi, T., Ishibashi, K., Matsuura, Y., Kimura, S., Miyamura, T., and Koike, K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med*, 4: 1065-1067, 1998.
240. Benvegna, L. and Alberti, A. Patterns of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus and hepatitis C virus related cirrhosis. *Antiviral Res*, 52: 199-207, 2001.
241. Koike, K., Kobayashi, M., Gondo, M., Hayashi, I., Osuga, T., and Takada, S. Hepatitis B virus DNA is frequently found in liver biopsy samples from hepatitis C virus-infected chronic hepatitis patients. *J Med Virol*, 54: 249-255, 1998.

242. Shibata, Y., Nakata, K., Tsuruta, S., Hamasaki, K., Hayashida, Y., Kato, Y., Nakao, K., and Eguchi, K. Detection of hepatitis B virus X-region DNA in liver tissue from patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis who subsequently developed hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, *14*: 1153-1156., 1999.
243. Villa, E., Grottola, A., Buttafoco, P., Colantoni, A., Bagni, A., Ferretti, I., Cremonini, C., Bertani, H., and Manenti, F. High doses of alpha-interferon are required in chronic hepatitis due to coinfection with hepatitis B virus and hepatitis C virus: long term results of a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol*, *96*: 2973-2977, 2001.
244. Jung, E. Y., Kang, H. K., Chang, J., Yu, D. Y., and Jang, K. L. Cooperative transformation of murine fibroblast NIH3T3 cells by hepatitis C virus core protein and hepatitis B virus X protein. *Virus Res*, *94*: 79-84, 2003.
245. Han, H. J., Jung, E. Y., Lee, W. J., and Jang, K. L. Cooperative repression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene expression by hepatitis B virus X protein and hepatitis C virus core protein. *FEBS Lett*, *518*: 169-172, 2002.
246. Pisani, P., Bray, F., and Parkin, D. M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*, *97*: 72-81, 2002.
247. Custer, B., Sullivan, S. D., Hazlet, T. K., Iloeje, U., Veenstra, D. L., and Kowdley, K. V. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol*, *38*: S158-168, 2004.
248. Beasley, R. P. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, *61*: 1942-1956, 1988.
249. Beasley, R. P. and Hwang, L. Y. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Semin Liver Dis*, *4*: 113-121, 1984.
250. Kane, M. Epidemiology of hepatitis B infection in North America. *Vaccine*, *13 Suppl 1*: S16-17, 1995.
251. Goudeau, A. and Dubois, F. Incidence and prevalence of hepatitis B in France. *Vaccine*, *13 Suppl 1*: S22-25, 1995.

252. Goudeau, A. Epidemiology and eradication strategy for hepatitis B in Europe. The European Regional Study Group. *Vaccine*, 8 *Suppl*: S113-116; discussion S134-118, 1990.
253. Tandon, B. N., Acharya, S. K., and Tandon, A. Epidemiology of hepatitis B virus infection in India. *Gut*, 38 *Suppl 2*: S56-59, 1996.
254. Edmunds, W. J., Medley, G. F., Nokes, D. J., O'Callaghan, C. J., Whittle, H. C., and Hall, A. J. Epidemiological patterns of hepatitis B virus (HBV) in highly endemic areas. *Epidemiol Infect*, 117: 313-325, 1996.
255. Kiire, C. F. The epidemiology and control of hepatitis B in sub-Saharan Africa. *Prog Med Virol*, 40: 141-156, 1993.
256. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visona, K. A., and Magnius, L. O. Genotype F prevails in HBV infected patients of hispanic origin in Central America and may carry the precore stop mutant. *J Med Virol*, 51: 305-312, 1997.
257. Norder, H., Courouce, A. M., and Magnius, L. O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 198: 489-503, 1994.
258. Guidotti, L. G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., and Chisari, F. V. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science*, 284: 825-829, 1999.
259. Jilbert, A. R., Wu, T. T., England, J. M., Hall, P. M., Carp, N. Z., O'Connell, A. P., and Mason, W. S. Rapid resolution of duck hepatitis B virus infections occurs after massive hepatocellular involvement. *J Virol*, 66: 1377-1388, 1992.
260. Kajino, K., Jilbert, A. R., Saputelli, J., Aldrich, C. E., Cullen, J., and Mason, W. S. Woodchuck hepatitis virus infections: very rapid recovery after a prolonged viremia and infection of virtually every hepatocyte. *J Virol*, 68: 5792-5803, 1994.
261. Servoss, J. C. and Friedman, L. S. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis*, 8: 267-281, 2004.

262. Guidotti, L. G., Guilhot, S., and Chisari, F. V. Interleukin-2 and alpha/beta interferon down-regulate hepatitis B virus gene expression in vivo by tumor necrosis factor-dependent and -independent pathways. *J Virol*, 68: 1265-1270, 1994.
263. Brassard, D. L., Grace, M. J., and Bordens, R. W. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol*, 71: 565-581, 2002.
264. Aman, M. J., Tretter, T., Eisenbeis, I., Bug, G., Decker, T., Aulitzky, W. E., Tilg, H., Huber, C., and Peschel, C. Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4+ T cells and monocytes. *Blood*, 87: 4731-4736, 1996.
265. Allen, M. I., Deslauriers, M., Andrews, C. W., Tipples, G. A., Walters, K. A., Tyrrell, D. L., Brown, N., and Condey, L. D. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology*, 27: 1670-1677, 1998.
266. Bartholomew, M. M., Jansen, R. W., Jeffers, L. J., Reddy, K. R., Johnson, L. C., Bunzendahl, H., Condey, L. D., Tzakis, A. G., Schiff, E. R., and Brown, N. A. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet*, 349: 20-22, 1997.
267. Ling, R., Mutimer, D., Ahmed, M., Boxall, E. H., Elias, E., Dusheiko, G. M., and Harrison, T. J. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology*, 24: 711-713, 1996.
268. Nowak, M. A., Bonhoeffer, S., Hill, A. M., Boehme, R., Thomas, H. C., and McDade, H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 4398-4402, 1996.
269. Brechot, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B., and Tiollais, P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286: 533-535, 1980.
270. Chakraborty, P. R., Ruiz-Opazo, N., Shouval, D., and Shafritz, D. A. Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral

- RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature*, 286: 531-533, 1980.
271. Edman, J. C., Gray, P., Valenzuela, P., Rall, L. B., and Rutter, W. J. Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature*, 286: 535-538, 1980.
272. Yoffe, B., Burns, D. K., Bhatt, H. S., and Combes, B. Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology*, 12: 187-192, 1990.
273. Mason, A., Wick, M., White, H., and Perrillo, R. Hepatitis B virus replication in diverse cell types during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 18: 781-789, 1993.
274. Stoll-Becker, S., Repp, R., Glebe, D., Schaefer, S., Kreuder, J., Kann, M., Lampert, F., and Gerlich, W. H. Transcription of hepatitis B virus in peripheral blood mononuclear cells from persistently infected patients. *J Virol*, 71: 5399-5407, 1997.
275. Liang, R. H., Lok, A. S., Lai, C. L., Chan, T. K., Todd, D., and Chiu, E. K. Hepatitis B infection in patients with lymphomas. *Hematol Oncol*, 8: 261-270, 1990.
276. Kumagai, K., Takagi, T., Nakamura, S., Sawada, U., Kura, Y., Kodama, F., Shimano, S., Kudoh, I., Nakamura, H., Sawada, K., and Ohnoshi, T. Hepatitis B virus carriers in the treatment of malignant lymphoma: an epidemiological study in Japan. *Ann Oncol*, 8 Suppl 1: 107-109, 1997.
277. Cucuianu, A., Patiu, M., Duma, M., Basarab, C., Soritau, O., Bojan, A., Vasilache, A., Mates, M., and Petrov, L. Hepatitis B and C virus infection in Romanian non-Hodgkin's lymphoma patients. *Br J Haematol*, 107: 353-356, 1999.
278. Kuniyoshi, M., Nakamuta, M., Sakai, H., Enjoji, M., Kinukawa, N., Kotoh, K., Fukutomi, M., Yokota, M., Nishi, H., Iwamoto, H., Uike, N., Nishimura, J., Inaba, S., Maeda, Y., Nawata, H., and Muta, K. Prevalence of hepatitis B or C virus infections in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 16: 215-219, 2001.

279. Kim, J. H., Bang, Y. J., Park, B. J., Yoo, T., Kim, C. W., Kim, T. Y., Heo, D. S., Lee, H. S., and Kim, N. K. Hepatitis B virus infection and B-cell non-Hodgkin's lymphoma in a hepatitis B endemic area: a case-control study. *Jpn J Cancer Res*, *93*: 471-477, 2002.
280. Moss, B., Smith, G. L., Gerin, J. L., and Purcell, R. H. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature*, *311*: 67-69, 1984.
281. Slusarczyk, J. Vaccination against hepatitis viruses in Poland. *Vaccine*, *19*: 2384-2388, 2001.
282. Lanphear, B. P., Linnemann, C. C., Jr., Cannon, C. G., and DeRonde, M. M. Decline of clinical hepatitis B in workers at a general hospital: relation to increasing vaccine-induced immunity. *Clin Infect Dis*, *16*: 10-14, 1993.
283. Chen, C. J., Wang, L. Y., and Yu, M. W. Epidemiology of hepatitis B virus infection in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*, *15 Suppl*: E3-6, 2000.
284. Hadchouel, M., Pasquinelli, C., Fournier, J. G., Hugon, R. N., Scotto, J., Bernard, O., and Brechot, C. Detection of mononuclear cells expressing hepatitis B virus in peripheral blood from HBsAg positive and negative patients by in situ hybridisation. *J Med Virol*, *24*: 27-32, 1988.
285. Halpern, M. S., England, J. M., Deery, D. T., Petcu, D. J., Mason, W. S., and Molnar-Kimber, K. L. Viral nucleic acid synthesis and antigen accumulation in pancreas and kidney of Pekin ducks infected with duck hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *80*: 4865-4869, 1983.
286. Korba, B. E., Cote, P. J., Shapiro, M., Purcell, R. H., and Gerin, J. L. In vitro production of infectious woodchuck hepatitis virus by lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood lymphocytes. *J Infect Dis*, *160*: 572-576, 1989.
287. Nicoll, A. J., Angus, P. W., Chou, S. T., Luscombe, C. A., Smallwood, R. A., and Locarnini, S. A. Demonstration of duck hepatitis B virus in bile duct epithelial cells: implications for pathogenesis and persistent infection. *Hepatology*, *25*: 463-469, 1997.

288. Pontisso, P., Poon, M. C., Tiollais, P., and Brechot, C. Detection of hepatitis B virus DNA in mononuclear blood cells. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 288: 1563-1566, 1984.
289. Shimoda, T., Shikata, T., Karasawa, T., Tsukagoshi, S., Yoshimura, M., and Sakurai, I. Light microscopic localization of hepatitis B virus antigens in the human pancreas. Possibility of multiplication of hepatitis B virus in the human pancreas. *Gastroenterology*, 81: 998-1005, 1981.
290. Yoffe, B., Noonan, C. A., Melnick, J. L., and Hollinger, F. B. Hepatitis B virus DNA in mononuclear cells and analysis of cell subsets for the presence of replicative intermediates of viral DNA. *J Infect Dis*, 153: 471-477, 1986.
291. Nassal, M. and Schaller, H. Hepatitis B virus replication--an update. *J Viral Hepat*, 3: 217-226, 1996.
292. Summers, J. and Mason, W. S. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29: 403-415, 1982.
293. Tuttleman, J. S., Pourcel, C., and Summers, J. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 47: 451-460, 1986.
294. Newbold, J. E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S., and Locarnini, S. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol*, 69: 3350-3357, 1995.
295. Gerelsaikhan, T., Tavis, J. E., and Bruss, V. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol*, 70: 4269-4274, 1996.
296. Ganem, D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol*, 168: 61-83, 1991.
297. Robinson, W. S. and Lutwick, L. I. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med*, 295: 1168-1175, 1976.

