

Université de Montréal

L'influence de la protéine p53 sur la réponse
génomique des cellules humaines aux ultraviolets.

par

Caroline Léger

Faculté des études supérieures

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor*
en biologie moléculaire

Janvier 2003

© Caroline Léger, 2003



PH
506
U54
2003
V.009

Direction des bibliothèques

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:
L'influence de la protéine p53 sur la réponse
génotoxique des cellules humaines aux ultraviolets.

présentée par:
Caroline Léger

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Claude Perreault, président-rapporteur
Elliot A. Drobetsky, Ph.D., directeur de recherche
Eric Milot, membre du jury
Richard Wagner, examinateur externe
Anne-Marie Mes-Masson, représentante du doyen de la FES

Résumé Français

L'inactivation de p53 est un événement précoce majeur dans l'initiation des cancers de la peau de type non-mélanome induit par les ultraviolets. Toutefois, les recherches menées sur la réponse cellulaire à la lumière solaire ont généré d'importantes contradictions dans la littérature dues à (1) l'utilisation de différentes stratégies expérimentales visant à réduire ou à inactiver l'activité de p53 dans les modèles cellulaires en culture, p.e. le "knockout" de p53 (inactivation génétique) vs. l'expression d'oncoprotéines virales ou de dominants négatifs de p53 (inactivation fonctionnelle) couplé à (2) l'utilisation de différentes longueurs d'ondes des UV, i.e. l'utilisation de sources émettant soit les UV 254nm ou les UVB (290-320).

Cette thèse adresse, de façon substantielle, les bases de ces contradictions en comparant rigoureusement les réponses cellulaires critiques (i.e. survie clonogénique, fréquence de mutations au locus HPRT, réparation de l'ADN aux loci HPRT et c-jun, réponse apoptotique et cinétique de progression G1-S) observées suite à un traitement à différentes régions du spectre des ultraviolets, et ce en utilisant un système cellulaire isogénique humain comprenant la lignée lymphoblastique TK6 et deux lignées isogéniques soit TK6-5E, présentant une inactivation fonctionnelle de p53 par l'expression de l'oncoprotéine virale HPV E6 et la lignée NH32 contenant une inactivation génétique de p53.

Nous avons pu montrer que p53 joue un rôle essentiel dans la réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription suite à un traitement aux

UVB mais non suite au UV 254nm. De plus, nous avons été en mesure de montrer que l'inactivation fonctionnelle de p53 par l'expression de l'oncoprotéine HPVE6 ne reproduit pas fidèlement l'inactivation génétique de p53 et ce pour la mesure de la survie clonogénique, de la fréquence de mutation au locus HPRT, de l'apoptose ou de la progression G1-S.

Ces recherches font ressortir les différences importantes dans la réponse des cellules humaines aux différentes régions du spectre ultraviolet et éclaircissent la façon dont p53 nous protège des effets néfastes de ces radiations.

Mots clefs: Réparation par excision de nucléotides, p53, ultraviolets, apoptose, mutagénèse, oncoprotéine E6, cycle cellulaire

Résumé Anglais

Inactivation of the p53 regulatory pathway is a major early event in the initiation of solar UV-induced melanoma skin cancer. However, investigations on the cellular response to sunlight have yielded important contradictions in the literature due to (1) the use of different experimental strategies to abrogate or reduce p53 activity in cultured cells, e.g. p53 knockouts (genetic inactivation) vs. expression of viral oncoproteins or dominant-negative mutants (functional inactivation) and (2) the use of different incident UV wavelengths, i.e., sources producing either monochromatic 254nm UV vs UVB (290-320).

This thesis, in a very substantial manner, addresses the basis for these contradictions by rigorously comparing critical cellular responses (i.e. clonogenic survival, mutation frequency at the HPRT locus, extent of DNA repair at the HPRT and c-jun locus, apoptotic response and kinetic of G1-S progression) to different regions of the UV wavelength spectrum, using an isogenic human cell culture system composed of the human lymphoblastoid cell line TK6 and two isogenic derivatives, i.e. TK6-5E, in which p53 is inactivated functionally by expression of the HPVE6 oncoprotein and NH32 harboring a genetic inactivation of p53.

We were able to demonstrate that p53 plays an essential role in transcription-coupled nucleotide excision repair following UVB but not after 254nm UV treatment. Furthermore, we were able to show that functional inactivation of p53 by HPVE6 expression does not faithfully reproduce the

genetic inactivation of p53 for either clonogenic survival, mutation frequency at the HPRT locus, apoptosis or G1-S progression.

This work emphasizes the important differences in the response of human cells to the different regions of the ultraviolet spectrum and unravels how p53 protects against the harmful effects of ultraviolet light.

Key words: Nucleotide excision repair, p53, ultraviolet radiation, apoptosis, mutagenesis, E6 oncoprotein, cell cycle.

Table des matières

RÉSUMÉ FRANÇAIS	III
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
DÉDICACE	XIII
REMERCIEMENTS	XIV
AVANT PROPOS	XV
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1 Les rayons ultraviolets	2
1.1 Longueurs d'ondes des radiations solaires :	2
1.2 Les dommages cellulaires produits par les UV	2
1.2.1 Description des dimers de pyrimidines	4
1.2.2 Description des photoproduits 6-4	5
1.2.3 Les dommages de type photo-oxidatifs	6
1.2.4 Influence de la méthylation sur la formation des dommages.....	7
1.3 Les conséquences biologiques des dommages induits par les UV:	8
2 La réponse cellulaire des mammifères	9
2.1: Implication des récepteurs de facteurs de croissance:.....	9
2.2: La médiation du signal par les kinases.....	11
2.3: Influence de la longueur d'onde étudiée:.....	11
3 Le gène suppresseur de tumeur p53	13
3.1 Historique	13
3.2 Le gène p53.....	13
3.3 La protéine p53	14
3.3.1 Acides aminés et régions conservées	14
3.3.2 Régulation de la stabilité et de la fonction de la protéine p53.....	14
3.4: L'oncoprotéine virale HPV E6	17
3.5: Le rôle de p53 dans le cancer de la peau	17
4 Les réponses cellulaires aux UV	20
4.1: La mort cellulaire:.....	20
4.1.1: La source des signaux menant à l'induction de la cascade apoptotique:	23
4.1.1.1: La membrane cytoplasmique:	23
4.1.1.2: Le noyau:	24
4.1.1.3: Les réactifs oxygénés:	25
4.1.2: Le rôle de la mitochondrie dans la réponse apoptotique:.....	26
4.1.3: La régulation de la cascade apoptotique:	26
4.1.4: le rôle de la protéine p53 dans la régulation de l'apoptose suite aux UV.....	27

4.2 La modulation du cycle cellulaire	29
4.2.1 Les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire.....	30
4.2.1.1 les cyclines	30
4.2.1.2 les kinases cyclines-dépendantes.....	31
4.2.2 La régulation de la transition G1 à S suite aux radiations ionisantes	32
4.2.3 La régulation de la transition G1 à S suite aux UV	33
4.3 La réparation de l'ADN:.....	36
4.3.1 Les mécanismes de réparation chez les organismes inférieurs.....	36
4.3.1.1 La réparation par excision de base (BER).....	37
4.3.1.2 La voie de réparation par excision de nucléotides (NER).....	38
4.3.2 La réparation par excision de nucléotides chez l'humain	38
4.3.2.1 Description des étapes du NER et des protéines impliquées.....	38
4.3.2.2 GNER vs TCNER	42
4.3.2.3 Répercussion d'une déficience dans la NER	43
4.3.2.3.1 <i>Xeroderma Pigmentosum</i> (XP).....	43
4.3.2.3.2 Syndrome de Cockayne (CS) et Trichothiodystrophie (TTD)	43
4.3.2.3.3 Conséquences d'une déficience dans le TCNER ou le GNER	44
4.3.3 La protéine p53 et le NER	45
4.3.4 Méthodes utilisées pour étudier la NER.....	46
4.3.4.1 Technique basée sur le "southern-blot"	47
4.3.4.2 LM-PCR.....	48
4.4 La tolérance aux dommages à l'ADN.....	52
4.5 La spécificité des mutations induites par les UV	53
5 Mise en situation	57
6 Objectif global et secondaires	58
7 Choix du modèle expérimental.....	60
CHAPITRE 2: PREMIER ARTICLE DÉCOULANT DE MES RECHERCHES	62
RÉSUMÉ	63
ABSTRACT.....	65
INTRODUCTION.....	67
MATERIAL AND METHODS.....	71
RESULTS	77
DISCUSSION	85
ACKNOWLEDGEMENTS.....	93
REFERENCES.....	94
FIGURE LEGENDS	102

CHAPITRE 3: DEUXIÈME ARTICLE DÉCOULANT DE MES RECHERCHES	111
RÉSUMÉ	112
ABSTRACT.....	114
INTRODUCTION.....	116
MATERIALS AND METHODS	121
RESULTS AND DISCUSSION	124
ACKNOWLEDGEMENTS.....	130
REFERENCES.....	131
FIGURE LEGENDS	135
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	144
1 Comparaison de différents modes d'inactivation de p53.....	145
2 Les UV254nm pour modéliser les UV environnementaux.....	148
3 La protéine p53 et la mutagenèse induite par les UV	152
3.1 Implication de la protéine p53 dans la réparation par excision de nucléotides:	152
3.2 Le contournement des dommages résiduels:	156
3.3 La spécificité des mutations induites par les UV:	160
3.4 Influence de la méthylation sur les mutations induites par le SSL:	164
4 Objectif global: Étude des rôles de p53 dans la réponse aux UV:	166
Bibliographie	168

Liste des figures

Figure 1 Les dimers de pyrimidines	3
Figure 2 "Mammalian UV Response"	12
Figure 3 Apoptose induite par les UV	22
Figure 4 Le point de restriction G1 à S.....	35
Figure 5 La réparation par excision de nucléotides chez l'humain.....	40
Figure 6 Le LM-PCR.....	51

liste des abréviations

6-4PP: Photoproduit (6-4)

8-oxodG: 8-hydroxy-deoxyguanosine

ADN: Acide deoxyribonucléique

ATP: Adénosine tri-phosphate

BER: Réparation par excision de bases

BrdU : Bromodéoxyuridine

CDK: Kinase cycline-dépendante

CDKi: inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes

CPD: Dimer cyclobutylique de pyrimidines

CS: Syndrome de Cockaine

GNER: Réparation par excision de nucléotides globale

HCRA: Essai de réactivation par la cellule hôte

HPV: Virus du papillome humain

Kb: Kilobase

LM-PCR: réaction de polymérisation en chaîne par l'entremise d'une ligation

MMR: réparation des mésappariements

NER: Réparation par excision de nucléotides

SCC: Cancers à cellules squameuses

SSL: lumière solaire simulée

T4-endo-V: l'endonucléase V du phage T4

TCNER: Réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription

TTD: Tricothiodistrophie

XP: Xeroderma Pigmentosum

UDS: Synthèse d'ADN non-prévue

UV: ultraviolet

Dédicace

Je dédie cette thèse à mes parents, Danielle et Claude, qui m'ont toujours soutenue, encouragée et aidée dans tous mes projets, petits et grands.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherches, le Dr. Elliot Drobetsky, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser ces expériences fascinantes. J'ai beaucoup appris avec vous et je vous en remercie.

Je tiens également à remercier mes parents pour les encouragements et le support moral et financier qu'ils m'ont donné au fil de ces longues années d'études. Je tiens également à remercier ma soeur, Nathalie, pour sa présence et son écoute, et ce particulièrement dans les moments difficiles.

Je veux remercier Éliane, Rachel et Sébastien, mes amis de longues dates, qui m'ont écoutées, comprise et épaulée tout au long de mon cheminement.

Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire passés et présents soit, Caroline Baril, Frédéric-Maud Brien, Anne Châteauneuf, Julie Desnoyers, Anne-Christine Goulet, Sylvana Lachance, Martin Loignon, Géraldine Mathonnet, Yves Paquette, Marc-André Raymond et Jean-Philippe Therrien pour leur support technique et scientifique.

Finalement, je veux remercier mes collègues des autres laboratoires, dont Isabelle Brodeur, Andréa Shatilla, Mélanie Lessard, Stéphanie Bottardi, et les directeurs de recherches Dindial Ramotar, Claude Perrault, Éric Milot et Patsawamy Manjunath pour m'avoir encouragée, écoutée et aidée dans mes recherches.

Avant Propos

L'étude des mécanismes menant au cancer de la peau revêt une importance primordiale lorsque l'on sait que cette néoplasie est la principale forme de cancer retrouvé dans la population nord-américaine et que son incidence dépasse celle de tous les autres types de cancer réunis. Il est maintenant admis que se sont les ultraviolets (voir plus bas) qui sont la principale cause de ce type de cancer. Ces radiations ont longtemps été utilisées comme agent modèle pour l'étude de processus aussi variés que le contrôle du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la réparation. Bien qu'une base de données impressionnante existe sur les effets des ultraviolets, il reste encore bien des choses à comprendre sur la façon dont les cellules réussissent à se prémunir contre les effets dévastateurs de ces longueurs d'ondes. Et c'est dans l'espoir de clarifier certaines de ces questions que j'ai entrepris le présent travail.

Chapitre 1 Introduction

1 Les rayons ultraviolets

1.1 Longueurs d'ondes des radiations solaires :

Les ultraviolets (UV), compris dans le spectre d'émission électromagnétique du soleil, peuvent être divisés en trois régions distinctes soit les UVC (100 à 290nm), les UVB (290 à 320nm) et les UVA (320 à 400 nm). Les UVC sont atténués par un facteur de 10^7 par la couche d'ozone et ne sont donc retrouvés qu'en quantité infime à la surface de la terre. Afin de les étudier en laboratoire, une lampe germicide émettant principalement à 254nm est couramment utilisée. Les UVB et les UVA pénètrent la couche d'ozone et sont impliqués dans l'étiologie des cancers de la peau de type non-mélanomes et des mélanomes.

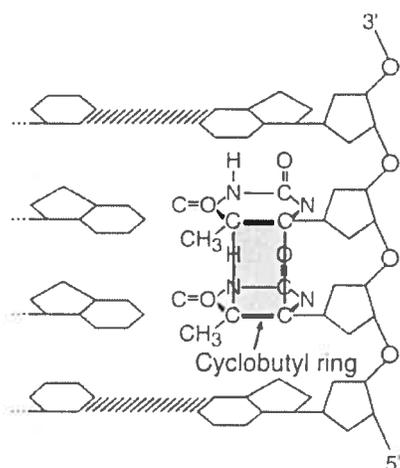
Les cellules possèdent divers chromophores ayant un maximum d'affinité pour une longueur d'onde particulière. Par exemple, la capacité d'absorption de l'acide déoxyribonucléique (ADN) atteint un maximum à 260nm et diminue de 20 fois à 295nm (Setlow 1974). Toutefois, les lipides des membranes ainsi que certaines protéines cellulaires sont plus fortement endommagés par les UVA que par les deux autres régions des UV (Setlow 2002).

1.2 Les dommages cellulaires produits par les UV

Il a été montré que les UV (principalement les UVA), endommagent ou induisent des changements dans les membranes, le cytosquelette et les protéines cellulaires (de Laat and de Gruijl 1996) ce qui contribue à la réponse des cellules aux UV.

Les deux principaux types de dommages à l'ADN produit par l'absorption directe de l'énergie des UV sont les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) et les photoproduits 6-4 (6-4PP).

Dimer cyclobutylique de pyrimidines (CPD)



Photoproduit 6-4 (6-4 PP)

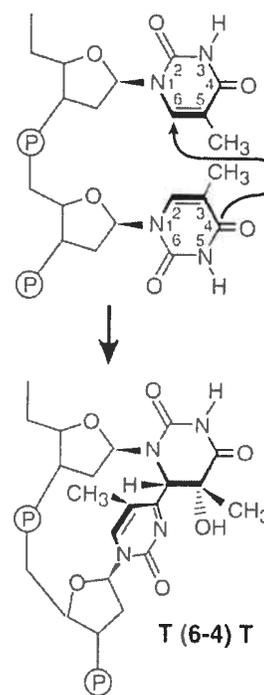


Figure 1 Les dimers de pyrimidines

Les CPD sont obtenus par la saturation du double lien 5,6 de deux pyrimidines adjacentes tandis que les 6-4 PP sont produits par la liaison entre le carbone 4 d'une pyrimidine en 3' et le carbone 6 de la pyrimidine adjacente en 5' (Setlow 1966).

1.2.1 Description des dimers de pyrimidines

Il a été montré que plusieurs facteurs influencent la probabilité de former un CPD à un site dypirimidique donné dont la composition des pyrimidines adjacentes pouvant se dimériser et la longueur d'onde étudiée (Mitchell 1992). Ainsi, lors d'un traitement aux 254 nm UV, les diverses combinaisons suivantes de pyrimidines permettront la formation d'un CPD dans la proportion TT>TC>CT>CC (68:16:13:3). Toutefois, les UVB favorisent la formation des CPD aux sites contenant des cytosines dans les proportions TT>TC>CT>CC (52:21:19:7) (Mitchell 1992).

La structure tridimensionnelle de l'ADN est également importante dans la probabilité de former un CPD à un site donné. Ainsi, la torsion additionnelle de la double hélice d'ADN induite par son repliement en nucléosome influence la formation des CPD. Il a été montré que les CPD surviennent avec une périodicité d'environ 10.3pb dans l'ADN nucléosomal et qu'ils ont tendance à se former du côté opposé à la surface des nucléosomes (Gale, Nissen, and Smerdon 1987). Dans la région de liaison entre les nucléosomes, aucune périodicité n'a pu être détectée (Pehrson 1995) indiquant que les contraintes de torsions ne sont pas assez importantes dans ces régions pour empêcher la dimérisation des pyrimidines adjacentes. Le repliement de l'ADN induit par la liaison de facteurs de transcription joue également un rôle dans la probabilité avec laquelle un CPD sera formé à un site donné (Pfeifer 1997).

1.2.2 Description des photoproduits 6-4

Les 6-4 PP résultent de la liaison entre le carbone 4 d'une pyrimidine en 3' et le carbone 6 de la pyrimidine adjacente en 5', le tout favorisé par l'absorption d'un photon dont la longueur d'onde approche le maximum d'absorption de l'ADN (Scherer et al. 2000; Varghese and Wang 1967). Cette liaison provoque une déformation marquée de la double hélice d'ADN puisque le plan de la pyrimidine en 3' se retrouve à un angle de 90° par rapport à la pyrimidine en 5' (Franklin, Doetsch, and Haseltine 1985), ce qui empêche la formation de ce photoproduit aux sites CT (Lippke 1981). Ceci montre que la séquence nucléotidique est également importante pour la formation des 6-4PP. Suite à un traitement aux UV 254nm, les 6-4PP seront formés aux sites TC>CC>>>TT (Mitchell, Nguyen, and Cleaver 1990) tandis que la formation de ce photoproduit suite à un traitement aux UVB. De plus, la méthylation des cytosines provoque un encombrement stérique qui empêche le repliement nécessaire à la formation des photoproduits 6-4 (Pfeifer et al. 1991).