298. Klingmuller, U. and Schaller, H. Hepadnavirus infection requires interaction between the viral pre-S domain and a specific hepatocellular receptor. *J Virol*, *67*: 7414-7422, 1993.
299. Bruss, V. and Ganem, D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*: 1059-1063, 1991.
300. Takahashi, K., Machida, A., Funatsu, G., Nomura, M., Usuda, S., Aoyagi, S., Tachibana, K., Miyamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol*, *130*: 2903-2907, 1983.
301. Bavand, M. R. and Laub, O. Two proteins with reverse transcriptase activities associated with hepatitis B virus-like particles. *J Virol*, *62*: 626-628, 1988.
302. Bartenschlager, R., Junker-Niepmann, M., and Schaller, H. The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol*, *64*: 5324-5332, 1990.
303. Zoulim, F., Saputelli, J., and Seeger, C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*, *68*: 2026-2030, 1994.
304. Schuster, R., Hildt, E., Chang, S. F., Terradillos, O., Pollicino, T., Lanford, R., Gerlich, W. H., Will, H., and Schaefer, S. Conserved transactivating and pro-apoptotic functions of hepadnaviral X protein in ortho- and avihepadnaviruses. *Oncogene*, *21*: 6606-6613, 2002.
305. Gupta, A., Mal, T. K., Jayasuryan, N., and Chauhan, V. S. Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun*, *212*: 919-924, 1995.
306. Kumar, V., Jayasuryan, N., and Kumar, R. A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*: 5647-5652, 1996.
307. Misra, K. P., Mukherji, A., and Kumar, V. The conserved amino-terminal region (amino acids 1-20) of the hepatitis B virus X protein shows a transrepression function. *Virus Res*, *105*: 157-165, 2004.

308. Jackson, S. P. and Tjian, R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, 55: 125-133, 1988.
309. Lee, Y. I., Kim, S. O., Kwon, H. J., Park, J. G., Sohn, M. J., and Jeong, S. S. Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro. *J Virol Methods*, 95: 1-10, 2001.
310. Sirma, H., Weil, R., Rosmorduc, O., Urban, S., Israel, A., Kremsdorf, D., and Brechot, C. Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene*, 16: 2051-2063, 1998.
311. Doria, M., Klein, N., Lucito, R., and Schneider, R. J. The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *Embo J*, 14: 4747-4757, 1995.
312. Henkler, F., Hoare, J., Waseem, N., Goldin, R. D., McGarvey, M. J., Koshy, R., and King, I. A. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 82: 871-882, 2001.
313. Rahmani, Z., Huh, K. W., Lasher, R., and Siddiqui, A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J Virol*, 74: 2840-2846, 2000.
314. Song, C. Z., Bai, Z. L., Song, C. C., and Wang, Q. W. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol*, 9: 1521-1524, 2003.
315. Takada, S., Shirakata, Y., Kaneniwa, N., and Koike, K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. *Oncogene*, 18: 6965-6973, 1999.
316. Yen, T. S. Hepadnaviral X Protein: Review of Recent Progress. *J Biomed Sci*, 3: 20-30, 1996.

317. Zhu, M., London, W. T., Duan, L. X., and Feitelson, M. A. The value of hepatitis B x antigen as a prognostic marker in the development of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 55: 571-576, 1993.
318. Wang, J. H., Yun, C., Kim, S., Lee, J. H., Yoon, G., Lee, M. O., and Cho, H. Reactive oxygen species modulates the intracellular level of HBx viral oncoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 32-39, 2003.
319. Renner, M., Haniel, A., Burgelt, E., Hofschneider, P. H., and Koch, W. Transactivating function and expression of the x gene of hepatitis B virus. *J Hepatol*, 23: 53-65., 1995.
320. Andrisani, O. M. and Barnabas, S. The transcriptional function of the hepatitis B virus X protein and its role in hepatocarcinogenesis (Review). *Int J Oncol*, 15: 373-379, 1999.
321. Lin, Y., Tang, H., Nomura, T., Dorjsuren, D., Hayashi, N., Wei, W., Ohta, T., Roeder, R., and Murakami, S. The hepatitis B virus X protein is a co-activator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem*, 273: 27097-27103, 1998.
322. Shirakata, Y., Kawada, M., Fujiki, Y., Sano, H., Oda, M., Yaginuma, K., Kobayashi, M., and Koike, K. The X gene of hepatitis B virus induced growth stimulation and tumorigenic transformation of mouse NIH3T3 cells. *Jpn J Cancer Res*, 80: 617-621, 1989.
323. Yu, D. Y., Moon, H. B., Son, J. K., Jeong, S., Yu, S. L., Yoon, H., Han, Y. M., Lee, C. S., Park, J. S., Lee, C. H., Hyun, B. H., Murakami, S., and Lee, K. K. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol*, 31: 123-132, 1999.
324. Koike, K., Moriya, K., Iino, S., Yotsuyanagi, H., Endo, Y., Miyamura, T., and Kurokawa, K. High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology*, 19: 810-819., 1994.
325. Klein, A., Guhl, E., Tzeng, Y. J., Fuhrhop, J., Levrero, M., Graessmann, M., and Graessmann, A. HBX causes cyclin D1 overexpression and development of breast cancer in transgenic animals that are heterozygous for p53. *Oncogene*, 22: 2910-2919, 2003.