La conformation de l'ADN joue également un rôle prépondérant dans la probabilité de former un 6-4 PP dans une région donnée de la chromatine. Ainsi, la probabilité de retrouver un tel dommage dans l'ADN nucléosomal est six fois moindre que pour un ADN inter-nucléosomal ((Mitchell, Nguyen, and Cleaver 1990)). Il est probable que la conformation de l'hélice bicaténaire d'ADN entourant les nucléosomes ne puisse pas se replier suffisamment pour permettre la rotation à 90° de la pyrimidine en 3' et la formation du 6-4PP (Mitchell, Nguyen, and Cleaver 1990).

La proportion relative de formation des CPD versus des 6-4PP varie considérablement selon le ratio (A+T)/(G+C) de la séquence étudiée (Patrick 1977), ainsi que selon la longueur d'onde et la dose utilisée (Rosenstein and Mitchell 1987). Toutefois, il est estimé que la proportion CPD:6-4 PP est de l'ordre de 10:1 suite à un traitement aux UV 254nm.

1.2.3 Les dommages de type photo-oxidatifs

En plus des dommages décrits plus haut, la cellule doit faire face à plusieurs types de dommages photo-oxidatifs qui sont principalement induits par l'absorption de l'énergie des photons par plusieurs chromophores intracellulaires dont la riboflavine, les porphyrines, les quinones et les co-facteurs nicotinamide réduits (Griffiths et al. 1998). Ces molécules absorbent l'énergie des UV et la retransmettent sous forme de réactifs oxygénés qui peuvent alors endommager les bases de l'ADN. Toutefois, l'épiderme contient une multitude d'agents antioxydants, à la fois enzymatiques, tels que la catalase, la glutathione réductase, la superoxyde dismutase et la glutathione peroxidase et des agents non-enzymatiques tels que la glutathione, l'acide urique et l'acide ascorbique qui servent à capturer ces réactifs oxygénés et ainsi à protéger la cellule de leurs effets néfastes (de Laat and de Gruijl 1996).

Certains réactifs oxygénés parviennent tout de même à contrer les défenses de l'organisme et à produire des dommages oxidatifs aux bases de l'ADN. Les principaux types de dommages sont le 8-oxo-7-8-dihydroguanine (8-oxoguanine), la thymine glycol, les pyrimidines insaturées, ainsi que les lésions complexes

impliquant des purines (Griffiths et al. 1998), (Cadet et al. 1992). Le 8-oxoguanine, lorsque non réparé, induit une mutation de type G:C→T:A (Moriya and Grollman 1993).

Plusieurs études récentes ont toutefois montré que les dommages les plus importants du point de vue mutagénique sont les CPD (Drobetsky, Turcotte, and Chateauneuf 1995) (Perdiz et al. 2000), (Yoon et al. 2000). De plus, aucune implication des dommages oxydatifs n'a été détectée dans le spectre de mutations observé au locus p53 de tumeurs de peau induites dans des souris "hairless" suite à un traitement aux UVA (van Kranen et al. 1997). Les expériences présentées dans cette thèse se concentreront donc sur l'étude des CPD induit par différentes régions des UV.

1.2.4 Influence de la méthylation sur la formation des dommages

Les modifications aux bases peuvent influencer la formation de dommages. Ainsi, la méthylation des ilots CpG, ayant généralement pour rôle l'inactivation d'un allèle ou encore le marquage d'un promoteur, peut favoriser la déamination de la cytosine méthylée et ainsi mener à une mutation de type C→T (Gonzalzo and Jones 1997). Bien que les cytosines méthylées ne représentent environ que 1% des bases du génome des mammifères, il est estimé que cette modification cause environ un tiers de toutes les mutations spontanées de type transition responsables des maladies génétiques humaines et des cancers (Spruck, Rideout, and Jones 1993). De plus, il a été montré que lors d'une irradiation à la lumière solaire naturelle, cette modification favorise la formation de dimers de

pyrimidines (Tommasi, Denissenko, and Pfeifer 1997) ainsi que la déamination de la cytosine contenue dans le dimer menant à la formation d'une mutation de type C→T (Setlow 1965). Toutefois, des études de cinétique ont démontré que la vitesse de déamination de la cytosine contenue dans ces dimers serait trop lente pour permettre la formation de mutations chez l'humain, mais non chez la bactérie (Barak Y 1995).

1.3 Les conséquences biologiques des dommages induits par les UV:

Les dommages à l'ADN causés par les UV nuisent à la transcription et à la réplication de l'ADN. De plus, s'ils ne sont pas réparés, ils peuvent mener à la formation de mutations et éventuellement à l'instabilité génétique de la cellule. De façon plus générale, la présence de CPD dans l'ADN influence l'étendue de la réponse inflammatoire et de l'immunosuppression locale observée suite à un traitement aux UVB favorisant la progression oncogénique (Abeyama et al. 2000), (Stege et al. 2000). Finalement, des études suggèrent que ce sont les dimers de pyrimidines formés suite à une irradiation aux UV qui induisent la mélanogénèse (Eller, Yaar, and Gilchrest 1994), (Eller, Ostrom, and Gilchrest 1996). Afin d'éviter les conséquences néfastes de la présence des photoproduits, plusieurs protéines sont capables de reconnaître les dommages à l'ADN et d'activer des voies biochimiques qui mèneront à l'activation de réponses protectrices telles que l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore à l'apoptose et donc au rétablissement des fonctions normales de la cellule. (Ces diverses réponses seront vues en détails au chapitre 4).

2 La réponse cellulaire des mammifères

Les cellules de mammifères répondent de diverses façons à une attaque génotoxique telle que celle imposée par un traitement aux UV. La cascade de signalisation menant à l'activation de réponses protectrice (arrêt du cycle cellulaire, apoptose, réparation de l'ADN) contre un traitement aux UV origine à la fois du noyau et de la membrane cytoplasmique. Toutefois, l'expression "mammalian UV response" (réponse des cellules de mammifères aux UV) est généralement utilisée pour décrire les signaux activés sans l'implication des dommages à l'ADN et sera utilisée comme tel dans le présent ouvrage.

Trois principaux facteurs de transcription sont activés dans un délais de quelques minutes suite à un traitement aux UV, soit AP-1 (c-jun/c-fos), NF-kB et p53. Les différentes voies indépendentes des dommages à l'ADN induisant ces protéines sont illustrées à la figure 2.

2.1: Implication des récepteurs de facteurs de croissance:

La nécessité des dommages à l'ADN dans l'activation des voies de signalisation fut contestée par des études montrant que l'activation de certains gènes, tels que NF-kB, ne nécessite pas la présence de dommages à l'ADN. Dans ces études, la réponse aux UV est observée même dans des cellules dépourvues de noyaux, et ce aussi bien suite à un traitement aux UV 254nm (Devary et al. 1993) qu'aux UVB (Simon et al. 1994). Il fut par la suite montré que l'expression d'un mutant dominant négatif du récepteur de croissance de l'épiderme (EGF) ou encore l'utilisation d'un inhibiteur de l'activation de ces récepteurs (suramin)

prévient la réponse aux UV 254nm. Ces résultats indiquent non seulement une implication du récepteur de l'EGF mais également celle de plusieurs autres récepteurs de facteurs de croissances (Sachsenmaier et al. 1994a) dans la réponse des cellules aux UV (Sachsenmaier et al. 1994b). L'utilisation de récepteurs de facteurs de croissance sans activité kinase permet de montrer que leur activation se fait par autophosphorylation et que cette dernière est essentielle pour permettre le déclenchement de la réponse aux UV (Devary et al. 1992) (Coffer et al. 1995). De plus les UV sont également capable d'agir sur le niveau de phosphorylation de ces récepteurs en inhibant l'activité d'une ou plusieurs phosphatases à spécificité tyrosine liées à la membrane cytoplasmiques, ce qui prévient la déphosphorylation des récepteurs de facteurs de croissance (Knebel et al. 1996). L'inactivation de ces phosphatases serait causée par l'oxydation d'un groupement S-H ou encore l'alkylation non-réversible de leur site actif (Knebel et al. 1996). L'implication du récepteur du facteur de croissance à l'EGF dans l'initiation de la cascade est bien établie. Toutefois, d'autres récepteurs, tels que le récepteur à la mélanocortine ou encore le PDGFR semblent également être capable d'induire une telle réponse, bien que leur implication soit très peu caractérisée (Sachsenmaier et al. 1994b), (Suzuki et al. 1999).

Une implication des réactifs oxygénés induits par les UV (principalement les UVB et les UVA) dans l'initiation de la "mammalian UV response" est également suggéré par une étude montrant que l'activation des récepteurs de croissance peut être induite par le peroxide d'hydrogène (Huang et al. 1996).

2.2: La médiation du signal par les kinases

La phosphorylation des récepteurs de facteur de croissance provoque leur activation et leur association avec la kinase SRC membranaire ce qui entraîne l'activation de la kinase Raf, de la cascade des MAPK (voir figure2) et l'activation transcriptionnelle des gènes c-fos et c-jun ainsi que l'activation post-traductionnelle de c-jun pour former un complexe AP-1 actif (Radler-Pohl et al. 1993), (Price, Cruzalegui, and Treisman 1996). AP-1 est lui-même un facteur de transcription qui, lorsque activé, induit la transcription de gènes impliqués dans le déclenchement des voies protectrices induites par le "mammalian UV response" (Wisdom 1999). c-jun et c-fos sont tous les deux essentiels à cette réponse puisque des études d'inactivation ont montré que l'abolition de l'une ou de l'autre de ces protéines mène à une hypersensibilité des cellules aux UV (Schreiber et al. 1995).

2.3: Influence de la longueur d'onde étudiée:

L'activation des différentes composantes de cette cascade de signalisation est observée à la fois lorsque les cellules sont traitées aux UVB ou aux UV 254nm. Toutefois, des études ont montrés que les UV 254nm induisent plus fortement l'activation de JNK et ERK que les UVB (Dhanwada et al. 1995), (Adler et al. 1995), (Dhar et al. 1996), (Klotz, Briviba, and Sies 1997) ce qui pourrait signifier une activation différentielle des gènes médiant le "mammalian UV response" entre ces deux régions des UV. De plus, les UVB n'induisent que peu les kinases ERK comparativement aux kinases JNK (Assefa et al. 1997).

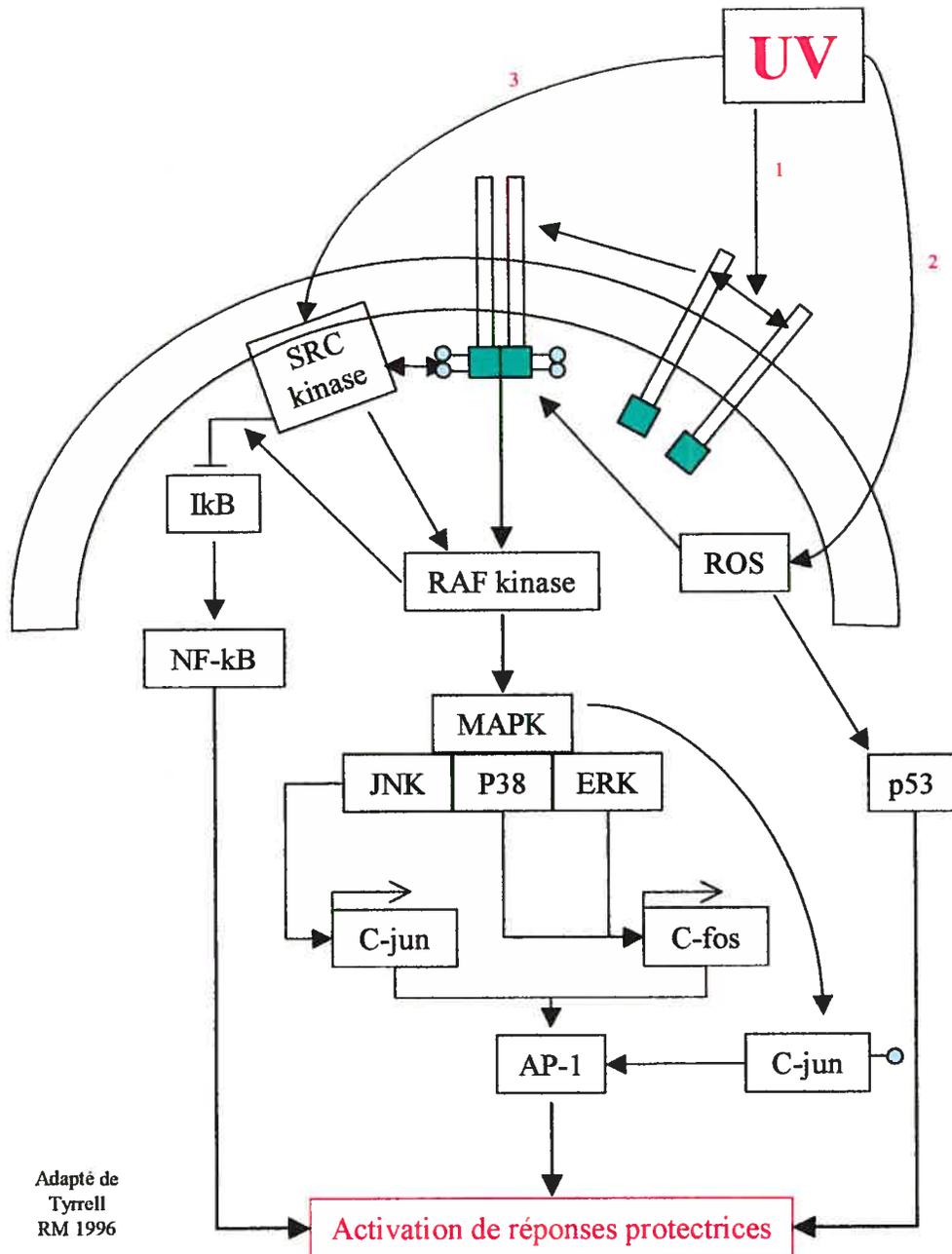


Figure 2 "Mammalian UV Response"

(1) Les UV induisent la dimérisation et l'autophosphorylation de récepteurs membranaires de façon ligand indépendant. (2) Les UV peuvent induire la dégradation de IκB et l'activation de NF-κB dans des cellules énucléées. (3) La production de radicaux libres par les UV peut induire l'activation des récepteurs membranaires et l'activation de la cascade de signalisation ou encore induire l'activation de p53 et des réponses protectrices.

3 Le gène suppresseur de tumeur p53

3.1 Historique

La protéine p53 fut identifiée pour la première fois lors d'études visant à identifier les molécules ciblées par l'antigène grand T du virus SV40 (Kress et al. 1979), (Linzer, Maltzman, and Levine 1979),(Linzer and Levine 1979). Durant la même année, elle fut également identifiée grâce à sa très forte expression dans les tumeurs induites chimiquement (DeLeo et al. 1979). Le gène p53 est perdu ou muté dans plus de 50% des cas de cancers humains (Baker et al. 1989; Baker et al. 1989), (Hollstein et al. 1994) ce qui en fait le gène le plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines (Hollstein et al. 1996) et supporte la notion que le produit du gène de p53 est une protéine suppresseur de tumeur (Mowat et al. 1985), (Morgan DO 1997) .

3.2 Le gène p53

Chez l'humain, le gène p53 est localisé sur le chromosome 17, au locus 17p13 et couvre environ 20kb d'ADN. Il est composé de 11 exons ayant la particularité suivante: le premier exon est non-codant et est situé 8 à 10kb en amont des autres exons (Benchimol et al. 1985),(Oren 1985). Le gène p53 est retrouvé autant chez les vertébrés comme la souris, la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* que chez les invertébrés tels que la pieuvre (Soussi and May 1996).

3.3 La protéine p53

3.3.1 Acides aminés et régions conservées

La protéine p53 humaine est composée de 393 acides aminés et peut être divisée en quatre régions distinctes soit la région N-terminale, constituant le domaine d'activation transcriptionnel (acides aminés 1 à 42), la région centrale formant le domaine de liaison spécifique à l'ADN (acides aminés 102 à 292), le domaine d'oligomérisation (acides aminés 323-356) et finalement la région régulatrice (a.a. 360-393). De plus, il est possible d'identifier dans cette séquence cinq régions hautement conservées à travers les espèces, soit les domaines 1 (aa.13-23), 2 (aa.117-142), 3 (aa. 171-181), 4 (aa.234-250) et 5 (aa.270-286) (May and May 1999).

Les mutations retrouvées dans le gène p53 des cellules tumorales sont principalement situées dans les régions conservées 2 à 5 et peuvent être divisées en 2 groupes, soit celles affectant la capacité de la protéine p53 à lier l'ADN et celles induisant une déstabilisation de la structure tridimensionnelle de la protéine (Soussi and May 1996).

3.3.2 Régulation de la stabilité et de la fonction de la protéine p53

La protéine p53, dans les cellules normales, a une demi-vie très courte de 5 à 10 minutes (Reich, Oren, and Levine 1983). Les deux mécanismes principaux utilisés par la cellule pour réguler la fonction de cette protéine sont: 1) la stabilisation et l'activation de la protéine et 2) la modification de sa localisation

intracellulaire qui peuvent être atteints soit par des modifications post-traductionnelles de la protéine ou encore par l'association à des protéines régulatrices.

Lorsque la cellule subit une insulte génotoxique, il y a accumulation de la protéine p53 dans les minutes suivant la formation des dommages à l'ADN. L'accumulation de p53 se produit suite à une stabilisation de la protéine ou encore par une traduction accrue de son ARN messager et non suite à une augmentation de la transcription du gène (Kastan et al. 1991). L'utilisation de modification post-traductionnelles afin de stabiliser la protéine permet à la cellule d'augmenter le niveau de p53 d'une façon beaucoup plus rapide, sensible et flexible, que par contrôle transcriptionnel. De plus, ces modifications étant réversibles, il est également possible de revenir très rapidement à un niveau basal (Lakin and Jackson 1999). La régulation s'effectue soit par phosphorylation, acétylation, modification de son état rédox ou encore par une combinaison de ces modifications post-traductionnelles dans les régions C-terminale et N-terminale de la protéine (Giaccia and Kastan 1998).

La protéine p53 est localisée dans le cytoplasme durant presque tout le cycle cellulaire (Rotter, Abutbul, and Ben-Ze'ev 1983) sauf lors de la transition G1/S où elle s'accumule dans le noyau de la cellule. Toutefois, très tôt après le début de la phase S, la protéine p53 est redirigée vers le cytoplasme où elle y restera jusqu'à la prochaine ronde de division (Shaulsky, Ben-Ze'ev, and Rotter 1990). La protéine p53 contient un signal de localisation nucléaire bipartite qui est nécessaire pour son interaction avec l'importine alpha et sa translocation dans le

noyau (Liang and Clarke 2001). L'exportation de p53 vers le cytoplasme nécessite la présence d'un signal d'exportation riche en leucine (situé dans le domaine de tétramérisation de p53) ainsi que la liaison de l'exportine 1 à cette séquence (Stommel et al. 1999).