326. Capovilla, A., Carmona, S., and Arbuthnot, P. Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 232: 255-260, 1997.
327. Madden, C. R., Finegold, M. J., and Slagle, B. L. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol*, 76: 11770-11774, 2002.
328. Madden, C. R., Finegold, M. J., and Slagle, B. L. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol*, 75: 3851-3858, 2001.
329. Madden, C. R., Finegold, M. J., and Slagle, B. L. Expression of hepatitis B virus X protein does not alter the accumulation of spontaneous mutations in transgenic mice. *J Virol*, 74: 5266-5272, 2000.
330. Sohn, S., Jaitovitch-Groisman, I., Benlimame, N., Galipeau, J., Batist, G., and Alaoui-Jamali, M. A. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat Res*, 460: 17-28, 2000.
331. Feitelson, M. A., Zhu, M., Duan, L. X., and London, W. T. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 8: 1109-1117, 1993.
332. You, L. R., Chen, C. M., and Lee, Y. H. Hepatitis C virus core protein enhances NF-kappaB signal pathway triggering by lymphotoxin-beta receptor ligand and tumor necrosis factor alpha. *J Virol*, 73: 1672-1681, 1999.
333. Hiscott, J., Kwon, H., and Genin, P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, 107: 143-151, 2001.
334. Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16: 225-260, 1998.
335. Rayet, B. and Gelinas, C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18: 6938-6947, 1999.
336. Barkett, M. and Gilmore, T. D. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18: 6910-6924, 1999.

337. Tai, D. I., Tsai, S. L., Chang, Y. H., Huang, S. N., Chen, T. C., Chang, K. S., and Liaw, Y. F. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 89: 2274-2281, 2000.
338. Su, F. and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol*, 70: 4558-4566, 1996.
339. Kim, W. H., Hong, F., Jaruga, B., Hu, Z., Fan, S., Liang, T. J., and Gao, B. Additive activation of hepatic NF-kappaB by ethanol and hepatitis B protein X (HBX) or HCV core protein: involvement of TNF-alpha receptor 1-independent and -dependent mechanisms. *Faseb J*, 15: 2551-2553, 2001.
340. Weil, R., Sirma, H., Giannini, C., Kremsdorf, D., Bessia, C., Dargemont, C., Brechot, C., and Israel, A. Direct association and nuclear import of the hepatitis B virus X protein with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Mol Cell Biol*, 19: 6345-6354, 1999.
341. Ohata, K., Ichikawa, T., Nakao, K., Shigeno, M., Nishimura, D., Ishikawa, H., Hamasaki, K., and Eguchi, K. Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *FEBS Lett*, 553: 304-308, 2003.
342. Waris, G., Huh, K. W., and Siddiqui, A. Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 21: 7721-7730, 2001.
343. Majano, P., Lara-Pezzi, E., Lopez-Cabrera, M., Apolinario, A., Moreno-Otero, R., and Garcia-Monzon, C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappaB-binding site: evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology*, 34: 1218-1224, 2001.
344. Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F., and Ahn, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, 265: 966-970, 1994.

345. Ito, Y., Sasaki, Y., Horimoto, M., Wada, S., Tanaka, Y., Kasahara, A., Ueki, T., Hirano, T., Yamamoto, H., Fujimoto, J., Okamoto, E., Hayashi, N., and Hori, M. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 27: 951-958, 1998.
346. Huynh, H., Nguyen, T. T., Chow, K. H., Tan, P. H., Soo, K. C., and Tran, E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: Its role in tumor progression and apoptosis. *BMC Gastroenterol*, 3: 19, 2003.
347. Oka, H., Chatani, Y., Hoshino, R., Ogawa, O., Kakehi, Y., Terachi, T., Okada, Y., Kawaichi, M., Kohno, M., and Yoshida, O. Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 55: 4182-4187, 1995.
348. Ostrowski, J., Woszczyński, M., Kowalczyk, P., Wocial, T., Hennig, E., Trzeciak, L., Janik, P., and Bomszyk, K. Increased activity of MAP, p70S6 and p90rs kinases is associated with AP-1 activation in spontaneous liver tumours, but not in adjacent tissue in mice. *Br J Cancer*, 82: 1041-1050, 2000.
349. Benn, J. and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 10350-10354, 1994.
350. Benn, J. and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 11215-11219, 1995.
351. Henkler, F., Lopes, A. R., Jones, M., and Koshy, R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol*, 79 (Pt 11): 2737-2742, 1998.
352. Menzo, S., Clementi, M., Alfani, E., Bagnarelli, P., Iacovacci, S., Manzin, A., Dandri, M., Natoli, G., Levrero, M., and Carloni, G. Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. *Virology*, 196: 878-882, 1993.

353. Kim, J. H. and Rho, H. M. Activation of the human transforming growth factor alpha (TGF-alpha) gene by the hepatitis B viral X protein (HBx) through AP-2 sites. *Mol Cell Biochem*, 231: 155-161, 2002.
354. Kekule, A. S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B., and Hofschneider, P. H. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature*, 361: 742-745, 1993.
355. Kang-Park, S., Lee, J. H., Shin, J. H., and Lee, Y. I. Activation of the IGF-II gene by HBV-X protein requires PKC and p44/p42 map kinase signalings. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 303-307, 2001.
356. Benn, J., Su, F., Doria, M., and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Virol*, 70: 4978-4985, 1996.
357. Diao, J., Khine, A. A., Sarangi, F., Hsu, E., Iorio, C., Tibbles, L. A., Woodgett, J. R., Penninger, J., and Richardson, C. D. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*, 276: 8328-8340, 2001.
358. Nijhara, R., Jana, S. S., Goswami, S. K., Kumar, V., and Sarkar, D. P. An internal segment (residues 58-119) of the hepatitis B virus X protein is sufficient to activate MAP kinase pathways in mouse liver. *FEBS Lett*, 504: 59-64, 2001.
359. Elmore, L. W., Hancock, A. R., Chang, S. F., Wang, X. W., Chang, S., Callahan, C. P., Geller, D. A., Will, H., and Harris, C. C. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 14707-14712, 1997.
360. Wang, X. W., Gibson, M. K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Sturzbecher, H. W., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*, 55: 6012-6016, 1995.
361. Ahn, J. Y., Jung, E. Y., Kwun, H. J., Lee, C. W., Sung, Y. C., and Jang, K. L. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle

- control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol*, 83: 2765-2772, 2002.
362. Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoeur, H., Tripodi, M., Gougeon, M. L., Tiollais, P., and Buendia, M. A. p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus HBx protein in vivo and in vitro. *Oncogene*, 17: 2115-2123, 1998.
363. Ahn, J. Y., Chung, E. Y., Kwun, H. J., and Jang, K. L. Transcriptional repression of p21(waf1) promoter by hepatitis B virus X protein via a p53-independent pathway. *Gene*, 275: 163-168, 2001.
364. Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem*, 273: 381-385, 1998.
365. Shirakata, Y. and Koike, K. Hepatitis B virus x protein induces cell death by causing loss of mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*, 278: 22071-22078, 2003.
366. Gottlob, K., Fulco, M., Levrero, M., and Graessmann, A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem*, 273: 33347-33353, 1998.
367. Lee, Y. I., Kang-Park, S., and Do, S. I. The Hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem*, 1: 1, 2001.
368. Bouchard, M., Giannakopoulos, S., Wang, E. H., Tanese, N., and Schneider, R. J. Hepatitis B virus HBx protein activation of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complexes and G1 transit via a Src kinase pathway. *J Virol*, 75: 4247-4257, 2001.
369. Jaitovich-Groisman, I., Benlimame, N., Slagle, B. L., Perez, M. H., Alpert, L., Song, D. J., Fotouhi-Ardakani, N., Galipeau, J., and Alaoui-Jamali, M. A. Transcriptional regulation of the TFIIH transcription repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *J Biol Chem*, 276: 14124-14132, 2001.
370. Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K., and Murakami, S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates

with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem*, 272: 7132-7139, 1997.

371. Qadri, I., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Schaack, J., and Siddiqui, A. Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIH and stimulates the DNA helicase activity of TFIIH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 10578-10583, 1996.
372. Groisman, I. J., Koshy, R., Henkler, F., Groopman, J. D., and Alaoui-Jamali, M. A. Downregulation of DNA excision repair by the hepatitis B virus-x protein occurs in p53-proficient and p53-deficient cells. *Carcinogenesis*, 20: 479-483, 1999.
373. You, Y. H., Lee, D. H., Yoon, J. H., Nakajima, S., Yasui, A., and Pfeifer, G. P. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J Biol Chem*, 276: 44688-44694., 2001.
374. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Role of DNA excision repair gene defects in the etiology of cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 221: 47-70, 1997.
375. Kraemer, K. H., Lee, M. M., and Scotto, J. DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis*, 5: 511-514., 1984.
376. Svejstrup, J. Q. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 21-29., 2002.
377. Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A., and Mayne, L. V. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 4707-4711, 1990.
378. Jonason, A. S., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R. J., Spinelli, H. M., Persing, J. A., Leffell, D. J., Tarone, R. E., and Brash, D. E. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14025-14029, 1996.
379. Ford, J. M., Baron, E. L., and Hanawalt, P. C. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide

- excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res*, 58: 599-603, 1998.
380. Adimoolam, S., Lin, C. X., and Ford, J. M. The p53-Regulated Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for Global Genomic and Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair of UV-Induced DNA Photoproducts. *J Biol Chem*, 30: 30, 2001.
381. Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C., and Fornace, A. J., Jr. p53-Mediated DNA Repair Responses to UV Radiation: Studies of Mouse Cells Lacking p53, p21, and/or gadd45 Genes. *Mol Cell Biol*, 20: 3705-3714, 2000.
382. Wani, M. A., Zhu, Q., El-Mahdy, M., Venkatachalam, S., and Wani, A. A. Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells. *Cancer Res*, 60: 2273-2280, 2000.
383. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 424-428, 1999.
384. Adimoolam, S. and Ford, J. M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 12985-12990, 2002.
385. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 404: 42-49, 2000.
386. McKay, B. C., Francis, M. A., and Rainbow, A. J. Wildtype p53 is required for heat shock and ultraviolet light enhanced repair of a UV-damaged reporter gene. *Carcinogenesis*, 18: 245-249, 1997.
387. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A. Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb

- function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 15038-15043, 1999.
388. Tyrrell, R. M. UV activation of mammalian stress proteins. *Exs*, *77*: 255-271, 1996.
389. Abarzua, P., Losardo, J. E., Gubler, M. L., Spathis, R., Lu, Y. A., Felix, A., and Neri, A. Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene*, *13*: 2477-2482, 1996.
390. Abbott, D. W., Freeman, M. L., and Holt, J. T. Double-strand break repair deficiency and radiation sensitivity in BRCA2 mutant cancer cells [see comments]. *J Natl Cancer Inst*, *90*: 978-985, 1998.
391. Abdullah, A. N. and Keczkcs, K. Cutaneous and ocular side-effects of PUVA photochemotherapy--a 10-year follow-up study. *Clin Exp Dermatol*, *14*: 421-424, 1989.
392. Tu, Y., Tornaletti, S., and Pfeifer, G. P. DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *Embo J*, *15*: 675-683, 1996.
393. Rozek, D. and Pfeifer, G. P. In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol Cell Biol*, *13*: 5490-5499, 1993.
394. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*: 1374-1378, 1991.
395. Rochette, P. J., Bastien, N., McKay, B. C., Therrien, J. P., Drobetsky, E. A., and Drouin, R. Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes hMLH1 or hMSH2 are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Oncogene*, *21*: 5743-5752., 2002.
396. Leger, C. and Drobetsky, E. A. Modulation of the DNA damage response in UV-exposed human lymphoblastoid cells through genetic-versus functional-