La protéine MDM2 (Mouse Double Minute -2) inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 en liant son domaine d'activation (May and May 1999). Cette liaison entraîne la relocalisation de p53 du noyau vers le cytoplasme, et cible p53 vers le protéasome où elle sera dégradée (Freedman, Wu, and Levine 1999). La protéine MDM-2 est également capable d'ubiquitiner directement p53 dans le noyau, ce qui provoque un changement de conformation de p53 et l'exposition de son signal d'exportation (Liang and Clarke 2001). Ceci constitue une boucle de rétroaction négative typique puisque le gène MDM2 est lui même contrôlé, au niveau transcriptionnel, par la protéine p53 (Wu et al. 1993). Lors d'une irradiation aux UV ou encore aux radiations ionisantes, la protéine p53 est stabilisée par phosphorylation de sa sérine-15, ce qui inhibe son interaction avec MDM-2 provoquant ainsi une accumulation de la protéine p53 dans le noyau où il lui est ensuite possible de remplir ses nombreuses fonctions (Shieh et al. 1997). L'importance de cette boucle est confirmée par le phénotype de mort embryonnaire des souris déficientes au niveau du produit du gène MDM2 et qui peut être rescapé par une inactivation concomitante du gène p53 (Montes de Oca Luna, Wagner, and Lozano 1995).

3.4: L'oncoprotéine virale HPV E6

La protéine HPV E6 est l'une des principales protéines oncogéniques du virus humain du papillome (HPV). La protéine E6 des virus de haut risque est capable de lier la protéine p53 en deux sites distincts, soit en C-terminale et dans la région centrale de p53. La liaison de la protéine E6 avec dans la région C-terminale de p53 réprime l'activité transcriptionnelle de p53 et inhibe la répression transcriptionnelle des promoteurs à boîtes TATAA médiée par p53. De plus, il a été montré que la protéine E6, via une interaction avec la protéine cellulaire E6AP, lie p53 en sa région centrale et provoque son ubiquitination et sa dégradation via le chemin biochimique de l'ubiquitine-protéasome, ce qui rend les cellules fonctionnellement déficientes en p53 (Scheffner et al. 1993) (Werness, Levine, and Howley 1990). L'expression de la protéine E6 des virus de haut risque (majoritairement de type 16 ou 18) est largement utilisée afin d'étudier l'influence de l'inactivation de p53 sur la réponse des cellules à divers agents génotoxiques.

3.5: Le rôle de p53 dans le cancer de la peau

La première étude à montrer le lien entre les mutations dans le gène p53, les UV et le cancer de la peau fut réalisée en 1991 (Brash et al. 1991). Pour cette étude, le gène p53 fut séquencé dans 24 biopsies de cancers de la peau de type non-mélanome (plus spécifiquement des carcinomes spino-cellulaires ou SCC). Les auteurs ont établi que 14 de ces tumeurs présentaient une mutation dans le

gène p53 et que ces mutations étaient toutes situées à un site dipyrimidique et présentaient la "signature moléculaire" des UV soit une transition C à T ou une double transition CC à TT. Le lien entre les UV et les mutations dans le gène p53 fut par la suite confirmé par plusieurs études où les auteurs ont induit des tumeurs de la peau chez la souris par une irradiation aux UVB et ont séquencé le gène p53 de ces tumeurs (en totalité ou en partie) afin de déterminer la présence et la localisation des mutations (Kress et al. 1992), (Berg et al. 1996), (Dumaz et al. 1997). Une mutation dans le gène p53 fut retrouvée dans 60 à 100% des cas et était située majoritairement à un site dipyrimidique. De plus, il a déterminé que les mutations dans le gène p53 ne sont pas distribuées de façon aléatoire, ce qui suggère que ces mutations confèrent un avantage à la cellule (Ziegler et al. 1993). Finalement, afin de s'assurer que la protéine p53 était bel et bien importante dans l'étiologie des cancers de la peau, la fréquence de ces cancers induits par les UVB chez des souris n'ayant pour seule différence que le statut de leur gène p53 fut comparée (Jiang et al. 1999). Il a ainsi été déterminé que les souris p53 déficientes présentaient un niveau plus élevé de cas de cancer de la peau que les souris normales suite à une exposition aux UV (Jiang et al. 1999).

Des biopsies de peau normale de souris soumises à des doses chroniques d'UVB ont été examinées afin de détecter la présence de cellules (ou de clones de cellules) présentant une mutation dans le gène p53 (Berg et al. 1996). Plusieurs clones furent détectés et ce bien avant l'apparition d'une lésion cancéreuse ou même pré-cancéreuse. Il a également été possible de détecter de tels clones chez l'humain (Jonason et al. 1996) où plus de 4% de l'épiderme humain sain étudié

contenait des clones de p53 muté d'une taille allant de 60 à 3000 cellules. De plus, cette étude a révélé que la fréquence des clones est indépendante de l'âge du sujet. Toutefois, l'apparition de clones de p53 mutés ne signifie pas nécessairement l'apparition d'un cancer de la peau puisque plusieurs de ces clones régressent suite à l'arrêt de l'exposition aux UV et ceci ne signifie donc pas que les mutations dans le gène p53 sont l'événement initiateur des tumeurs de la peau. Ces études suggèrent simplement que les mutations dans le gène p53 ne sont pas causés par une instabilité génétique des cellules dûes à une exposition aux UV mais bien qu'elles sont causés directement par l'action des UV.

4 Les réponses cellulaires aux UV

Cette réponse est exécutée par l'entremise de nombreuses protéines qui ont pour mandat la réparation des dommages causés par les UV. Lorsque les dommages sont importants, l'induction d'un arrêt dans le cycle cellulaire peut s'avérer nécessaire afin de permettre à la cellule de réparer son ADN. Si les dommages aux composantes cytoplasmiques et à l'ADN sont trop importants, le déclenchement de la mort programmée de la cellule s'avèrera alors nécessaire afin de protéger l'intégrité du matériel génétique.

4.1: La mort cellulaire:

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un mécanisme actif qui joue un rôle à la fois dans le développement et l'homéostasie des organismes multicellulaires (Ashkenazi and Dixit 1999) et dans la réponse à un stress oxydatifs ou environnemental (Gupta 1996) afin d'éliminer les cellules ayant subi des dommages irréversibles à la membrane cytoplasmique ou encore à l'ADN. Les principales caractéristiques phénotypiques associées à l'apoptose sont la condensation de la chromatine, la réduction du volume de la cellule, la déformation de la membrane cytoplasmique ainsi que la fragmentation de l'ADN (Kerr, Wyllie, and Currie 1972; Kerr and Searle 1972). Les dernières étapes du processus d'apoptose impliquent la formation de corps apoptotiques (i.e. des fractions de membranes entourant du cytoplasme et parfois du matériel génétique) qui seront ensuite phagocités par les macrophages ou encore les cellules

environnantes. Lorsque les dommages sont très importants, la cellule meurt par nécrose, un mécanisme de mort cellulaire non contrôlé.

La destruction ordonnée de la cellule est médiée par les protéines de la famille des caspases (protéases à spécificité cystéine-acide aspartique) (Wolf and Green 1999) qui sont présentes de façon constitutive dans la majorité des types cellulaires sous la forme de proenzymes inactives (Wolf and Green 1999). Elles sont transformées en protéases totalement fonctionnelles par un premier clivage protéolytique qui divise la proenzyme en une petite et une grande sous-unités suivit d'un deuxième clivage qui enlève le prodomaine N-terminal de la grande sous-unité (Nicholson DW 1997). Ces différentes sous-unités s'assemblent ensuite pour former un tétramère possédant deux sites actifs (Chereau et al. 2003). Les caspases reconnaissent et clivent leur substrat en se liant à un site térapeptidique spécifique qui contient un acide aspartique en position P1. Ce site est présent dans les caspases elles-mêmes, ce qui permet la formation d'une cascade protéolytiques où les caspases activatrices (qui répondent directement aux stimuli perçus à la membrane cytoplasmiques ou à l'ADN (Kulms et al. 1999; Kulms et al. 2002) peuvent entraîner le clivage et l'activation des caspases effectrices (qui induisent la destruction des différentes composantes cellulaire) pour former la cascade apoptotique.

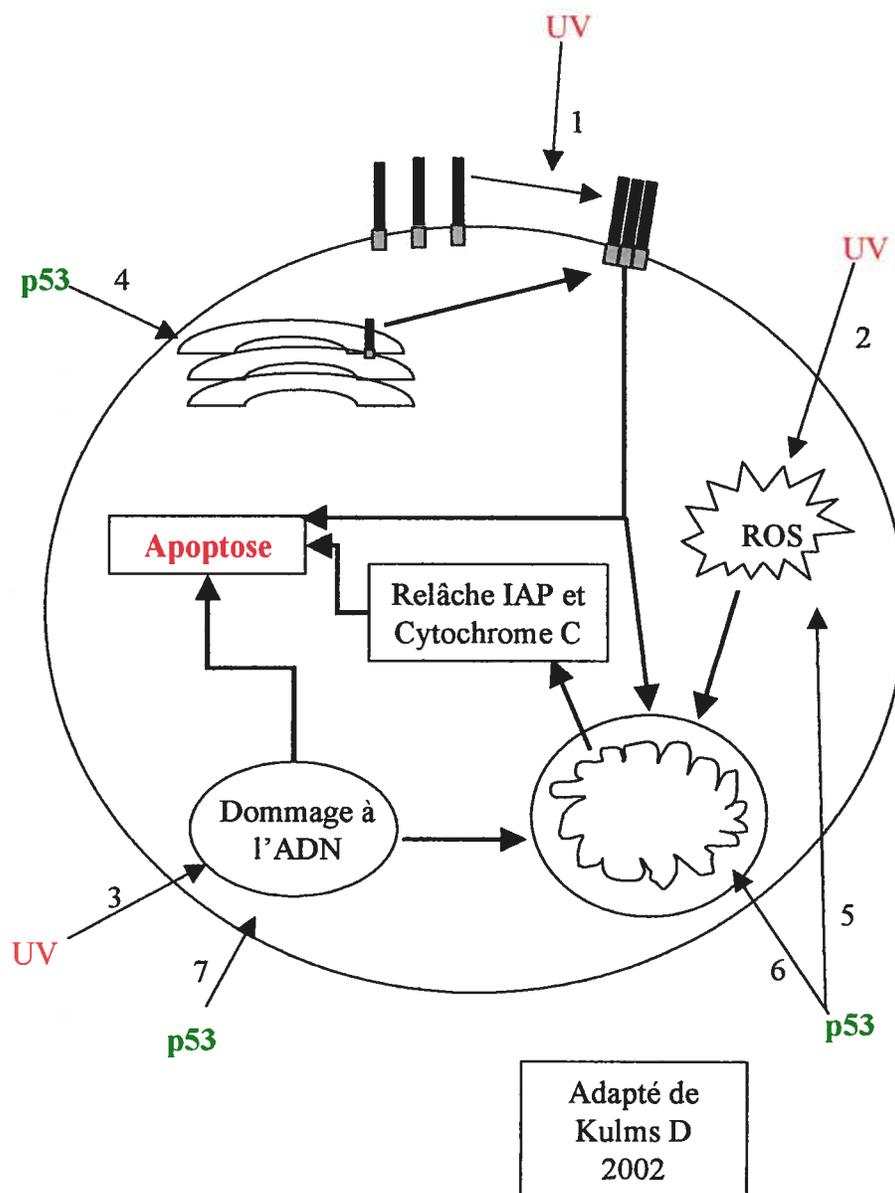


Figure 3 Apoptose induite par les UV

(1) Les UV induisent la trimérisation et l'agglomération des récepteurs de façon ligand dépendante et indépendante ainsi que (2) la formation de radicaux libres ce qui induit l'apoptose. (3) Les dommages à l'ADN causés par les UV induisent une inhibition de la transcription et de la réplication qui peuvent conduire à l'apoptose. (4) La protéine p53 provoque la translocation des récepteurs FAS situé dans le Golgi vers la membrane cytoplasmique. (5), p53 est capable de transactiver des gènes pro-apoptotique tel que BAX et de réprimer des gènes anti-apoptotique tel que BCL-2 (6) Finalement, p53 influence la réparation des dommages et donc l'apoptose suite aux UV (voir le texte pour plus de détails).

4.1.1: La source des signaux menant à l'induction de la cascade apoptotique:

4.1.1.1: La membrane cytoplasmique:

Les principales protéines associées à la membrane cytoplasmiques et impliquées dans l'initiation de la cascade apoptotique suite à un traitement aux UV sont la protéine Fas et le récepteur I du TNF. La cytokine TNF α est induite, dans les kératynocytes, par les UV et est impliquée dans l'apoptose induite par cet agent. (Schwarz et al. 1995) via le récepteur TNFR1 (Zhuang et al. 1999).

Toutefois, un traitement avec la cytokine TNF α seule (i.e. sans irradiation) est insuffisante pour induire l'apoptose des kératinocytes, tel que montré par l'utilisation de concentrations croissantes de TNF α (Schwarz et al. 1995).

Le système Fas/FasL est impliqué dans l'induction de l'apoptose provenant de diverses sources, dont les UV. Le récepteur FAS/APO-1/CD95 appartient à la famille des récepteurs TNF. Le domaine cytoplasmique est conservé entre FAS et TNFR1 et il a été montré qu'il est nécessaire et suffisant pour transduire le signal apoptotique, d'où le nom "death domain". Les kératinocytes expriment, de façon constitutive, le ligand du récepteur Fas (FasL) (Leverkus, Yaar, and Gilchrist 1997). Les UV induisent l'expression à la fois de Fas et de FasL en 3 à 6 heures et la réduction dans la formation de cellules "sunburn" chez les souris FasL $^{-/-}$ définit un rôle pivotale pour ce récepteur dans l'apoptose par les ultraviolet (Hill et al. 1999). De plus, les UV peuvent induire la cascade apoptotique par l'oligomérisation et l'activation des récepteurs Fas de façon ligand-indépendante (Aragane et al. 1998).

Le récepteur TNFR1 induit l'activation des caspases par l'association avec la protéine TRADD. Cette dernière recrute ensuite le complexe FADD-caspase 8 via l'association de FADD avec son domaine de mort. L'oligomérisation des récepteurs permet aux caspases 8 de se retrouver à proximité l'une de l'autre et de s'activer entre elles ce qui enclenche la cascade apoptotique. Le récepteur Fas procède directement au recrutement de FADD sans passer par TRADD. La protéine FADD peut être transactivée directement suite à une irradiation aux UVB et ceci contribue à l'apoptose médiée par les UV (Kim et al. 2003). L'activation des récepteurs à domaine de mort liés à la membrane cytoplasmique induit une réponse apoptotique dite intermédiaire, i.e. qui est observée entre 30 minutes et 4 heures post-traitement.

4.1.1.2: Le noyau:

L'inhibition de la voie de signalisation émanant de la membrane cytoplasmique n'abolit pas complètement l'activation de la cascade apoptotique suite aux UV, ce qui montre qu'il existe d'autres sources activatrices. Il a été montré que l'augmentation de la réparation de l'ADN par l'application topique de liposomes renfermant des enzymes de réparation réduit la formation de cellules "sunburn", ce qui démontre l'importance des dommages à l'ADN dans l'induction de l'apoptose (Stege et al. 2000). De plus, la diminution des dommages de type CPD par leur photoréactivation induite par l'application de liposomes contenant la photolyase mène également à une réduction de l'apoptose dans les cellules de peau de souris irradiées aux UVB (Kulms et al. 1999).

Il a également été montré que la persistance des dommages à l'ADN induit un blocage de la transcription et de la réplication ce qui provoque l'initiation de la cascade apoptotique de 4 heures à plusieurs jours post-traitement (Rochette et al. 2002) (Godar and Lucas 1995).

4.1.1.3: Les réactifs oxygénés:

Toutefois, même lorsque l'activation des récepteurs de mort est bloquée et que les dommages à l'ADN sont éliminés, il demeure un faible niveau d'apoptose, ce qui montre qu'il existe au moins une troisième voie induisant l'apoptose dans les cellules traitées aux UV. Par l'utilisation à la fois d'agent bloquant les deux voies précédentes et d'agents inhibant les radicaux libres il est possible d'abolir complètement la réponse apoptotique induite par les UVB. Ceci démontre que les radicaux libres jouent un rôle essentiel et indépendant dans l'induction de l'apoptose en réponse aux UV (Kulms et al. 2002). Les radicaux libres peuvent induire l'apoptose en oxidant les lipides de la membrane externe de la cellule ou encore en agissant directement sur l'ouverture du port de transition de la perméabilité mitochondriale (mitochondrial permeability transition pore ou MPTP), ce qui mène, dans les deux cas, à la mort par apoptose de la cellule. Les radicaux libres produits par les UV induisent principalement une forme rapide d'apoptose, qui est enclenchée dans la première heure suivant le traitement et qui ne requiert pas de nouvelle synthèse protéique.

4.1.2: Le rôle de la mitochondrie dans la réponse apoptotique:

La mitochondrie joue un rôle prépondérant mais non essentiel dans l'apoptose induite par plusieurs agents. Suite à l'induction des caspases activatrices, la cascade d'activation peut mener à la relâche du cytochrome C et de protéines pro-apoptotiques de deux façons différentes. Premièrement, cette cascade peut mener à l'ouverture du MPTP induisant le découplage de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Ceci provoque la destruction du gradient de potentiel électrochimique et la relâche de protéines pro-apoptotiques localisées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, dont le cytochrome C. Alternativement, il a été montré que la cascade apoptotique peut mener à la formation de pores dans la membrane de la mitochondrie par les protéines pro-apoptotiques, ce provoque le relâchement du cytochrome C. Le clivage de la protéine Bid par la caspase 8 activée et son association avec la protéine Bax pour former un pore dans la membrane externe de la mitochondrie est l'un des exemples les mieux caractérisés de ce phénomène. Lorsqu'il est relâché, le cytochrome C peut alors se lier à la protéine Apaf1 et à la caspase 9, ce qui provoque l'activation de la caspase 9 et l'activation des caspases effectrices pour finalement mener à la mort cellulaire complète.

4.1.3: La régulation de la cascade apoptotique:

La mitochondrie est également le site d'action de plusieurs protéines impliquées dans le contrôle de l'apoptose dont plusieurs membres de la famille BCL-2. Leur action se situe avant l'exécution irréversible des dommages menant à la mort

cellulaire (Gross, McDonnell, and Korsmeyer 1999). Ces protéines sont capables de former des homodimers ainsi que des hétérodimers et la balance entre les différents membres de cette famille aide à définir le sort de la cellule (Oltvai, Milliman, and Korsmeyer 1993). La famille BCL2 comprend deux sous-groupes soit les protéines proapoptotiques (dont BAX, BAK, BOX, BID) et les protéines antiapoptotiques (dont BCL2, BCL-X_L, BCL-W) (Gross, McDonnell, and Korsmeyer 1999). Contrairement aux protéines anti-apoptotiques qui sont majoritairement membranaires et retrouvées dans la membrane externe de la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou encore la membrane nucléaire (Krajewski S 1993), une proportion importante des protéines pro-apoptotiques est retrouvée dans le cytosol ou associée au cytosquelette (Hsu YT 1997). Lors de la perception des signaux de mort, les protéines pro-apoptotiques sont transloquées au niveau de la mitochondrie où elles subissent un changement conformationnel qui leur permet soit de s'intégrer dans les membranes, et plus particulièrement dans la membrane mitochondriale externe (Gross, McDonnell, and Korsmeyer 1999) ou encore de se lier et d'inhiber certaines protéines anti-apoptotique.

4.1.4: le rôle de la protéine p53 dans la régulation de l'apoptose suite aux UV.

L'importance de la protéine p53 dans l'induction de l'apoptose suite à un traitement aux UV fut clairement démontrée par l'utilisation de souris p53 sauvages, p53 hétérozygotes et p53 nulles. Suite à un traitement aux UVB, l'entrée en apoptose des kératinocytes issus des souris sauvages est beaucoup plus

importante que chez les souris hétérozygotes, tandis que les kératinocytes de souris p53 déficientes n'entrent pratiquement pas en apoptose (Ziegler et al. 1994)

Chez les souris p53 nulles, certains types cellulaires présentent une diminution de leur capacité à induire l'apoptose lorsque soumises à un traitement par des agents génotoxiques (Shen and White 2001). Le niveau d'apoptose spontanée n'est toutefois pas affecté par l'inactivation de p53 (Bennett 1999) ce qui permet de conclure que, dans ce modèle, le rôle de p53 dans l'induction de l'apoptose serait restreint à une réponse à un stress extérieur.

La protéine p53 est capable d'enclencher et de promouvoir le processus apoptotique induit par les UV par plusieurs voies différentes (voir figure 3), autant au niveau de l'initiation du signal (émmanant du noyau ou de la membrane cytoplasmique), qu'au niveau du contrôle de la cascade d'activation des différents protéines impliquées dans la réponse apoptotique.

Premièrement, la protéine p53 peut médier l'induction de l'apoptose de façon transactivation indépendante en induisant la translocation d'un bassin de protéines Fas localisé dans le Golgi vers la surface cellulaire, ce qui permet l'activation de la voie apoptotique Fas/Fas Ligand (Bennett et al. 1998),(Miyake et al. 1998). La protéine p53 est également capable de transactiver des membres de la famille des récepteurs de mort liés à la membrane cytoplasmique, tel que les récepteurs de la famille TNF (Ashkenazi and Dixit 1999). Deuxièmement, suite à une attaque cytotoxique, p53 est capable d'activer la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques, dont Bax, noxA et Bak (Shen and White 2001) et de réprimer la transcription de certains gènes anti-apoptotique tel que Bcl-2

(Miyashita et al. 1994), ce qui influence la balance en faveur de l'apoptose. Finalement, la protéine p53 joue un rôle important dans la prévention de l'apoptose induite par la persistance des dommages de type CPD via son implication dans le NER.

Malgré toutes ces évidences, le rôle de la protéine p53 dans le contrôle de la survie des cellules suite à un traitement aux UV est toujours source de débats. Certaines études démontrent un accroissement de la survie clonogénique ou une diminution de l'apoptose des fibroblastes p53-déficients lorsque traités aux UV tandis que d'autres études prétendent le contraire. Toutefois, le mode d'inactivation de p53 pouvant influencer les résultats, il est primordial d'étudier cette question dans un modèle isogénique bien établi.

4.2 La modulation du cycle cellulaire

La définition des quatre phases nécessaires à la division cellulaire, i.e. G1, S, G2 et M remonte à 1953 (Howard 1953). Durant la phase G1, la cellule intègre à la fois les signaux mitogéniques et d'arrêt de croissance et décide alors s'il est approprié de se diviser. Lorsque la cellule est commise pour la division cellulaire et qu'elle a dépassé le point de contrôle ("point de restriction") (Pardee 1974), elle ne peut revenir en arrière et doit procéder jusqu'à la phase S où il y aura duplication du matériel génétique. La phase G2 permet à la cellule à la fois de vérifier la fidélité de la réplication survenue à la phase précédente et la duplication de toutes les composantes cellulaires qui seront séparées également

entre les deux cellules-filles lors de la dernière phase, la mitose (Johnson and Walker 1999).

Il a été clairement montré qu'il existe une corrélation directe entre la durée de rétention des cellules en G1 suite à un traitement à un agent endommageant l'ADN et le taux de mutations produit par cet agent (Little 1969); (Wei, Maher, and McCormick 1995), indiquant que cette phase du cycle cellulaire est la plus importante dans la prévention de la mutagenèse. L'arrêt G1→S, sera donc étudié en détails tandis que les autres points de contrôles du cycle cellulaire ne seront pas étudiés.

4.2.1 Les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire

4.2.1.1 les cyclines

Les cyclines sont de petites molécules dont la concentration oscille lors du cycle cellulaire. Elles sont synthétisées et détruites à des temps précis, assurant ainsi une coordination étroite de leur fonction (Minshull et al. 1989). Chez les mammifères, la famille des cyclines comprend 16 membres (Roy et al. 1994) (Rickert 1996) qui possèdent tous un domaine d'homologie d'environ 100 acides aminés responsable de leur liaison aux kinases cycline-dépendantes (Morgan 1995). La régulation de leur expression se produit à plusieurs niveaux: régulation stricte de la transcription, du niveau de l'ARN messenger, de la traduction de ce dernier en protéine, de la dégradation de la protéine par le protéasome et même de leur localisation intracellulaire (Morgan 1995).

4.2.1.2 les kinases cyclines-dépendantes

Les kinases cyclines-dépendantes (CDK) sont des kinases à spécificité sérine/thréonine composées d'une sous-unité catalytique (kinase) et d'une sous-unité régulatrice (cyclines) qui sont relativement homogènes quant à leur taille et leur homologie de séquence (>40% d'homologie) (Pavletich 1999). Leur niveau intracellulaire demeure relativement constant (et en excès par rapport au niveau de leurs cyclines respectives) tout au long du cycle cellulaire (Morgan 1997). Les principaux substrats des cyclines-kinases dépendantes sont les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, dont les mieux caractérisés sont les membres de la famille de la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (pRb), soit pRb, p107 ou p130, qui partagent des caractéristiques structurales similaires et des fonctions partiellement redondantes (Paggi 2001).

L'activation de la fonction catalytique des CDK nécessite la liaison à leur cycline spécifique, ce qui induit un changement conformationnel important de leur site catalytique permettant la liaison au substrat (Morgan 1997). De plus, dans la majorité des cas, une stimulation additionnelle de la fonction kinase des CDK, de près de 300 fois, sera atteinte par phosphorylation (Russo 1996).

La régulation de la fonction des CDK est également assurée par les protéines de la famille des inhibiteurs de CDK (CDKi) qui sont divisées en deux sous-groupes, basé sur leur propriétés structurelles et leur affinité pour les CDK. D'un côté, les protéines p16, p15, p18 et p19 forment la famille INK4, qui inactivent les cdk4 et 6, et de l'autre côté, les protéines de la famille Kip/cip (p21,

p27 et p57) inhibent la fonction de toutes les CDK dont celles liées aux cyclines D, E et A (Sherr 1999).

4.2.2 La régulation de la transition G1 à S suite aux radiations ionisantes

L'entrée en phase S est soumise à une régulation stricte et redondante afin d'éviter la duplication de matériel endommagé, ce qui pourrait mener à la fixation de mutations et éventuellement à la progression oncogénique. Tous les chemins biochimiques qui contrôlent le point de restriction et qui permettent l'arrêt à la frontière G1/S ont pour but d'inhiber la fonction du complexe cdk2/cycline E (Geng et al. 1999). La cycline E atteint son niveau maximal à la frontière G1 à S. Elle lie et active la kinase Cdk2, ce qui permet alors à cette dernière de phosphoryler les membres de la famille pRb. La phosphorylation de pRb par les CDK induit un changement conformationnel qui permet la relâche des facteurs de transcription de la famille E₂F qui peuvent alors transactiver les gènes essentiels pour la synthèse de l'ADN et ainsi permettre la transition de la phase G1 vers la phase S (Adams 2001).

L'arrêt du cycle cellulaire à la frontière G1/S suite à un traitement aux radiations ionisantes de cellules humaines primaires fut décrit pour la première fois en 1968 (Little 1968). Dans ce cas, l'activation du chemin p53/pRb est absolument essentiel pour l'arrêt en G1 puisqu'il a été montré que des cellules déficientes en p53 sont incapables d'arrêter à la frontière G1/S (Kuerbitz et al. 1992). La protéine p53 transactive la protéine p21 qui inhibe l'activité des CDK4 et 6 (Dulic et al. 1994); (Harper et al. 1993), ce qui empêche la phosphorylation

de la protéine pRb (el-Deiry et al. 1993), (Deng et al. 1995), (Brugarolas et al. 1995). Cette dernière demeure dans un état hypophosphorylé et séquestre le facteur de transcription E₂F1, ce qui empêche la transcription des gènes nécessaires à la transition G1 à S (Giaccia and Kastan 1998), (Slebos, Resnick, and Taylor 1998) et bloque la cellule en G1 (Kuerbitz et al. 1992).

4.2.3 La régulation de la transition G1 à S suite aux UV

L'étude de l'implication de p53 dans le contrôle du point de restriction suite aux UV a mené à plusieurs résultats contradictoires (Gujuluva et al. 1994); (Haapajarvi et al. 1995); (Loignon et al. 1997); (Courtois et al. 1997); (Bissonnette and Hunting 1998); (Haapajarvi et al. 1999) (Geyer et al. 2000); (Al-Mohanna et al. 2001). Toutefois, une étude a récemment montré que l'initiation de l'arrêt en G1 suite à un traitement aux UV 254nm est indépendant des protéines p53, p21 et pRb (Loignon and Drobetsky 2002). Afin de s'assurer que la réponse observée n'était pas dû au type ou au statut cellulaire particulier de la lignée étudiée, les auteurs de cette étude ont utilisé plus de 8 lignées cellulaires primaires ou immortalisées et ont observés la même réponse dans tous les cas étudiés.

Un autre chemin biochimique menant à la progression du cycle cellulaire de G1 à S est contrôlé par le proto-oncogène c-myc. Ce dernier est impliqué dans le contrôle des cyclines D2, D1 et E ainsi que de la phosphatase Cdc25A. Cette dernière enzyme enlève les phosphates inhibiteurs du complexe cdk2-cycline E et permet ainsi la phosphorylation de cdc45 et la synthèse de l'ADN (Jinno et al. 1994). Il a été montré que l'activité cellulaire totale de la phosphatase cdc25A est

rapidement diminuée lorsque des cellules de mammifères sont exposées aux UV (Mailand et al. 2000).

D'autre part, une implication de la protéine p107 est suggérée indirectement et directement par deux études récentes. La première étude montre que l'arrêt en G1 suite à un traitement aux UV est abolit lorsque les cellules expriment la protéine virale HPV 16 E7 qui provoque la dégradation des protéines de la famille pRb (dont la protéine p107). Toutefois, l'arrêt est maintenu dans les cellules déficientes en pRb ce qui suggère l'implication de l'une des 2 autres protéines de cette famille dans l'arrêt des cellules en G1 suite aux UV (Loignon and Drobetsky 2002). De plus, une deuxième étude a démontré que la déphosphorylation de p107 est indépendante de p53 et est nécessaire pour l'arrêt en G1 suite aux UV. Une phosphatase de la famille PP2A serait impliquée dans ce processus. (Voorhoeve et al. 1999).

Finalement, l'arrêt de la transcription par l'ARN polymérase II causé par la présence de dimers de pyrimidines dans le brin transcrits des gènes activement transcrit joue également un rôle dans l'induction et le maintien de l'arrêt à la frontière G1→S (McKay and Ljungman 1999) (Proietti et al. 2002) .

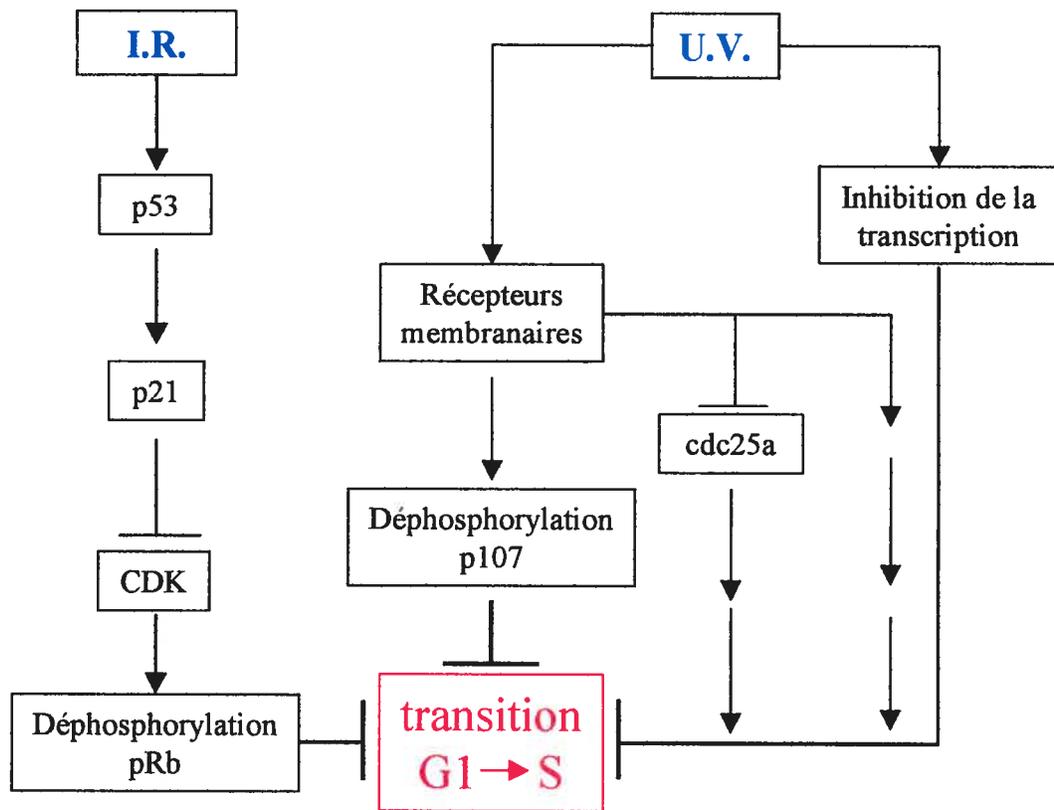


Figure 4 Le point de restriction G1 à S

Lors d'une irradiation aux radiations ionisantes, la transition G1→S est strictement régulée par p53. Toutefois, lors d'un traitement aux UV, cette régulation est beaucoup plus complexe et est totalement indépendante du chemin p53. L'arrêt est induit à la fois par le blocage de l'ARN polymérase II à un site endommagé et par une cascade de signalisation originant à la membrane cellulaire. Les effecteurs et régulateurs de cette cascade ne sont toutefois pas encore tous connus.

4.3 La réparation de l'ADN:

Une différence importante existe entre la réparation des dommages et la tolérance aux dommages, bien que ces deux mécanismes mènent tous deux à une meilleure survie de la cellule. Dans le premier cas, le dommage est enlevé du brin d'ADN endommagé et la réplication subséquente se fait sur un ADN non endommagé. Par contre, la tolérance vise à permettre à la cellule de répliquer son ADN même en présence d'un dommage, ce qui peut entraîner la formation d'une mutation. Selon ce dernier mécanisme, une des deux nouvelles molécules d'ADN contient toujours le dommage suite à la réplication tandis que la deuxième molécule en est dépourvue. Ceci ne règle pas le problème en soi mais permet à la cellule de survivre à cet incident en contournant le dommage.

4.3.1 Les mécanismes de réparation chez les organismes inférieurs

La réparation des CPD peut se faire de deux façons, soit par la réparation directe, i.e. la photoréactivation enzymatique, ou encore par l'excision de la base ou de la région endommagée.

La photoréactivation des dommages est l'exemple type de la réparation directe d'une lésion à l'ADN. Ce mécanisme a été décrit pour la première fois par A. Kelner en 1949 (Kelner 1972) et est dépendant de la lumière visible. Ce processus est réalisé par un enzyme qui catalyse la monomérisation des dimers cyclobutyliques de pyrimidines principalement de type cis-syn. Cet enzyme se nomme " photolyase" et est présente dans la majorité des organismes vivants.

Toutefois, cet enzyme n'a pas encore été découvert chez les mammifères placentaires, dont l'Homme (Wood et al. 2001).

Le processus de photoréactivation a surtout été décrit pour l'élimination des CPD. Toutefois, une activité enzymatique permettant la photoréactivation des 6-4 PP a été caractérisée dans les embryons de la mouche *Drosophila melanogaster* (Kim et al. 1996),(Todo et al. 1996), laissant croire que cette activité existe également dans d'autres organismes.

4.3.1.1 La réparation par excision de base (BER)

Chez l'humain, le BER est principalement impliqué dans la réparation des dommages oxydatifs produits par les UV, dont le 8-oxoguanine (Douki et al. 1999); (Kim et al. 2002).

Toutefois, chez certains organismes inférieurs, les CPD peuvent être excisés via le mécanisme de réparation par excision de base (Lloyd 1998). Le modèle le mieux étudié est celui de l'endonucléase V du phage T4 (T4-endo-V) qui clive spécifiquement l'ADN du côté 5' d'un CPD. Cet enzyme est actif sous forme monomérique et détecte les CPD par un mécanisme de balayage, ne se dissociant de l'ADN que lorsque tous les CPD sont réparés. La T4-endo-V est capable d'induire une courbure dans l'ADN et de provoquer le positionnement de la purine opposée au CPD vers l'extérieur de la double hélice d'ADN (Lloyd 1998). ce qui permet le positionnement du CPD au site catalytique de l'enzyme et son excision.

4.3.1.2 La voie de réparation par excision de nucléotides (NER)

Les dommages causant une distortion au niveau de la double hélice d'ADN, tel que les CPD et les 6-4 PP, sont réparés par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER). La stratégie appliquée dans cette voie de réparation est très conservée, soit de la bactérie à l'humain (Petit C 1999).

4.3.2 La réparation par excision de nucléotides chez l'humain

4.3.2.1 Description des étapes du NER et des protéines impliquées

La réparation par excision de nucléotides, chez la bactérie comme chez l'homme, se divise en deux sous-voies, soit la réparation couplée à la transcription (TCNER) et la réparation globale (GNER). La première voie est spécifique au brin transcrit des gènes activement transcrit par la polymérase II tandis que la seconde voie permet la NER de tout le génome. La différence entre ces deux voies se situe au niveau de la reconnaissance du dommage qui se fait par le complexe TFIIH dans le cas de la voie TCNER et par les protéines XPC et XPE dans le cas de la voie GNER (Mullenders 1998).

La NER peut être divisée en 4 grandes étapes (voir figure 5) soit 1) la reconnaissance du dommage, 2) le déroulement de l'ADN de chaque côté du site endommagé, 3) l'incision de part et d'autre du site endommagé suivit de l'excision du fragment contenant le dommage et 4) la resynthèse du brin excisé et la ligation de la portion nouvellement synthétisée au reste de la molécule d'ADN (de Laat WL 1999).

Le complexe XPC-hHR23B possède affinité particulière pour les photoproduits 6-4. Il lie directement le dommage et induit un changement de conformation autour de la lésion, ce qui provoque un désappariement local des deux brins d'ADN (Sugasawa et al. 1998). L'affinité du complexe XPE (p48 et p127) est dirigé envers les CPD (Kusumoto R 2001). La région simple brin formée par la rupture des liens base-base provoquée au site endommagé est reconnue par la protéine XPA (Jones and Wood 1993). Cette liaison au brin non-endommagé permet la vérification de la présence du dommage déformant l'ADN et la suite du processus de NER par la formation d'un réseau complexe de liaisons entre XPA et plusieurs protéines dont le facteur de transcription général TFIIH (de Laat 1999) .