- inactivation of the p53 tumor suppressor. *Carcinogenesis*, *23*: 1631-1640, 2002.
397. Chuang, Y. Y., Chen, Q., and Liber, H. L. Radiation-induced mutations at the autosomal thymidine kinase locus are not elevated in p53-null cells. *Cancer Res*, *59*: 3073-3076, 1999.
398. Yu, Y., Li, C. Y., and Little, J. B. Abrogation of p53 function by HPV16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells. *Oncogene*, *14*: 1661-1667, 1997.
399. Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol*, *37*: 1-17, 1997.
400. Gjerset, R. A., Lebedeva, S., Haghghi, A., Turla, S. T., and Mercola, D. Inhibition of the Jun kinase pathway blocks DNA repair, enhances p53-mediated apoptosis and promotes gene amplification. *Cell Growth Differ*, *10*: 545-554, 1999.
401. Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R., and Mercola, D. The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J Biol Chem*, *272*: 14041-14044, 1997.
402. Dhar, V., Adler, V., Lehmann, A., and Ronai, Z. Impaired jun-NH2-terminal kinase activation by ultraviolet irradiation in fibroblasts of patients with Cockayne syndrome complementation group B. *Cell Growth Differ*, *7*: 841-846, 1996.
403. Adler, V., Fuchs, S. Y., Kim, J., Kraft, A., King, M. P., Pelling, J., and Ronai, Z. jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell Growth Differ*, *6*: 1437-1446, 1995.
404. Medrano, E. E., Im, S., Yang, F., and Abdel-Malek, Z. A. Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein. *Cancer Res*, *55*: 4047-4052, 1995.

405. Dhanwada, K. R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R., and Pelling, J. C. Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene*, *11*: 1947-1953, 1995.
406. Tyrrell, R. M. Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight- -from models to reality. *Bioessays*, *18*: 139-148, 1996.
407. Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. N. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci*, *7*: d765-783., 2002.
408. Ullrich, S. E. Photoimmune suppression and photocarcinogenesis. *Front Biosci*, *7*: d684-703., 2002.
409. Schafer, D. F. and Sorrell, M. F. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, *353*: 1253-1257, 1999.
410. Thorgeirsson, S. S. and Grisham, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, *31*: 339-346, 2002.
411. Schaefer, S., Seifer, M., Grimmsmann, T., Fink, L., Wenderhold, S., Hohne, M. W., and Gerlich, W. H. Properties of tumour suppressor p53 in murine hepatocyte lines transformed by hepatitis B virus X protein. *J Gen Virol*, *79*: 767-777, 1998.
412. Terradillos, O., Billet, O., Renard, C. A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M. A. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*, *14*: 395-404, 1997.
413. Seto, E., Mitchell, P. J., and Yen, T. S. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature*, *344*: 72-74, 1990.
414. Maguire, H. F., Hoeffler, J. P., and Siddiqui, A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, *252*: 842-844, 1991.
415. Lucito, R. and Schneider, R. J. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol*, *66*: 983-991, 1992.

416. Cross, J. C., Wen, P., and Rutter, W. J. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen-activated cellular serine/threonine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*: 8078-8082, 1993.
417. Williams, J. S. and Andrisani, O. M. The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*: 3819-3823, 1995.
418. Lee, Y. H. and Yun, Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem*, *273*: 25510-25515, 1998.
419. Huo, T. I., Wang, X. W., Forgues, M., Wu, C. G., Spillare, E. A., Giannini, C., Brechot, C., and Harris, C. C. Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis. *Oncogene*, *20*: 3620-3628, 2001.
420. Shih, W. L., Kuo, M. L., Chuang, S. E., Cheng, A. L., and Doong, S. L. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, *275*: 25858-25864, 2000.
421. Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev*, *15*: 507-521., 2001.
422. El-Mahdy, M. A., Hamada, F. M., Wani, M. A., Zhu, Q., and Wani, A. A. p53-degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation. *Mutat Res*, *459*: 135-145, 2000.
423. Mathonnet, G., Leger, C., Desnoyers, J., Drouin, R., Therrien, J. P., and Drobetsky, E. A. UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*: 7219-7224, 2003.
424. Bergametti, F., Prigent, S., Lubet, B., Benoit, A., Tiollais, P., Sarasin, A., and Transy, C. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene*, *18*: 2860-2871, 1999.

425. Galipeau, J., Li, H., Paquin, A., Sicilia, F., Karpati, G., and Nalbantoglu, J. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res*, 59: 2384-2394, 1999.
426. Olive, P. L., Banath, J. P., and Durand, R. E. Development of apoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cell cycle at the time of irradiation. *Radiation Res*, 146: 595-602, 1996.
427. DeLuca, J. G., Weinstein, L., and Thilly, W. G. Ultraviolet light-induced mutation of diploid human lymphoblasts. *Mutat Res*, 107: 347-370., 1983.
428. Abbott, D. W., Thompson, M. E., Robinson-Benion, C., Tomlinson, G., Jensen, R. A., and Holt, J. T. BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*, 274: 18808-18812, 1999.
429. Rozek, D. and Pfeifer, G. P. In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter in quiescent and serum-stimulated fibroblasts. *J Cell Biochem*, 57: 479-487, 1995.
430. Abraham, J., Kelly, J., Thibault, P., and Benchimol, S. Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry. *J Mol Biol*, 295: 853-864, 2000.
431. Hermine, O., Lefrere, F., Bronowicki, J. P., Mariette, X., Jondeau, K., Eclache-Saudreau, V., Delmas, B., Valensi, F., Cacoub, P., Brechot, C., Varet, B., and Troussard, X. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 347: 89-94, 2002.
432. Ishikawa, T., Shibuya, K., Yasui, K., Mitamura, K., and Ueda, S. Expression of hepatitis C virus core protein associated with malignant lymphoma in transgenic mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 26: 115-124, 2003.
433. Vejda, S., Erlach, N., Peter, B., Drucker, C., Rossmanith, W., Pohl, J., Schulte-Hermann, R., and Grusch, M. Expression of activins C and E induces apoptosis in human and rat hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 24: 1801-1809., 2003.

434. Wilkening, S., Bader, A., and Stahl, F. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol*, *17*: 207-213., 2003.
435. Wilkening, S., Stahl, F., and Bader, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, *31*: 1035-1042, 2003.
436. Vreeswijk, M. P., Westland, B. E., Hess, M. T., Naegeli, H., Vrieling, H., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. Impairment of nucleotide excision repair by apoptosis in UV-irradiated mouse cells. *Cancer Res*, *58*: 1978-1985, 1998.
437. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., and Brash, D. E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer [see comments]. *Nature*, *372*: 773-776, 1994.
438. Takahashi, H., Ishida-Yamamoto, A., and Iizuka, H. Ultraviolet B irradiation induces apoptosis of keratinocytes by direct activation of Fas antigen. *J Investig Dermatol Symp Proc*, *6*: 64-68, 2001.
439. Rubbi, C. P. and Milner, J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J*, *22*: 975-986, 2003.
440. Sitterlin, D., Lee, T. H., Prigent, S., Tiollais, P., Butel, J. S., and Transy, C. Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants. *J Virol*, *71*: 6194-6199, 1997.
441. Lin-Marq, N., Bontron, S., Leupin, O., and Strubin, M. Hepatitis B virus X protein interferes with cell viability through interaction with the p127-kDa UV-damaged DNA-binding protein. *Virology*, *287*: 266-274, 2001.
442. Bontron, S., Lin-Marq, N., and Strubin, M. Hepatitis B virus X protein associated with UV-DDB1 induces cell death in the nucleus and is functionally antagonized by UV-DDB2. *J Biol Chem*, *277*: 38847-38854, 2002.
443. Tang, J. and Chu, G. Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)*, *1*: 601-616, 2002.

444. Qadri, I., Ferrari, M. E., and Siddiqui, A. The hepatitis B virus transactivator protein, HBx, interacts with single-stranded DNA (ssDNA). Biochemical characterizations of the HBx-ssDNA interactions. *J Biol Chem*, 271: 15443-15450, 1996.
445. Hayakawa, J., Depatie, C., Ohmichi, M., and Mercola, D. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem*, 278: 20582-20592, 2003.
446. Cheong, J. H., Yi, M., Lin, Y., and Murakami, S. Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation. *Embo J*, 14: 143-150, 1995.
447. Staib, F., Hussain, S. P., Hofseth, L. J., Wang, X. W., and Harris, C. C. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat*, 21: 201-216, 2003.
448. Lin, Y. W., Chuang, S. M., and Yang, J. L. Persistent activation of ERK1/2 by lead acetate increases nucleotide excision repair synthesis and confers anti-cytotoxicity and anti-mutagenicity. *Carcinogenesis*, 24: 53-61, 2003.