Ce facteur est impliqué dans la NER, l'initiation de la transcription médié par l'ARN polymérase II et le cycle cellulaire. L'hétérocomplexe TFIIH est composé de 9 sous-unités protéiques réparties en deux sous-complexes. Le premier complexe, le "noyau", est composé des sous-unités XPB, p52, p62, p44 et p34, du complexe CAK (cdk7, cyclin H et Mat1) et forme le site catalytique de l'enzyme. Finalement, la dernière sous-unité, XPD peut se lier à l'un ou l'autre de ces deux complexes (Frit, Bergmann, and Egly 1999). Les protéines XPB et XPD sont des hélicases ATP-dépendentes nécessaires pour l'ouverture de l'ADN autour de la lésion. La protéine XPB exerce son activité dans la direction 3'→5' et la protéine XPD dans la direction inverse. Le complexe TFIIH est également nécessaire pour le maintien de l'architecture de la bulle d'excision (Frit, Bergmann, and Egly 1999).

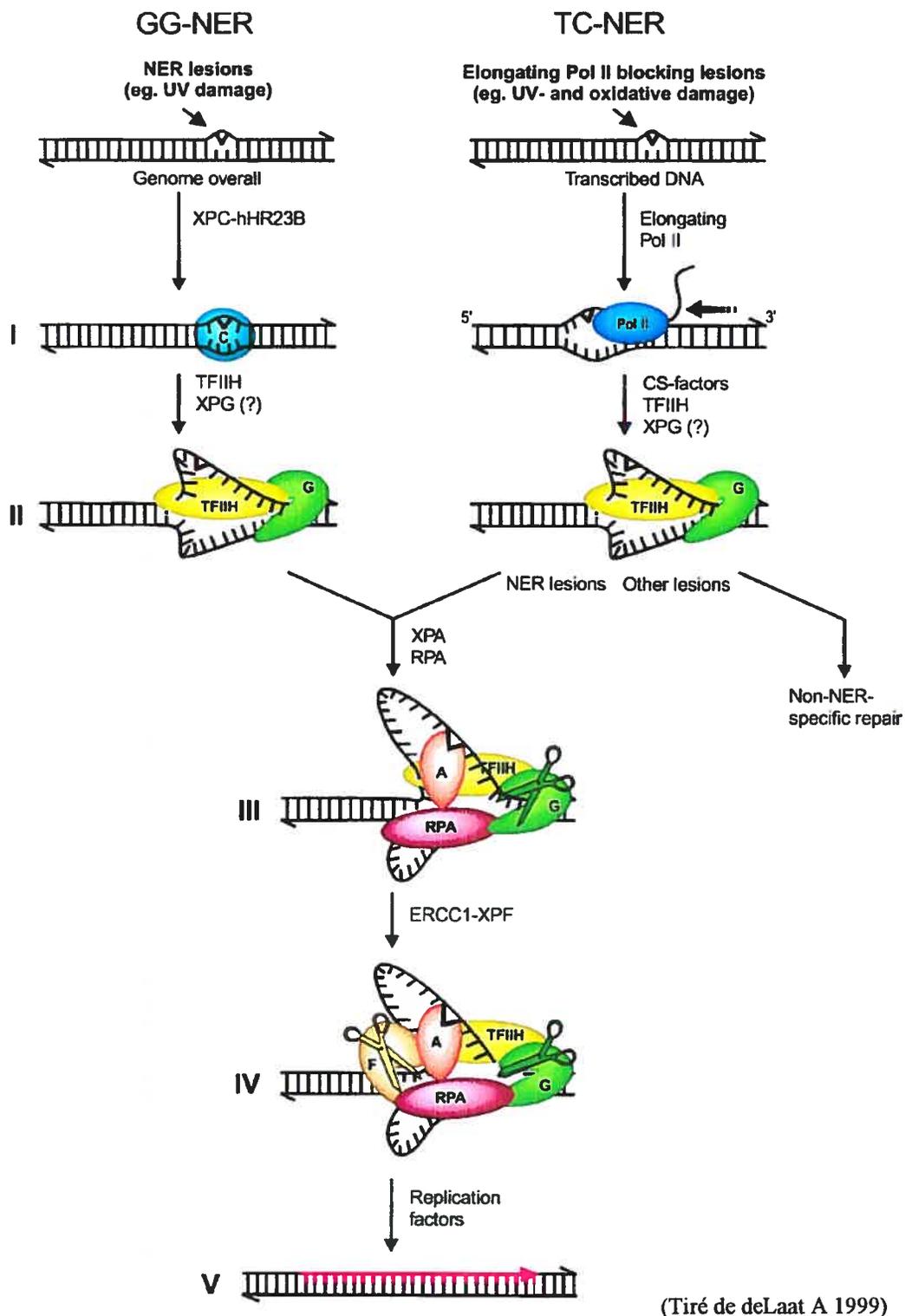


Figure 5 La réparation par excision de nucléotides chez l'humain.

La protéine RPA lie l'ADN simple-brin non-endommagé avec une polarité définie et sert à bien positionner les nucléases XPG et XPF de chaque côté de la lésion.. RPA possède également une fonction de stabilisation de l'ouverture de la bulle d'excision (Wold 1997).

Une fois cette bulle formée et stabilisée, la protéine XPG lie la protéine RPA dans sa région orientée en 5'. Une fois la liaison établie, la protéine XPG clive le brin endommagé à la limite 3' de la région simple-brin/double-brin de la bulle d'excision. Par la suite, l'hétérodimère ERCC1-XPF est recruté du côté 3' de la protéine RPA et clive le brin endommagé à la limite 5' de la bulle d'excision (de Laat et al. 1998).

Une fois le brin endommagé excisé, le brin est resynthétisé par l'action coordonnée des polymérases delta et epsilon, du complexe RFC et de PCNA. Le nouveau brin est ensuite scellé par l'action de la ligase I (de Laat WL 1999), ce qui complète le processus de réparation.

Plusieurs évidences tendent à montrer que la réparation par excision de nucléotides ne serait pas uniforme à travers le génome. En plus d'être sous-divisée par rapport au brin transcrit ou non-transcrit, il y a également une réparation plus marquée de certaines parties du génome. Il est possible d'observer une meilleure réparation en 5' des gènes (près des promoteurs), qu'en 3', et ceci pourrait être dû au couplage de la transcription et de la réparation (Tu, Tornaletti, and Pfeifer 1996). De plus, la NER semble débiter avec les régions d'ADN couplées à la matrice nucléaire (McKay, Ljungman, and Rainbow 1999).

4.3.2.2 GNER vs TCNER

La transcription efficace des gènes essentiels à la cellule nécessite l'élimination rapide des CPD présent dans leur brin transcrit (Mullenders 1998). La double action du GNER et du TCNER sur le brin transcrit des gènes activement transcrit permet d'atteindre ce but. (Il est a noté que la NER n'est pas couplée aux ARN polymérases I et III, i.e qu'il n'y a pas de réparation préférentielle de l'ADN mitochondrial ou du brin non-transcrit des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (Smerdon MJ 1995), (Dammann and Pfeifer 1997). Les protéines CSA et CSB (Cockayne Syndrome protein A et Cockayne Syndrome protein B) permettent le recrutement du facteur de transcription TFIIF, essentiel au NER, au site de blocage du complexe d'élongation de l'ARN polymérase II. Les protéines CSA et CSB sont impliquées dans le TCNER seulement lors de la phase d'élongation de l'ARN polymérase II (Tu, Bates, and Pfeifer 1998) puisque lors de l'initiation de la transcription, le facteur TFIIF est déjà présent au site endommagé.

Le couplage de la transcription à la réparation n'est pas unique à la voie d'excision de nucléotides. La découverte d'interactions entre la protéine MSH2 de levure et des composantes du NER (Bertrand et al. 1998) laisse supposer que le couplage de la réparation et de la transcription existe également dans le cas de la réparation des mésappariements (MMR). La voie BER comporte également une sous-voie couplée à la transcription. En effet, il a été montré que deux dommages produit par les réactifs oxygénés et réparés par le BER, soit la thymidine

glycosylée et la guanine oxydée, sont réparés plus rapidement lorsqu'elles sont localisées sur le brin transcrit que sur le brin non-transcrit (Le Page et al. 2000).

4.3.2.3 Répercussion d'une déficience dans la NER

4.3.2.3.1 *Xeroderma Pigmentosum* (XP)

La maladie nommée *Xeroderma pigmentosum* fut décrite par Hebra and Kaposi en 1874 (Hebra 1874). Elle est causée par une absence ou une diminution sévère de la capacité de l'organisme à effectuer la réparation par excision de nucléotides. Ce syndrome est divisé en 7 sous-groupes, de XPA à XPG, chacun présentant une déficience dans une protéine particulière de la cascade du NER. Les personnes atteintes de cette maladie présentent une extrême photosensibilité et un risque accru (presque 2000 fois) de développer un cancer de la peau avant l'âge de 20 ans. Les risques de cancers internes sont également augmentés de près de 20 fois chez ces patients. Les patients compris dans un groupe particulier, XPV, présentent une capacité normale à effectuer la réparation par excision de nucléotides mais sont déficients dans la voie de contournement des dommages dite sans erreur (voir section 4.4), causant une élévation du taux de mutations. Ceci produit une augmentation marquée de la fréquence des cancers de peau parmi ces patients et c'est pourquoi ils sont également regroupés sous le syndrome XP (Petit 1999).

4.3.2.3.2 Syndrome de Cockayne (CS) et Trichothiodystrophie (TTD)

Les personnes atteintes du syndrome de Cockayne présentent des déficiences au niveau transcriptionnel qui interfèrent avec la voie TCNER mais ne

démontrent aucun risque accru de développer un cancer de la peau par rapport à une personne non-atteinte (de Boer and Hoeijmakers 2000b). De plus, ces patients présentent une hypersensibilité à la fois aux radiations ionisantes et aux UV, ce qui supporte la généralité de la réparation couplée à la transcription pour les différentes voies de réparation de l'ADN. Des mutations dans les gènes CSA et CSB provoquent cette maladie. De plus, certaines mutations dans les gènes XPB, XPD et XPG donnent également lieu à un syndrome mixte XP/CS. Une déficience dans les protéines CSA ou CSB entraînerait une inhibition prolongée de la transcription suite à la réparation inefficace du brin transcrit et une sensibilité accrue des cellules par mort apoptotique (van Oosterwijk et al. 1996b; van Oosterwijk et al. 1996a).

La trichothiodistrophie est un syndrome rare, héréditaire sous forme autosomale dominante et hétérogène dont le critère diagnostique majeur est la fragilité des cheveux qui sont également déficients en souffre (de Boer and Hoeijmakers 2000b). Trois protéines sont impliquées dans ce syndrome, soit la protéine TTDA et certaines formes mutées du produit des gènes XPD et XPB. Environ 50% des patients atteints de cette maladie présentent une photosensibilité et une déficience dans la NER, bien qu'ils ne présentent pas une fréquence élevée des cancers de la peau (Stary 1996).

4.3.2.3.3 Conséquences d'une déficience dans le TCNER ou le GNER

Le TCNER et le GNER sont tous deux importants dans la réponse cellulaire aux UV mais à des niveaux différents. Ainsi, il a été déterminé que le

TCNER est le déterminant majeur dans la protection contre l'apparition de l'érythème tandis que l'immunosuppression systémique par les UV est médiée par les deux sous-voies du NER (Garssen et al. 2000). De plus, le risque accru de photocarcinogénèse est principalement dû à une déficience en GNER puisqu'une déficience en TCNER mène à la mort apoptotique et donc à l'élimination de la cellule pré-cancéreuse (van Oosten et al. 2000), (Berg et al. 2000). Ceci expliquerait la forte incidence de cancer de la peau chez les patients XP (généralement déficient en GNER) par rapport à la faible augmentation des cas de cancers de la peau des patients CS (déficient en TCNER).

4.3.3 La protéine p53 et le NER

La contribution de la protéine p53 à la voie de réparation par excision de nucléotide globale est maintenant fortement établie, que ce soit suite à une irradiation aux UV 254nm (Ford and Hanawalt 1995), (Smith and Fornace, Jr. 1997) ou encore aux UVB (Therrien et al. 1999) p53 contribue à cette voie en transactivant les gènes p48 et XPC (Hwang et al. 1999; Adimoolam and Ford 2002). Toutefois, une controverse demeure quant au rôle de p53 dans le contrôle de la voie TCNER. Certaines études soutiennent que la protéine p53 n'est pas impliquée dans cette voie (Ford and Hanawalt 1995), (Ford, Baron, and Hanawalt 1998), (Havre et al. 1995), tandis que d'autres études (Therrien et al. 1999), (Therrien et al. 2001) démontrent le contraire. Une implication de la protéine p53 dans la voie TCNER est toutefois fortement suggérée par les observations suivantes: 1) les fibroblastes dérivés de patients atteints de la maladie de Li-

fraumeni (p53 muté) sont incapables de réactiver un gène rapporteur tel que mesuré par la technique du "host-cell reactivation assay (HCA)" qui est basée sur la capacité d'une cellule à réaliser le TCNER (McKay, Winrow, and Rainbow 1997), 2) la protéine p53 est capable de s'associer avec la protéine CSB (Wang et al. 1995), 3) le promoteur de plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la GNER ou la TCNER contient une séquence de liaison pour p53 (McKay and Ljungman 1999) et finalement 4) les cellules déficientes en p53 sont incapable de reprendre la synthèse de leur ARN suite à un traitement aux UV (McKay and Ljungman 1999).

4.3.4 Méthodes utilisées pour étudier la NER

Plusieurs méthodes ont été développées afin d'étudier la réparation par excision de nucléotides et les plus utilisées sont décrites ci-après. Une des premières méthodes à être développée fut la technique de synthèse d'ADN non-prévue (unscheduled DNA synthesis ou UDS) qui mesure le taux d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN lorsque la cellule n'est pas en phase S, suivit par une autoradiographie (Painter and Cleaver 1969). La synthèse mesurée n'est donc pas due à la réplication semie-conservative, mais bien à l'étape de resynthèse du NER qui est activé par un traitement aux UV.

Une adaptation de cette méthode a mené à l'invention de la technique "BU-trick" qui est capable de mesurer la longueur du fragment excisé et resynthétisé. Deux populations de cellules sont marquées à la thymidine triciée et irradiées aux UV. Par la suite, une des deux populations est incubée dans du milieu contenant

du bromodéoxyuridine ou BrdU (un analogue de la thymidine) tandis que la deuxième est incubée dans du milieu contenant de la thymidine tritiée. Par la suite, les deux populations sont combinées et traitées aux UV 313nm (UVB) ce qui provoque la cassure de l'ADN au site d'incorporation du BrdU. Le taux de bris des régions ayant incorporé le BrdU indique la grandeur des sites réparés. (Regan, Setlow, and Ley 1971)

La technique utilisant la réactivation d'un marqueur par la cellule hôte (host cell reactivation assay ou HCRA) donne une mesure indirecte de la NER. Le principe est simple: un vecteur est traité aux UV et est ensuite introduit dans la cellule hôte. Pour qu'il y ait expression du marqueur (sous forme phagique ou encore sous forme d'un gène rapporteur), il est essentiel que ce dernier soit réparé par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides de la cellule hôte. En mesurant le pourcentage de vecteurs qui ont été réactivés, il est possible de d'estimer la capacité de la cellule hôte à procéder au NER (Boyle and Setlow 1970).

Les méthodes précédentes ne permettent ni d'étudier la réparation dans un gène précis, ni de discriminer entre la réparation survenant sur le brin transcrit de la réparation globale.

4.3.4.1 Technique basée sur le "southern-blot"

Une technique basée sur la méthode du buvardage southern permet de mesurer la réparation de l'ADN selon le brin d'intérêt mais non au niveau nucléotidique (Bohr et al. 1985). Brièvement, cette technique requiert les étapes

suivantes: 1) l'irradiation de cellules aux UV 2) l'extraction de l'ADN à des temps pré-déterminé post-irradiation, 3) le clivage de l'ADN génomique par des enzymes de restriction ne coupant pas dans le gène étudié suivi par 4) le clivage aux sites endommagés par l'enzyme T4 endonucléase V, 5) la résolution de l'ADN sur gel suivi du transfert sur membrane, 6) l'hybridation avec une sonde correspondant à un fragment du gène et du brin étudié et 7) la quantification de ce signal. La diminution dans l'intensité du signal aux différents temps de réparation par rapport à l'intensité du contrôle non irradié permet de déterminer le taux d'excision des dommages sur le fragment étudié. Contrairement à la technique LM-PCR, la technique du "southern blot" ne permet pas de mesurer la réparation au niveau de chacun des sites dipyrimidiniques le long d'un fragment d'ADN, mais plutôt sur un large fragment d'ADN comprenant plusieurs sites dipyrimidiniques.

4.3.4.2 LM-PCR

Le LM-PCR (Ligation-Mediated PCR) fut développé par Mueller et Wold (Mueller and Wold 1989) afin d'étudier *in vivo* les empreintes protéiques sur l'ADN. Elle fut également adaptée à plusieurs autres fins dont l'étude de la méthylation (Pfeifer et al. 1989) et de la réparation (Tornaletti and Pfeifer 1994). Cette technique, bien que complexe, est extrêmement sensible puisqu'elle permet de détecter une fréquence de dommage aussi faible que un dommage par 25 kb d'ADN génomique.

Le principe de la technique est simple (voir figure 6): l'ADN génomique est premièrement clivé soit chimiquement (dans le cas du séquençage génomique)

ou avec une endonucléase spécifique au dommage que l'on veut étudier (dans le cas des études de réparation). Ensuite, une première amplification est effectuée à l'aide d'une amorce complémentaire au brin et à la région d'intérêt afin de générer des fragments d'ADN double brins. Cette étape nécessite l'utilisation d'une ADN polymérase ne possédant ni activité exonucléotidique ni activité terminale transférase afin de ne générer que des fragments présentant des bouts francs. Ensuite, un fragment d'ADN double-brins asymétrique, appelé "linker" (i.e. présentant un bout franc et un bout assymétrique) est lié à chaque fragment d'ADN double-brins francs générés dans l'étape précédente à l'aide d'une ligase. Ceci entraîne la création d'une extrémité 5' de séquence connue. Les fragments d'ADN ainsi produits sont ensuite amplifiés par l'utilisation d'une amorce spécifique à la région d'intérêt reconnaissant une séquence en 3' de la région liée par la première amorce (afin d'augmenter la spécificité de la réaction) et par une amorce spécifique au linker. Ceci permet l'amplification en chaîne par un simple PCR de chaque fragments d'ADN. Finalement, les fragments sont résolus sur un gel de polyacrylamide, transférés à une membrane de nylon et détectés par une sonde radioactive spécifique à la région étudiée (Tornaletti and Pfeifer 1996). L'étude de la même région à plusieurs temps différents permettra de voir si le site est réparé et à quelle vitesse. Ainsi, la présence d'une bande dénote la formation d'un CPD au site étudié. Si ce dommage est réparé, la T4 endonucléase V ne coupera plus à ce site et ceci sera réflété par la disparition de la bande spécifique à ce site. Donc, s'il y a réparation, l'intensité des bandes diminuera en fonction du

temps de réparation. Sinon, l'intensité des bandes persistera tout au long de la période étudiée.