CHAPITRE VI
ANNEXE

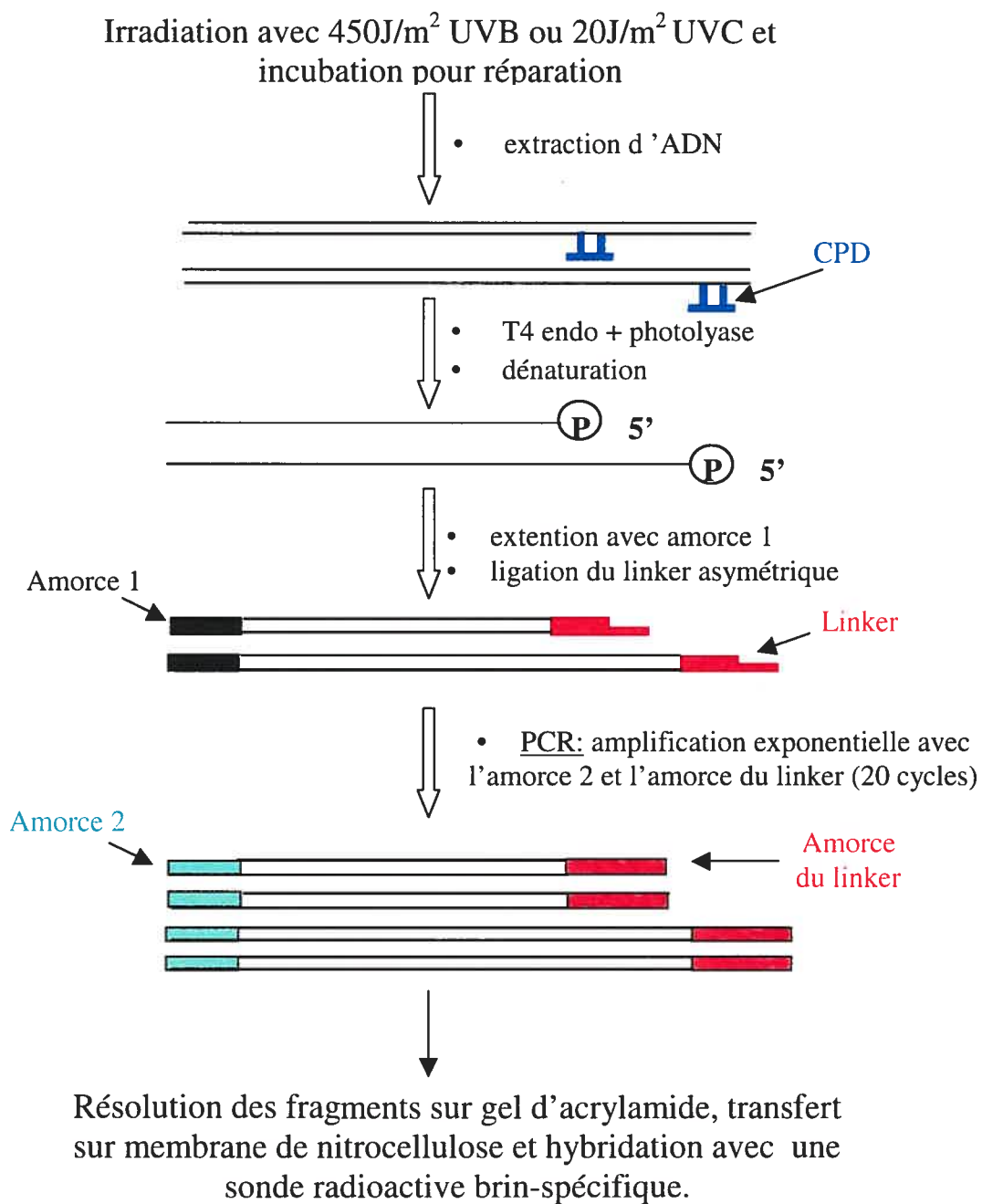


Figure 30. Représentation schématique de la technique de réaction en chaîne de la polymérase médiée par une ligation (LMPCR).

CURRICULUM VITAE

ACADEMIC DEGREES

- 2000-2004 : Ph.D. Molecular Biology. UNIVERSITY OF MONTREAL.**
Supervisor : Dr Elliot Drobetsky. Montreal.
Subject : Roles of p53 and the viral oncoprotein HBx in the cellular response to DNA damage.
- 1998-2000 : M.Sc. Molecular Biology. UNIVERSITY OF MONTREAL.**
Supervisor : Dr Daniel Sinnett. Montreal.
Subject : DNA variants in the repair genes hMLH1, hMSH3, XRCC1, XPD, and APE, and the risk of childhood leukemia.
- 1997-98 : M.Sc. Cellular biology and physiology, molecular and cellular genetics.
UNIVERSITY OF MONTREAL/ UNIVERSITY CLAUDE BERNARD
LYON 1 (France).**
- 1996-97 : LICENCE Cellular Biology and physiology option Genetics.
UNIVERSITY CLAUDE BERNARD LYON 1 (France).**

TRAININGS

- 10/97 to 06/98 : Training at the laboratory of molecular biology, Dr Paul Jolicoeur,
CLINICAL RESEARCH INSTITUTE OF MONTREAL. Montréal,
Quebec.**
- 06/97 to 07/97 : Molecular biology training at the laboratoire de Physiologie des
Régulations Énergétiques Cellulaires et Moléculaires.
UMR 5578.CNRS-UCB Lyon 1.Dr Joël Lachuer. (France)**

FELLOWSHIPS AND AWARDS

- **2002-2005 : Molecular Biology program of the University of Montreal fellowship.**
- **Astrazeneca price for best PH.D. poster :**
Xth scientific day of the molecular biology program, University of Montreal. 2004.
- **Travel award from the American Society For Photobiology (ASP) :**
30th annual meeting of the ASP, 2002. Quebec, Canada.
- **1998-2000 : fellowship from the Ste Justine Hospital foundation.**
- **Travel award from the American Association of Cancer Research (AACR):**
Special conference «DNA Repair Defects», 2000. San Diego, Ca, USA.

- **Travel award, Réseau de Médecine-Génétique Appliquée (RMGA):**
41th annual meeting of the Club de Recherche Clinique du Quebec (CRCQ), 1999. Montebello, Canada.
- **Second price for poster presentation :**
Meeting of the graduate students from the Ste Justine Hospital research center, 1999. Montreal, Canada.

PUBLICATIONS

1. Mathonnet G., Alaoui-Jamali, M., and Drobetsky, E.A. *Mutation Research*, 2004 Oct 4; 554(1-2):305-18.
«Expression of the hepatitis-B virus X oncoprotein inhibits transcription-coupled nucleotide excision repair in human lymphoblastoid cells.»
2. Mathonnet G., Leger C, Desnoyers J, Drouin R, Therrien JP, Drobetsky E.A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 10; 100(12):7219-24.
«UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells.»
3. Mathonnet G., Labuda D., Meloche C., Wambach T., Krajinovic M., Sinnett D. *Journal of Human Genetics*. 2003 Nov; 48(12): 659-64.
« Variable continental distribution of polymorphisms in the coding regions of DNA-repair genes.»
4. Mathonnet G., Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D. *Br J Haematol*. 2003 Oct; 123(1):45-8.
«Role of DNA mismatch repair genetic polymorphisms in the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia.»
5. Brockstedt U, Krajinovic M, Richer C, Mathonnet G., Sinnett D, Pfau W, Labuda D. *Mutat Res* 2002 Apr 26; 516(1-2):41-7
«Analyses of bulky DNA adduct levels in human breast tissue and genetic polymorphisms of cytochromes P450 (CYPs), myeloperoxidase (MPO), quinone oxidoreductase (NQO1), and glutathione S-transferases (GSTs).»
6. Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G., Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, Sinnett D. *Clin Cancer Res* 2002 Mar; 8(3):802-10
«Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia.»
7. Infante-Rivard C, Mathonnet G., Sinnett D. Special issue *Environmental Health Perspectives* 108 (6): 495-8.
«Diagnostic irradiation and polymorphisms in DNA repair genes in childhood leukemia.»



2020年10月10日