L'étape limitante de cette technique se situe au niveau de la conversion des dommages en cassures simple-brins contenant un phosphate en 5'. L'enzyme T4 endonucléase V reconnaît et clive spécifiquement les dimers cyclobutyliques de pyrimidines. Toutefois, cet enzyme laisse, en surplomb, une pyrimidine qui provoque un encombrement stérique, ce qui bloque l'action de la ligase. L'utilisation de la photolyase couplée aux UVA permet de photoréactiver le double lien covalent du dimer et ainsi de libérer la pyrimidine en surplomb, ne laissant qu'un bout 5' éligible pour la ligation (Tornaletti and Pfeifer 1996).

Cette technique présente l'avantage de permettre l'étude, de façon quantitative, de l'étape d'excision de la réparation, et ce *in vivo*, de n'importe quel dommage pouvant être converti en bris simple-brins ligables. De plus, elle permet de visualiser la réparation de sites particuliers et donc d'étudier des facteurs tels la présence de nucléosomes ou encore la séquence nucléotidique environnante sur la réparation d'un site précis.

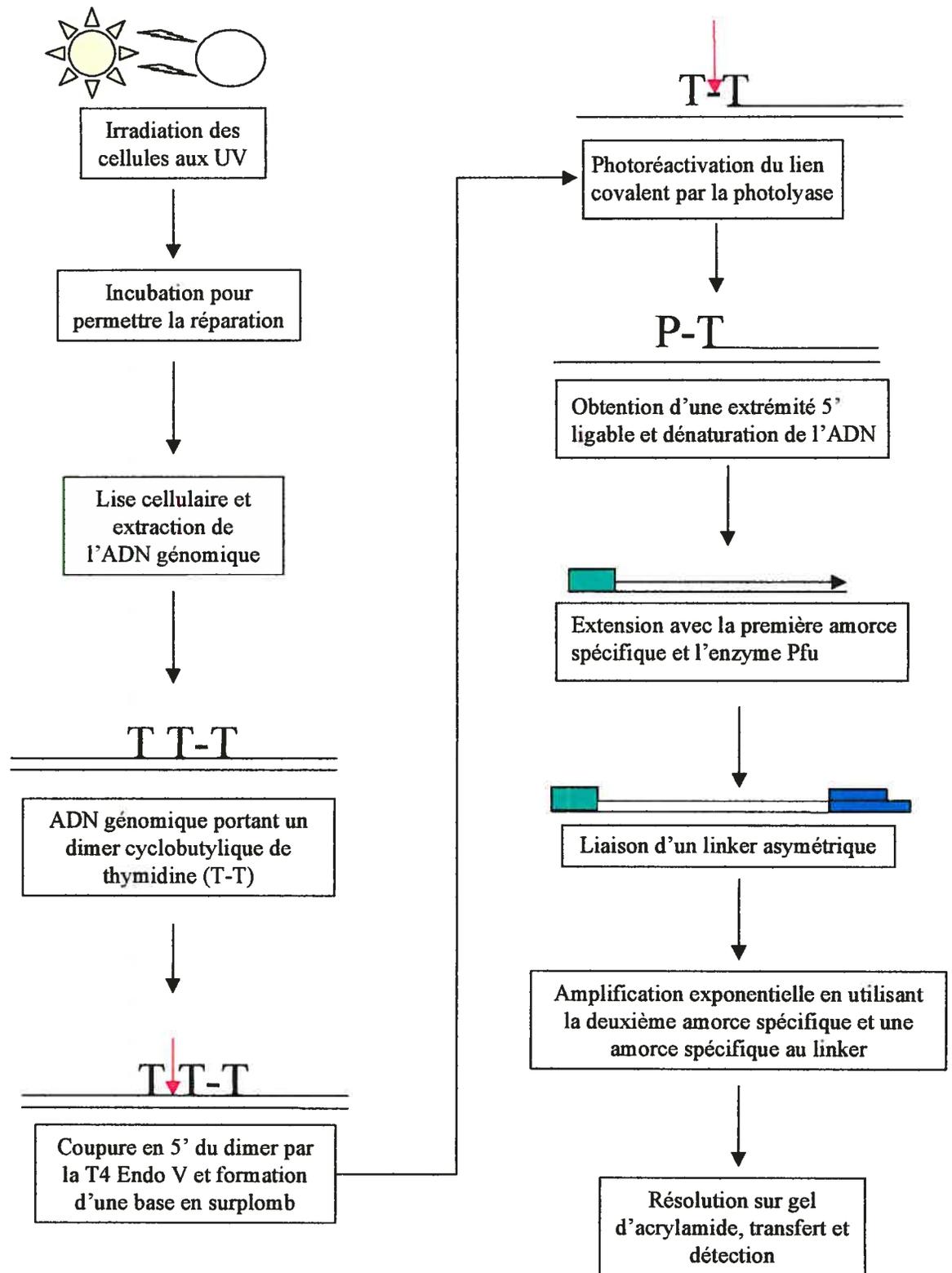


Figure 6 Le LM-PCR

Voir le texte pour une description de la technique.

4.4 La tolérance aux dommages à l'ADN

Si les dommages induits par les UV ne sont pas réparés avant l'entrée en phase S, ils imposeront un blocage à la machinerie de réplication qui devra être résolu sans quoi la cellule ne pourra compléter la duplication de son matériel génétique (Prakash and Prakash 2002).

Chez l'humain, il a été montré que l'utilisation du "template switching" (utilisation du brin nouvellement synthétisé comme modèle pour la réplication du brin endommagé) n'est que peu utilisé pour contourner les dommages même si ce mécanisme a l'avantage d'être sans erreur. Une étude récente a estimé que la tolérance aux dimères de thymidines est atteinte, chez l'humain, dans environ 80 à 90% des cas par l'utilisation des polymérases spécifiques pour le contournement des dommages et que le 10 à 20% restant est effectué par la méthode du "template switching" (Nikolaishvili-Feinberg and Cordeiro-Stone 2000). Il est important de reconnaître que cette activité ne répare pas le dommage: elle permet simplement à la cellule de compléter la réplication.

L'utilisation d'un mécanisme faussement nommé "réparation par recombinaison" est également utilisé, chez les organismes inférieurs, pour compléter la réplication lorsque la machinerie répliquative rencontre un dommage. En fait, ce mécanisme permet simplement l'utilisation, par la formation d'un intermédiaire de réplication, du brin nouvellement formé comme "template" pour compléter la réplication (Kuzminov 1999) mais ne répare pas le dommage. Contrairement au mécanisme précédent qui n'implique pas de dissociation de la polymérase, la réparation par recombinaison survient suite à la dissociation de la

polymérase de l'ADN et à la réinitialisation de la réplication en 3' du dommage (Kuzminov 1999).

Les polymérases responsables de la réplication semi-conservative de l'ADN (les polymérases delta et epsilon) sont peu habiles pour contourner les photoproduits présents dans l'ADN. Le contournement des CPD peut être exécuté par l'action concertée des polymérases zéta (Gibbs et al. 1998), (Xiao et al. 1998) et iota (Tissier et al. 2000) (dites avec erreur) ou encore par la polymérase étha (Svoboda, Briley, and Vos 1998), (Yuan et al. 2000) (dites sans erreur). Ces polymérases sont soit faiblement processives ou simplement distributives, i.e. qu'elles se dissocient de l'ADN après avoir catalysé la polymérisation de seulement quelques nucléotides, ce qui favorise l'échange entre les polymérases processives (pol delta et epsilon) d'avec ces nouvelles polymérases. Une fois le dommage contourné, la réplication semie-conservative normale peut reprendre ce qui permet à la cellule de survivre.

4.5 La spécificité des mutations induites par les UV

La spécificité des mutations découlant des dommages de type 6-4PP et des CPD fut déterminée à la fois par des études *in vitro* et *in vivo*. Comme mentionné plus haut, les photoproduits 6-4 sont très rapidement réparés par le NER.

Toutefois, lorsqu'ils sont présents dans l'ADN lors de la réplication, ils ne peuvent être contournés par la polymérase étha et sont donc contournés par la polymérase zéta, ce qui les rend intrinsèquement très mutagéniques. Les modèles moléculaires traitant de ce photoproduit prédit que la base en 5' ne devrait pas

perdre son pouvoir codant, tandis que la base en 3', étant repliée à 90° hors de l'hélice d'ADN devrait être reconnue comme étant un site abasique et donc ne possédant aucun pouvoir codant (Brash 1988). L'équipe de Johnson (Johnson et al. 2000) a montré que la polymérase iota est capable d'insérer un A en face de la base en 3' et que ce mésappariement est ensuite étendu par la polymérase zéta afin de compléter le contournement du dommage. Ceci mènerait donc à la formation d'une mutation de type C→T, soit la signature moléculaire des UV.

Il a été montré que la présence des CPD n'induit que peu de mutations. Toutefois, comme ils sont moins bien réparés que les 6-4PP, ils sont tout de même la principale source de mutations dans une cellule irradiée aux UV. En fait, l'équipe de Lawrence a démontré (Horsfall, Borden, and Lawrence 1997) que la réplication d'un plasmide contenant un dimer TC, TT ou UU mène à une mutation dans 5% des évènements de contournement. Ceci est maintenant expliqué par la très forte affinité de la polymérase θ pour les CPD et l'implication de cette polymérase dans le contournement des dommages dit "sans erreurs". Les CPD mènent majoritairement à la formation de mutations de type C→T.

Il a clairement été déterminé que la séquence primaire de l'ADN environnant un site particulier joue un rôle primordial dans la formation préférentielle de mutations à ce site (Benzer S 1961). Ainsi, plusieurs études ont montré que la séquence entourant le site dipyrimidique n'influence que peu la déposition des dommages mais influence la réparation et/ou le contournement des dommages (Fuchs RPP 1984), (Cariello NF 1993), (Levy DD 1996). Les facteurs modulant la formation d'une mutation à un site donné incluent la quantité de

dommages induits à un site particulier, la phase du cycle cellulaire (G1 vs S) dans laquelle la cellule se trouve au moment de l'irradiation, l'affinité du système de réparation à reconnaître et enlever le dommage à ce site ainsi que l'efficacité des polymérases spécialisées à contourner le dommage.

L'étude du patron de mutation induit par un agent donné peut quelque fois nous renseigner sur les dommages induits par ce dernier ou encore sur les voies de réparation ou de contournement utilisées par la cellule pour faire face à une telle agression. Ce patron de mutation se nomme un spectre de mutation et est classiquement défini comme suit: "distribution séquence-dépendante des différents types de mutations induits par un agent mutagénique dans un gène donné" (Pfeifer 2000). Comme mentionné dans la première partie de l'introduction, les différentes régions des UV ont des effets similaires mais présentent également des différences importantes. De plus, certaines longueur d'ondes peuvent collaborer afin de promouvoir la formation de cancer de la peau, tel que démontré chez la souris (Berg, de Gruijl, and van der Leun 1993)) ou encore pour induire une série particulière de gènes qui mèneront à la modulation du spectre de mutation retrouvé à un gène donné dans un organisme précis. Afin de déterminer si la spécificité des mutations est modulée par de telles interactions, notre laboratoire a déterminé les spectres de mutations produit au locus *aprt* de cellules de hamster par les UVA, les UVB, les UV 254nm ainsi que par la lumière solaire simulée et les a comparés entre eux (Drobetsky, Turcotte, and Chateaufneuf 1995). Les deux conclusions majeures qui ressortent de ce travail sont les suivantes: premièrement, le spectre de mutations pour chaque région des UV est

unique. Deuxièmement, les différentes régions des UV constituant la lumière solaire simulée contribuent également, mais de façon différente, à la spécificité du spectre produit. Cette étude démontre l'importance d'étudier les longueurs d'ondes appropriées lors d'études biologiques.

5 Mise en situation

Tel que mentionné précédemment, le gène p53 joue un rôle important dans l'éthiologie des cancers induits par les UV. La carcinogénèse est un processus complexe comportant plusieurs étapes et nécessitant l'inactivation de plusieurs voies biochimiques ayant toutes pour but la préservation de l'intégrité génomique, i.e. l'apoptose, la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Aucune des études destinées à comprendre le rôle complexe de la protéine p53 dans ces processus n'a regardé toutes ces voies dans un seul et même système isogénique. Ceci représente un problème majeur puisqu'il est connu que plusieurs de ces voies sont inter-reliées et que leur régulation est dépendante du type cellulaire étudié. Par exemple, il est montré que les fibroblastes sont plus enclins à déclencher un arrêt de leur cycle cellulaire en G1 suite à un traitement aux UV alors que les lymphocytes, eux, préféreront induire l'apoptose suite à ce même traitement. Il est donc primordial d'étudier le niveau de chacune de ces réponses dans un même système isogénique (i.e. ne différant que par le statut du gène p53) afin de bien comprendre l'influence de chacune de ces voies sur la photocarcinogénèse.

6 Objectif global et secondaires

L'objectif global de cette thèse est de décrire, de façon détaillée, les changements phénotypiques associés à l'abolition de l'expression de la protéine p53 dans un modèle isogénique humain. Ceci permettra de jeter un éclairage unifié sur différentes contradictions rapportées dans la littérature qui sont probablement dues à l'utilisation de modèles non-isogéniques. Trois grands objectifs secondaires découlent de ce projet.

L'expression de l'oncoprotéine HPV 16 E6 comme moyen d'inactivation de la protéine p53 est largement utilisé, même s'il existe de nombreuses contradictions entre la réponse d'un modèle utilisant HPV E6 comme moyen d'inactivation de p53 de celui utilisant une inactivation génétique de cette même protéine. Il est important de déterminer si l'inactivation de la protéine p53 par l'expression de l'oncoprotéine E6 reflète adéquatement l'abolition de la protéine p53 et ce en comparant les diverses réponses génotoxiques d'un système isogénique de cellules humaines traitées aux UV. Ceci constitue donc le premier objectif secondaire du présent travail.

Deuxièmement, cette thèse vise à répondre à la question suivante: "Est-ce que les UV 254nm sont un modèle approprié pour l'étude de la réponse génotoxique des UV chez les cellules humaines?" Afin de répondre à cette question, les études rapportées dans la présente thèse décriront et compareront les réponses d'une lignée cellulaire humaine suite à un traitement aux UV 254nm *versus* à un traitement aux radiations plus physiologiques soit les UVB ou la lumière solaire simulée.

Le troisième objectif secondaire vise à comprendre l'implication de la protéine p53 dans la voie de la réparation par excision de nucléotides, autant au niveau global que lorsque couplée à la transcription ainsi qu'à définir son implication dans la détermination de la spécificité des mutations induites par les UV. Plusieurs éléments pourraient aider à expliquer le paradoxe entourant le rôle de la protéine p53 dans la TCNER. Premièrement, la longueur d'onde utilisée varie selon les études. Ces dernières utilisent également des techniques différentes pour mesurer la réparation. Finalement, l'analyse de la contribution de la protéine p53 à la réparation par excision de nucléotides couplés à la transcription devra être réalisée en parallèle avec une seule méthode mais en regardant à la fois les UVB et les UVC afin de résoudre ce dilemme. Plusieurs études ont montré que le niveau de réparation des dommages induits par les UV est diminué en absence de la protéine p53 mais il reste à déterminer si cette déficience influence également le spectre de mutations suite à ce traitement. Cette question n'a pas encore été résolue. Toutefois, des études réalisées avec divers agents mutagéniques ont montré que bien que la protéine p53 influence la qualité de la réparation, elle n'influence pas le type de mutation produite (Sands et al. 1995); (Yamagishi et al. 1997); (Buettner et al. 1997); (Courtemanche and Anderson 1999). Il est intéressant de remarquer que des études précédentes ont montré que la localisation des sites fortement mutés par divers mutagènes varie selon le statut du gène p53 (Sands et al. 1995); (Yamagishi et al. 1997); (Buettner et al. 1997); (Courtemanche and Anderson 1999). Il reste donc à déterminer si cette observation est aussi applicable dans le cas d'un traitement au SSL.

7 Choix du modèle expérimental

Deux critères se sont révélés primordiaux dans le choix du système cellulaire humain à utiliser pour cette étude, soit 1) la stabilité génétique des lignées étudiées et 2) la possibilité d'obtenir un système cellulaire humain réellement isogénique. Notre choix s'est arrêté sur le système dérivée de la lignée TK6 puisqu'il répond parfaitement à ces deux critères.

Premièrement, dans la lignée TK6, le karyotype et le génotype de plusieurs gènes importants pour cette étude sont très bien caractérisés. Ainsi, il est établi que la lignée TK6 présente peu de réarrangements, soit seulement une trisomie du chromosome 13, deux marqueurs chromosomiques, soit 14q+ et 21p+ (impliquant une translocation avec le chromosome 6 résultant en une duplication partielle de ce chromosome) et une bande supplémentaire sur le bras court du chromosome X à la position Xp22. Malgré ces anomalies, des études plus poussées ont révélé qu'aucun des oncogènes étudiés (donc c-myc, src et bcl-2) n'était impliqué dans une translocation (Yandell and Little 1986). De plus, les gènes p53 et pRb ont été directement séquencés et se sont révélés normaux et fonctionnels (Little et al. 1995), (Xia et al. 1995), (Zhen et al. 1995).

Deuxièmement, un système cellulaire isogénique dérivé de la lignée TK6 et présentant les mêmes caractéristiques de croissance que la lignée mère est disponible. Il comprend les lignées TK6-5E (lignée contrôle TK6-20C) obtenue par transfection d'un rétrovirus exprimant fortement l'oncoprotéine HPV E6 (ou le vecteur seul) et NH32 (lignée contrôle TK6) présentant un "knockout" de p53

réalisé par recombinaison homologue (Yu, Li, and Little 1997), (Chuang et al. 1999).

Dans la présente étude, nous avons voulu étudier l'effet biologique des UV pénétrant la couche d'ozone et parvenant jusqu'à la terre. Le meilleur modèle expérimental commercialement disponible pour se faire était constitué, à l'époque, d'une lampe à haute énergie (décrite plus en détails dans la section "matériel et méthode" du chapitre 2) couplée à l'utilisation d'un filtre de verre reproduisant l'effet de la couche d'ozone. Le spectre filtré ainsi produit sera dorénavant nommé "lumière solaire simulée" ou SSL. Le mutagène modèle UV 254nm est toujours largement utilisé et une vaste base de données décrivant l'effet de cette longueur d'ondes dans divers organismes est disponible pour la communauté scientifique. Toutefois, comme cette longueur d'onde est bloquée par la couche d'ozone, la validité biologique des effets observés lors de l'utilisation des UV 254nm est questionnable. Donc, afin de déterminer la validité de ce mutagène modèle, nous avons réalisé la majorité des expériences suivantes aussi bien avec les UV 254nm que le SSL et nous avons comparé les réponses obtenus.

Chapitre 2: Premier article découlant de mes recherches

Article publié dans la revue scientifique "Carcinogenesis" (vol.23, no.10, pp.1631-1639, 2002) et intitulé:

"Modulation of the DNA damage response in UV-exposed human lymphoblastoid cells through genetic versus functional- inactivation of the p53 tumor suppressor."

Par Caroline Léger et Elliot A. Drobetsky

Nature de la participation à l'article: J'ai réalisé et analysé toutes les expériences dont les résultats figurent dans cet article. J'ai également contribué à la rédaction de l'article.

RÉSUMÉ

La réponse cellulaire globale aux dommages à l'ADN induits par les UV a été analysée dans la lignée lymphoblastique humaine TK6 comparativement à deux lignées isogéniques dérivées de TK6 dans lesquelles la protéine p53 a été inactivée en utilisant diverses approches expérimentales soit (i) NH32, contenant une inactivation génétique par "knockout" de p53 et (ii) TK6-5E, exprimant l'oncoprotéine E6 du virus du papillome humain qui lie et inactive de façon fonctionnelle la protéine p53. Même si ce dernier modèle est largement utilisé, la fidélité avec laquelle il reproduit l'état de déficience en p53 demeure incertain. Suite à une irradiation aux UV (254nm UV ou lumière solaire simulée à large spectre), la lignée NH32 déficiente en p53 présente une survie clonogénique et une cinétique de progression en G1-S virtuellement identique à la lignée sauvage TK6 tout en montrant, comparativement à la lignée sauvage, une résistance profonde à l'apoptose induite par ces traitements. Toutefois, des différences qualitatives et quantitatives importantes ont été montrées entre la lignée NH32 et la lignée TK6, quant à la mutagenèse induite au gène de l'hypoxanthinephosphoribosyltransférase. De plus, des différences importantes ont été observées entre la lignée génétiquement déficiente en p53 (NH32) et la lignée exprimant l'oncoprotéine E6 (TK6-5E) dans la manière dont elles répondent au stress génotoxique induit par les UV et ce comparativement à la lignée sauvage TK6. En effet, bien que les lignées NH32 et TK6-5E se comportent de façon similaire en ce qui a trait à la mutagenèse induite par les UV au locus HPRT, des différences significatives ont été observées entre ces deux lignées quant à la survie

clonogénique, l'apoptose et la progression G1-S. Par l'utilisation d'un système isogénique bien défini, nos résultats révèlent clairement l'influence de l'inactivation de p53 sur la réponse globale des cellules humaines aux dommages induits par les UV et soulignent une faiblesse majeure dans le domaine de la biologie de p53 en montrant directement que le mode d'inactivation de p53 par expression de l'oncoprotéine E6 ne reproduit pas toujours fidèlement les résultats obtenus par le modèle d'inactivation génétique de p53.

ABSTRACT

The global cellular response to UV-induced DNA damage has been analyzed in the p53-proficient human lymphoblastoid strain TK6 vs. two isogenic derivatives wherein p53 activity was abrogated by diverse experimental approaches: (i) NH32, carrying a homozygous genetic knockout of *p53*; and (ii) TK6-5E, expressing the human papillomavirus E6 oncoprotein which binds and functionally inactivates p53 protein. Although widely employed as such, the extent to which intracellular E6 expression faithfully models the p53 deficient state still remains uncertain. Following irradiation with UV (either monochromatic 254-nm UV or broad-spectrum simulated sunlight), relative to wild-type TK6, p53-null NH32 exhibited virtually identical clonogenic survival and kinetics of G1-S progression but was nonetheless profoundly resistant to apoptosis. In addition, there were significant qualitative and quantitative differences between NH32 and TK6 with respect to UV mutagenesis at the endogenous hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hprt*) locus. However, important disparities were observed between genetically-p53-deficient NH32 and E6-expressing TK6-5E regarding the manner in which they responded to UV-induced genotoxic stress in relation to wild-type TK6. Indeed, although NH32 and TK6-5E behaved similarly with respect to UV mutagenesis at the *hprt* locus, there were significant differences between these strains in clonogenic survival, apoptosis, and G1-S progression. Using a well-defined isogenic system, our data clearly reveal the influence of p53 inactivation on the global response of human cells to UV-induced DNA damage, and highlight an important caveat in the field

of p53 biology by directly demonstrating that this influence varies substantially depending upon whether p53 function is abrogated genetically, or through E6 oncoprotein expression.

INTRODUCTION

Following exposure to diverse genotoxic agents including UV and ionizing radiation (IR), the p53 tumor suppressor accumulates *via* post-translational stabilization, and becomes further activated by way of structural modifications such as phosphorylation and acetylation (1). p53 then maintains genomic stability and guards against neoplastic transformation through transactivation of genes, and through protein-protein interactions, that regulate growth arrest, apoptosis, and DNA repair. The pivotal role of p53 inactivation in multistage carcinogenesis is exemplified by the molecular etiology of sunlight-associated skin cancer. Specifically, it has been demonstrated that incipient exposures to solar UV generate highly genotoxic dipyrimidine-type photoproducts in DNA that are the principal causes of mutations in the *p53* gene of individual skin cells (tumor initiation) (2,3). Subsequent exposures to sunlight then favor the clonal expansion of such genetically-unstable *p53*-mutated cells (tumor promotion), because these cells, relative to the surrounding *p53*-wild type counterparts, have reduced propensity to be eliminated *via* apoptosis following the acquisition of solar UV-induced DNA damage (4,5).

Besides through loss of apoptotic capacity, inactivation of p53 would also be expected to favor photocarcinogenesis through a reduction in cellular DNA repair efficiency. Indeed, different lines of evidence demonstrate that p53 regulates nucleotide excision repair (NER) (6-8), a critical antineoplastic pathway that is essential for removing highly-genotoxic helix-distorting DNA lesions, including UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD). NER is comprised

of two overlapping subpathways that differ only in the initial (lesion-recognition) step: (i) global NER (GNER), which removes DNA adducts from virtually anywhere in the genome and- (ii) transcription-coupled NER (TCNER) that accomplishes more rapid repair of lesions located uniquely on the transcribed strand of active genes (9). Despite the general accord that functional p53 is essential for efficient NER, it remains controversial whether this tumor suppressor regulates GNER only, vs. both GNER and TCNER (see Discussion).

Following exposure to DNA damaging agents, the G1 cell-cycle checkpoint apparently allows more time for DNA repair prior to S phase, thereby forestalling the replication of damaged DNA templates and protecting against mutagenesis and carcinogenesis. In the case of cells exposed to IR, the critical involvement of p53 in G1 arrest, *i.e.*, *via* transcriptional upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{waf1} and consequent dephosphorylation of the retinoblastoma tumor suppressor, has been unequivocally established (10-12). However, it is now becoming increasingly evident that the initiation of G1 arrest may not depend on the p53/p21^{waf1} pathway in 254nm UV-exposed human cells (13).

The capacity of various high-risk human papillomavirus (HPV) subtypes to promote anogenital- and other squamous cell-carcinomas is exerted largely through intracellular expression of the HPV-encoded E6 oncoprotein (14). E6 expression strongly stimulates the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of p53, thereby efficiently inhibiting the latter's ability to accumulate and transactivate downstream effectors (15). Furthermore, exogenous expression of

E6 in cultured cells leads to clear manifestations of defective p53-dependent DNA damage processing, including abrogation of cell cycle checkpoints and apoptosis (16), as well as reduced NER capacity (7,17). As such, E6 expression has been extensively employed as a model for characterizing the influence of p53 inactivation on the cellular response to DNA damage. However E6 has also been shown to modulate the activity of a plethora of proteins aside from p53 (18), and indeed, the extent to which intracellular expression of this viral oncoprotein reflects a true p53-null phenotype following mutagen exposure is still not clear.

To further elucidate the influence of genetic- vs. E6-mediated-inactivation of p53 in the cellular response to UV, we employed the p53-proficient human lymphoblastoid strain TK6 (19), as well as two isogenic derivatives, *i.e.*, TK6-5E wherein p53 protein is functionally inactivated *via* intracellular E6 oncoprotein expression (20), and NH32 which carries a homozygous knockout of the *p53* gene (21). The TK6 lymphoblastoid system was chosen due to its status as an extremely well-characterized human cultured cell model for probing the response to genotoxic agents, and the fundamental role of p53 in this process. In addition, we highlight recent evidence demonstrating that UV exposure can strongly induce lymphoid tumours in mice in a p53-dependent manner (22). Among the three TK6-derived strains, cytotoxicity, mutagenesis, apoptosis, and cell cycle arrest were each quantitatively compared following irradiation with different UV wavelengths, *i.e.*, the model mutagen 254 nm UV, as well as broad-spectrum simulated sunlight (SSL) which is designed to mimic terrestrial solar light (composed of UVB + UVA + visible light, and virtually devoid of wavelengths

below 290-nm). In addition, to qualitatively evaluate the role of p53 in UV mutagenesis, we determined the DNA sequence specificity of SSL-induced mutations at the chromosomal hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hprt*) locus in each TK6-derived strain. This detailed comparison in a model isogenic system has permitted a rigorous analysis of p53-dependent DNA damage processing in UV-exposed human cells, as well as direct assessment of the general relevance of E6 expression as a paradigm for investigating the phenotypic consequences of p53 inactivation.

MATERIAL AND METHODS

Cell strains

The wild-type p53^{+/+} human lymphoblastoid strain TK6, and NH32, *i.e.*, a homozygous p53-knockout derivative of TK6, were generous gifts of Dr. H.L. Liber (Massachusetts General Hospital). The functionally-p53-deficient strain TK6-5E, which constitutively expresses the high-risk HPV16E6 oncoprotein, and its p53^{+/+} counterpart TK6-20C (equivalent to wild-type TK6 but carrying an empty expression vector) were kindly provided by Dr. J.B. Little (Harvard School of Public Health). All strains were routinely maintained in suspension 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.

Irradiation conditions

Prior to irradiation with 254-nm UV, SSL, or IR, exponentially-growing cells were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), resuspended in 5 ml PBS, and added to 100-mm culture dishes on ice. Cells were treated with 254-nm UV light using a Philips G25T8 germicidal lamp, at a fluence of 0.2 Jm⁻²s⁻¹ as measured by a DRC 100X digital radiometer (Spectroline Corp.) In the case of IR, cells were exposed to a cesium¹³⁷ source (Gamma Cell; Atomic Energy Canada) at a dose rate of 6.3 rad/s. For SSL exposure, cells were irradiated using a solar simulator equipped with a 2500 W xenon compact arc lamp (Conrad-Hanovia Inc., Newark, NJ), at a fluence of 2 kJm⁻²s⁻¹ according to a YSI-Kettering 65A radiometer (Yellow Springs Instruments, OH). The spectral characteristics and

genotoxic effects of the SSL source employed here have been described in detail previously (23). Briefly, the incident SSL was rigorously purified using 3-mm-thick glass filters (type WG 320; Schott, Germany), in order to virtually eliminate contaminating wavelengths from the UVC region (*i.e.*, below 290-nm). As estimated using the filter transmission- and solar lamp spectral-profiles supplied by the manufacturers, the incident SSL was comprised of $<10^{-7}$ % UVC, 0.8% UVB, 6% UVA, 43% visible light, and 47% infrared. These same proportions for terrestrial sunlight at sea level are approximately $<10^{-7}$ %, 0.3%, 5%, 62%, and 32% respectively (24).

Western blotting

2×10^6 cells were added to 60-mm dishes and immediately irradiated (or mock-irradiated) with 150 rad of IR. Following incubation for 3 hr, cells were extracted in radioimmuno-precipitation assay buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40 and 1% sodium deoxycholate), containing 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, and 1 μ M Na_3VO_4 , followed by sonication, and clarification by centrifugation. Protein content was determined using the bicinchoninate assay (Pierce) according to manufacturer's specifications. Aliquots containing 50 μ g of protein were resolved on 7.5 % acrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk/PBS containing 0.1% (w/v) sodium azide, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against p53 (DO-1, Santa Cruz Biotechnology) or p21

(Ab-1, Calbiochem), diluted 1:5000, and 1:800, respectively, in 1% (w/v) milk/PBS. The proteins were detected by chemiluminescence using a secondary antimouse-antibody coupled to horseradish peroxidase (Amersham).

Clonogenic survival

Clonogenic survival was determined according to DeLuca *et al.* (25). Immediately following irradiation with 254-nm UV, SSL, or IR, 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. Clonogenic survival was calculated on the basis of a Poisson distribution. Results are expressed as the average \pm SEM of at least 4 independent experiments.

Apoptosis analysis

Apoptosis was measured by double staining with Hoechst 33342 and propidium iodide (PI; Molecular Probes) as previously described for strain TK6 (26). Briefly, 2×10^6 cells were irradiated in exponential growth phase with equitoxic doses of 254-nm UV, SSL, or IR and incubated in regular growth medium for 24, 48, 72, or 96 hr. 5×10^5 cells were then thoroughly washed with PBS and incubated for 15 minutes at 37°C in the dark in 100 μ l of PBS + 1 μ g/ml Hoescht 33342. The cells were 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 at least 4 independent experiments.

Cell cycle analysis

2×10^6 cells were irradiated with equitoxic doses of 254-nm UV, SSL, or IR during exponential growth, followed immediately by addition of the mitotic inhibitor colcemid (1 μ M final concentration) to block the reentry of cells into G1. At various time points following addition of colcemid, irradiated or mock-treated cells were washed with PBS containing 50 mM EDTA, resuspended in 1 ml of PBS/EDTA, and then fixed by addition of 3 ml ice-cold 100% ethanol. Cells were then pelleted, washed with 4 ml of PBS/EDTA, and stained with modified Krishan buffer (0.05 mg/ml PI, 0.1% sodium citrate, 0.2 mg/ml RNase A, and 0.3% (v/v) NP40). The fraction of the population in each phase of the cell cycle was then determined as a function of DNA content using a FACScan flow cytometer equipped with CellFit software (Beckton Dickenson). The delay in G1-S progression is expressed as the percentage of cells remaining in the G0/G1 compartment over time. Each time point represents the average \pm SEM of at least 3 independent experiments.

Mutation frequency at the chromosomal *hprt* locus

Bulk cultures of TK6, NH32 or TK6-5E were grown for 2 days in RPMI medium supplemented with CHAT (2x10⁻⁵ M cytidine, 2x10⁻⁴ M hypoxanthine, 2x10⁻⁷ M aminopterin, and 2x10⁻⁵ M thymidine) in order to reduce the background

level of *hprt*⁻ mutants. CHAT-treated strains were then propagated for 3 days in regular medium, after which appropriate numbers of cells were added to 100-mm dishes and irradiated with various doses of 254-nm UV, SSL, or IR. At least 2×10^6 surviving cells from treated cultures were maintained for 7 days in normal RPMI medium to allow expression of the *hprt*⁻ phenotype. To select for *hprt*⁻ mutants, at least 7.5×10^6 treated cells were then seeded in 96 well dishes (40,000 cells/well) in RPMI medium supplemented with the purine analogue 6-thioguanine (6-tg) at concentrations of 0.9 $\mu\text{g/ml}$ for TK6 and TK6-5E, and 10 $\mu\text{g/ml}$ for NH32 (See Results section for explanation of this 6-tg dose differential). Dishes were incubated for 21 days and scored for colony formation. Mutant frequencies were calculated according to a Poisson distribution as described previously (27). Results are expressed as the average \pm SEM of at least 3 independent experiments.

DNA sequence characterization of SSL-induced *hprt*⁻ mutants

A total of 49, 40, and 52 independent *hprt*⁻ mutants for TK6, NH32, TK6-5E, respectively were isolated following exposure to 500kJm^{-2} of SSL, and characterized at the cDNA sequence level. For each mutant, total RNA was extracted from 5×10^5 cells using TRIzol reagent (Gibco BRL), and quantified by spectrophotometry. Two micrograms of RNA were then used as template for reverse transcription in a reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 500 μM of each dNTP, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ of oligo d(T)₁₂₋₁₈, 1 U/ μl of RNAsin, and 2.5 U/ μl of M-MuLV reverse

transcriptase. After 1 hr incubation at 37°C, the following reagents were added directly to the reaction tube (total final volume 50 µl) : 400µM of each dNTP (Gibco BRL), 0.5 ng/µl of primers PCR-1 and PCR-4 (sequence is given below), 2.5 U of Taq polymerase (Gibco BRL), and 5 µl of 10X PCR buffer. This mixture was submitted to the following PCR reaction: 94 °C (1 min), 55 °C (1 min), and 72 °C (2 min) for 30 cycles, followed by 1 cycle of 72 °C (7 min). From this first PCR reaction, 1µl was then added to the following reaction mix (final volume 50 µl): 2 µl of each dNTP (10mM stock), 5 µl of PCR buffer 10X, 2.5 U of Taq polymerase (Gibco BRL), and 2.5 µl of primers PCR-2 and PCR-3 (1.0 OD stock concentration). This mix was submitted to the following PCR reaction : 94 °C (1 min), 55 °C (2 min), and 72 °C (2 min) for 30 cycles. Following the above nested PCR amplification procedure, aliquots were visualized by agarose gel electrophoresis to ensure the presence of an hprt cDNA. Dideoxy sequencing of each mutant cDNA was performed using a Taq polymerase-based cycle sequencing protocol using the primers below.

Primers for RT-PCR:

PCR-1 :5'-CTGCTCCGCCACCGGCTTCC-3'

PCR-2 : 5'-GATAATTTTACTGGCGATGT-3'

PCR-3 : 5'-CCTGAGCAGTCAGCCCGCGC-3'

PCR-4 : 5'-CAA TAGGACTCCAGATGTTT-3'

Primers for dideoxy sequencing:

hhSEQ-1 :5'-CTATCACTATTTCTATTTCAGTG-3'

hhSEQ-2 : 5'-AAGGAGATGGGAGGCCATC-3'

hhSEQ-3 : 5'-GTGGAAGATATAATTGACACTGG-3'

hhSEQ-4 :5'-GGATTATACTGCCTGACCAAG-3'

RESULTS

Expression of p53 and p21^{waf1} in p53-proficient vs. -deficient human lymphoblastoid strains

In order to investigate the role of p53, and of E6 oncoprotein expression, in the cellular response to UV, matched pairs of isogenic human lymphoblastoid cell strains were used: (1) the p53^{+/+} human lymphoblastoid strain TK6 vs. NH32, *i.e.*, a homozygous p53-knockout derivative of TK6; and (2) the p53^{+/+} strain TK6-20C (identical to wild-type TK6 but carrying an empty expression vector) vs. its functionally p53-deficient counterpart TK6-5E, which constitutively expresses E6. For all experiments described currently, both TK6-20C and TK6 were analyzed in parallel with NH32 and TK6-5E. The former two p53-proficient strains behaved virtually identically in every manner, *i.e.*, expression of the empty expression plasmid in TK6 apparently did not significantly impact the p53-regulated response to UV. As such, we hereafter show only those results obtained for TK6 (with the sole exception of Figure 1 where TK6-20C is depicted; see immediately below).

To confirm the p53 status of the human lymphoblastoid strains employed in the current study, Western blotting was used to investigate intracellular expression of p53, and of the p53 downstream effector p21^{waf1}, before and after exposure to IR (Figure 1). As expected, in p53^{+/+} TK6-20C the basal level of p53 protein was substantially increased 3 hr following exposure to 150 rad of IR, whereas no p53 protein could be detected in p53-null NH32 either before or after IR treatment. In the case of E6-expressing TK6-5E, a barely detectable amount of

basal p53 protein expression was noted. This amount was increased after IR exposure, although to a level well below that corresponding to basal expression in wild-type TK6-20C cells. Levels of p21waf1 expression were consistent with the p53 status of each strain, *i.e.*, p21waf1 was significantly upregulated in TK6-20C cells 3 hr following exposure to 150 rad of IR. Moreover, in accord with previous studies (20,21), neither basal nor IR-induced p21waf1 protein expression could be detected in either TK6-5E or NH32 showing that both of these strains are deficient in the upregulation of p53 downstream effectors following mutagen treatment. Following exposure to UV, the pattern of p53/p21 induction was consistent with that observed after IR (data not shown). Finally, it should be noted that TK6-5E exhibited total abrogation of the p53-dependent G1 arrest after exposure to IR (see below), further attesting to the fact that this strain is functionally p53-deficient.

Clonogenic survival in p53-proficient vs. -deficient human lymphoblastoid strains

To assess the influence of p53 on the cytotoxic effects of UV, we evaluated clonogenic survival for each of TK6, NH32, and TK6-5E after irradiation with approximately equitoxic dose ranges of SSL (0-750 kJm⁻²), 254-nm UV (0-7.5 Jm⁻²) or IR (0-400 rads). We note that IR was included as a control for most of the experiments in the current study, as this model mutagen has already been extensively employed for studies of p53-dependent DNA damage processing in the TK6 lymphoblastoid system (see references throughout). In the

case of IR treatment, there was no difference in survival between TK6, NH32, and TK6-5E (Figure 2A), in accord with previous studies on these strains (20,21). Following exposure to either 254-nm UV or SSL, wild-type TK6 and p53-null NH32 again displayed virtually identical levels of cellular resistance; however, E6-expressing TK6-5E was moderately but significantly hypersensitive (Figure 2B and C).

Apoptosis in p53-proficient vs. -deficient human lymphoblastoid strains

We next determined the kinetics of apoptosis in each strain following treatment with equitoxic doses of SSL (750 kJm^{-2}), 254-nm UV (7.5 Jm^{-2}), and IR (500 rad), using a technique based on Hoechst/PI staining coupled to FACS analysis. NH32 manifested profoundly reduced IR-induced apoptosis compared with TK6 during the entire 96 hr period analyzed (Figure 3A). However as previously reported (20), we observed that IR-induced programmed cell death was merely delayed in TK6-5E, *i.e.*, unlike the situation for NH32, the fraction of cells undergoing apoptosis increased over time to reach wild-type levels by 96 hr post-irradiation. Following exposure to either 254-nm UV or SSL, p53-null NH32 was again highly resistant to the induction of apoptosis over the entire 96 hr period. However, in the case of E6-expressing TK6-5E, a much more complex response was observed (Figure 3B and C). Indeed, whereas no differences were noted between TK6 and TK6-5E in apoptotic capacity up to 48 hr post 254 nm UV irradiation, after this time point TK6-5E was considerably more sensitive to apoptosis. Moreover, following SSL exposure TK6-5E was significantly resistant

to apoptosis induction up to 48 h, while at the later time points no difference was observed.

Cell cycle arrest in p53-proficient vs. -deficient human lymphoblastoid strains

To further assess the role of p53 in the cellular response to UV-induced DNA damage, we used PI staining coupled to FACS analysis to measure the kinetics of G1-S progression in TK6, TK6-5E, and NH32, after synchronization with colcemid followed by treatment with equitoxic doses of 254-nm UV (5 Jm^{-2}), SSL (500 kJm^{-2}), and IR (150 rad). During the first 6 hr after exposure to IR, each strain exited G1 at a rate that was indistinguishable from the mock-irradiated control (Figure 4A). After this time, however, only wild-type TK6 maintained a period of arrest that persisted for at least 24 h post IR-treatment. The situation was very different following exposure to either 254 nm UVC or SSL, as for both types of UV, NH32 and TK6 each exhibited a clear G1 arrest and almost identical kinetics of G1-S progression (Figure 4B and C). TK6-5E also underwent a sustained period of growth arrest after 254 nm UV or SSL but, relative to TK6 or NH32, the magnitude of this arrest was considerably greater.

Mutation frequency at the endogenous *hprt* locus in p53-proficient vs. deficient lymphoblastoid strains

To quantitatively assess the influence of p53 inactivation on UV mutagenesis in a chromosomal gene, we measured mutation frequency at the *hprt*

locus in strains TK6, NH32, and TK6-5E after irradiation with 254 nm UV, SSL, or IR (over the same equitoxic range of doses used for clonogenic survival determination). A dose-dependent induction of (6-tg-resistant) *hprt*^r mutants was observed for all three lymphoblastoid strains after IR treatment; however, both TK6-5E and NH32 exhibited significantly lower mutational frequencies than TK6 (Figure 5A). The mutagenic response after UV followed a similar trend. TK6 exhibited a proportional increase in the incidence of 254 nm UV- or SSL-induced *hprt* mutants as a function of dose (Figure 5B and C). Furthermore, mutant frequencies in both NH32 and TK6-5E initially increased with dose, but plateaued at higher doses where these strains both displayed a slight but significant UV-hypomutability relative to TK6.

We note that concentrations of 6-tg ranging between 0.5 and 5 µg/ml have been routinely used to score *hprt*^r mutants in TK6 cells (28,29). Accordingly, we employed 0.9 µg/ml of 6-tg in the case of TK6 and TK6-5E for mutation frequency determinations, as well as for isolation and DNA sequence-level characterization of *hprt* mutant collections (as described immediately below). Upon completion of these latter experiments in TK6 and TK6-5E, strain NH32 was obtained and interestingly found to be considerably resistant to the cytotoxic effects of 6-tg relative to TK6 or TK6-5E (data not shown). We currently have no explanation for this observation, although it may be related to, *eg.*, inhibition of 6-tg-induced apoptosis in a genetically *p53*-null background. We then determined experimentally (data not shown), and used 10 µg/ml as an optimal 6-tg concentration for *hprt* mutant selection in the case of NH32. We are confident that

this modification in the 6-tg selection protocol for NH32 did not introduce any significant variability in our results since (i) in the case of wild-type TK6, identical *hprt* mutation frequencies were observed regardless of whether 0.9 or 10 $\mu\text{g/ml}$ of 6-tg was used (data not shown); and, (ii) we were able to document very strong quantitative and qualitative similarities between TK6-5E and NH32 in terms of UV mutagenesis at the *hprt* locus, despite the differential in 6-tg dose.

DNA sequence specificity of mutations induced by SSL at the endogenous *hprt* locus in p53-proficient vs. -deficient human lymphoblastoid strains

To determine whether inactivation of p53 can qualitatively modulate UV mutagenesis at a chromosomal locus in human cells, we irradiated TK6, NH32, and TK6-5E with 500 kJm^{-2} of SSL, followed by isolation and cDNA sequence level characterization of at least 40 independent SSL-induced *hprt*⁻ mutants from each strain. For all three strains, exposure to this SSL dose resulted in at least 20% relative clonogenic survival (Figure 2C), as well as a significant (minimum 9-fold) induction in the frequency of *hprt*⁻ mutations over spontaneous background levels (Figure 5C). The spectra of SSL-induced base substitutions at the *hprt* locus in TK6, TK6-5E, and NH32 is presented in Figure 6. Over 90% of SSL-induced *hprt*⁻ mutations in each strain were single base substitutions leading to either amino acid changes in the *hprt* protein, or to precise skipping of one or more exons during *hprt* mRNA processing. Moreover, in the case of each strain, the vast majority of SSL-induced base substitutions were targeted to potential

dipyrimidine sites, strongly indicating that these mutations were caused *via* misreplication of unrepaired solar UV-induced CPDs.

Examination of Table 1 reveals an overall strong correspondence between E6-expressing TK6-5E and *p53*-null NH32 in the relative proportions of SSL-induced mutational classes (including transitions, transversions, small deletions/insertions, and exon-skipping events). However substantial differences were noted in this respect between these *p53*-deficient strains and wild-type TK6. Indeed, relative to TK6, TK6-5E manifested a significant reduction in the fraction of base substitutions occurring at A:T base pairs (29 vs. 2%; $p < 0.0001$, Fisher's exact test), as well as a concomitant increase in the frequency of exon-skipping events (35 vs. 14%; $p < 0.02$). NH32 also manifested a significant reduction in mutations at A:T base pairs compared with TK6 (29 vs. 10%; $p < 0.03$), although an apparent increase in exon-skipping was not statistically significant (25 vs. 14%; $p < 0.26$). In addition, while some similarities were noted among the three strains in the distribution of sunlight-induced GC→AT transition hotspots along the *hprt* gene, (*eg.*, positions 236, 653-654, and 665 constituted sites of multiple occurrence for TK6, TK6-5E, as well as NH32), it is intriguing to note that both NH32 and TK6-5E manifested a striking GC→AT transition hotspot within a particular G:C tract (positions 292-297) that was not represented among the TK6 mutant collection (Figure 6). Finally, in making the reasonable assumption that a vast majority of SSL-induced mutations in human cells are targeted by dipyrimidine photoproducts (especially CPDs; see references in Discussion), and in conjunction with Figure 6 (wherein *hprt* mutations are depicted along the

nontranscribed strand), it is possible to determine for each lymphoblastoid strain the proportion of SSL-induced single base substitutions caused by DNA damage occurring along the transcribed versus the nontranscribed strand of *hprt*. For example, if a given mutation occurs at a dipurine site along the transcribed strand as shown in Figure 6, it can be deduced that this mutation was actually fixed opposite an unrepaired CPD at the corresponding dipyrimidine site on the opposite (nontranscribed) strand. On this basis, no significant difference was noted between the three lymphoblastoid strains in the strand-specificity of SSL-induced mutations, *i.e.*, 65%, 62% , and 72% of base substitutions could be attributed to UV-induced dipyrimidine photoproducts on the transcribed strand for each of TK6, NH32, and TK6-5E, respectively (Table 1). This latter result on the strand-specificity for mutation induction has ramifications with respect to the potential role of p53 in transcription-coupled repair (TCNER) (see Discussion).

DISCUSSION

Previous studies that have addressed the influence of p53 on the response of cultured cells to UV-induced genotoxic stress have often yielded conflicting results (see below). This situation may be attributable to the use of diverse cell types in conjunction with a variety of different experimental approaches for inactivating (or adding back) p53 function. To elucidate one basis for such experimental variability with respect to p53-dependence for UV-induced DNA damage processing, and to gain further insight into the phenomenon itself, we carefully investigated critical cellular responses to IR and UV exposure using a model human system consisting of the p53^{+/+} human lymphoblastoid strain TK6, and isogenic derivatives in which p53 function has been abrogated by two very commonly employed strategies, *i.e.*, either genetically *via* promoterless gene targeting, or functionally *via* intracellular E6 oncoprotein expression.

While prior investigations on the role of p53 in the UV response have focused only on monochromatic 254 nm UV exposure, the present study also employed broad-spectrum SSL. It is of interest to compare the effects of both wavelength regions. Although not contained within the terrestrial solar wavelength spectrum, 254 nm UV is a model mutagen for which a huge genotoxic data base already exists, while SSL mimics environmentally-relevant sunlight but is much less well studied. Furthermore these wavelength regions are known to exert different biological effects. Indeed, 254 nm UV does not significantly alter the redox state of the cell, being strongly absorbed specifically by DNA wherein it induces almost exclusively dipyrimidine-type photoproducts. In contrast, the

environmentally-relevant UVB and UVA wavelengths present in SSL are absorbed by a plethora of cellular macromolecules in addition to DNA, generating reactive oxygen species which in turn produce specific patterns of gene activation and diverse types of damage which differentially impact cellular responses relative to 254 nm UV (30). Our result showing that the vast majority of SSL-induced mutations in TK6 and NH32 are located at dipyrimidine target sites is consistent with the now well-established fact that broad-spectrum sunlight, like 254 nm UV, exerts its primary premutagenic potential through the induction of dipyrimidine-type photoproducts (mostly CPD), rather than of oxidative DNA damage in human cells (2,23,31-33). This result also suggests that p53 does not sensitize cells to oxidative DNA damage, as might be postulated based on recent studies demonstrating a potential role for p53 in base excision repair (34) which removes potentially highly-mutagenic oxidized DNA bases such as 8-oxo-guanine that are known to be generated by solar wavelengths (30). Finally as mentioned in more detail below, equitoxic doses of 254 nm UV and SSL induced very similar responses overall at the level of clonogenic survival, mutagenesis, apoptosis, and cell cycle arrest in both TK6 and NH32. This similarity between 254 nm UV and SSL indicates that the vast data base on the cellular effects of the model mutagen 254 nm UV can be extrapolated with more confidence to the situation for environmentally relevant sunlight.

We demonstrate here that genetic inactivation of p53 in human lymphoblastoid cells does not affect cellular resistance to UV-induced cell killing, as judged by the virtually identical levels of clonogenic survival observed for TK6

versus NH32 following exposure to either 254 nm UV or SSL. Prior investigations in other human systems have yielded conflicting results regarding the influence of p53 inactivation on UV-induced cell death, *eg.*, adenocarcinoma cells transduced with dominant negative *p53* manifested decreased clonogenic survival after UV exposure (35), whereas expression of wild-type p53 in *p53*-null osteosarcoma cells had no effect (36). The situation is further complicated by contradictory studies, each employing precisely the same *p53*-null skin fibroblast strains, which claimed that abrogation of p53 reduces (37) or increases (6) clonogenic survival after UV treatment. These latter investigations were able to correlate these cytotoxicity results with further conflicting data showing that wild type p53 in their hands, respectively, inhibits or promotes UV-induced apoptosis. In any case, the demonstration here of profound resistance to programmed cell death exhibited by NH32 relative to TK6 after UV (or IR) exposure does not appear consistent with the observed virtually identical levels of clonogenic survival for these strains. However as noted earlier, besides regulating apoptosis, functional p53 is also known to be required for NER following UV irradiation. Furthermore, while loss of apoptotic capacity greatly enhances clonogenic survival, loss of NER engenders precisely the opposite effect. Thus it is plausible that for NH32, following UV exposure, any potential enhancement of clonogenic survival conferred by abrogation of p53-dependent apoptosis could be offset by an equivalent reduction in viability attributable to loss of the p53-dependent ability to remove highly genotoxic CPD *via* NER.

As growth arrest during G1 phase of the cell cycle is presumed to mitigate the mutagenic and carcinogenic effects of DNA damaging agents, it was important to investigate the potential role of p53 in UV-induced G1 arrest in our model system. Moreover, further characterization specifically of TK6 with respect to G1-S progression after mutagen exposure may be of interest, since a previous report claimed that this strain atypically lacks the IR-induced G1 checkpoint, despite its p53-proficient status (38). Nonetheless, we found that while TK6 does not exhibit any arrest in G1-S progression within the first 6-9 hr following IR exposure (in agreement with the immediately aforementioned study), evaluation of later time points shows that this strain does in fact undergo a significant and sustained G1 arrest beginning at approximately 9 h and continuing beyond 24 h post-IR treatment. This growth delay was completely abrogated in NH32, which is expected given the preeminent role of p53 in IR-induced G1 arrest. In contrast to the situation for IR, however, NH32 manifested identical rates of S-phase entry compared with TK6 after exposure to either 254 nm UV or SSL. This reveals the presence of a potent p53-independent G1 arrest in UV-exposed human lymphoblastoid cells, which is in accord with recent studies in other human cell types irradiated with 254 nm UV (13,39). Therefore, if the existence of a DNA damage-inducible G1 checkpoint is important in guarding against neoplastic transformation, our results indicate that p53 inactivation, in the case of solar UV-induced skin cancer (or possibly lymphoma), does not impact such a protective process.

A previous investigation on NH32 revealed, relative to TK6, no change in mutation frequency at the endogenous thymidine kinase (*tk*) locus following treatment with IR (21). While we were able to reproduce this latter result on IR-induced mutagenesis at *tk* (data not shown), we nonetheless found that NH32 manifested slightly but significantly lower *hprt* mutation frequencies compared with TK6 after exposure to IR, as well as to either 254-nm UV or SSL. This may appear surprising, as loss of both apoptotic and NER capacities would be expected to enhance the accumulation of genetic damage within a given cell population, and hence to higher mutation frequencies in NH32 compared with TK6. Furthermore, our data differ from studies in other human tumor cell types which show that p53 inactivation can slightly enhance the frequency of 254 nm UV-induced *hprt* mutations (36,40). Other investigations using shuttle-vector carried *supF* targets in 254 nm UV-exposed murine cells have shown that abrogation of p53 activity can either increase (41) or have no effect (42,43) on mutation induction. At present we have no explanation for the slightly lower IR and UV-induced *hprt* mutation frequencies in TK6 versus NH32. However, the fact that these strains display identical frequencies of IR-induced mutagenesis at *tk* suggests that our results for *hprt* may merely represent a locus-specific effect.

To assess any potential qualitative effects of genetic p53 inactivation on UV mutagenesis, we determined the DNA sequence specificity of SSL-induced mutations at the *hprt* locus in TK6 and NH32. To our knowledge, this represents the first DNA sequence-level characterization of mutations induced by any mutagen at an endogenous locus in isogenic human strains differing in p53 status.

We found that NH32 manifested important disparities relative to TK6 in the proportion of SSL-induced *hprt* mutational classes, including a significant reduction in the frequency of base substitutions at A:T base pairs and a concomitant increase in exon-skipping events. Moreover, while some sites along the *hprt* locus were frequently mutated in both NH32 and TK6, it is intriguing that one particular G:C tract constituted a striking mutational hotspot only in NH32 and TK6-5E, and is therefore specific for a p53-deficient background. Prior studies which analyzed shuttle-vector carried target genes after 254 nm UV treatment also revealed some differences between p53-proficient and -deficient murine cells in the distribution of mutational hotspots but, unlike the situation here, strong similarities in the relative proportion of mutational classes (42,43). One investigation in 254 nm UV-exposed human (osteosarcoma) cells, using essentially the same shuttle-vector system as the above murine studies, showed that p53 expression can significantly reduce the frequency of G:C to A:T transitions, as well as influencing the distribution of mutational hotspots (36). In any case, our own data strongly indicate that p53 status can be an important determinant in the probability of mutation fixation at certain, but not all, nucleotide positions at an endogenous locus in human cells. We speculate that this may occur through p53-mediated regulation of translesion bypass and/or of nucleotide excision repair rates, which might be expected to impact both the type and frequency of UV-induced mutations on a site-by-site basis.

As mentioned earlier, although it has been clearly shown that inactivation of p53 significantly compromises the efficiency of CPD removal *via* NER in

human cells, conflicting data have emerged that directly demonstrate a role for p53 in GNER only (6,17) versus in both GNER and TCNER (7). The results presented here on the mutagenic specificity of SSL at an endogenous locus in isogenic human cells differing in p53 status shed some light on this controversy. We note that rodent cells lacking the murine homologue of human p48 (XP-E gene product) are deficient only in GNER, and manifest a highly significant preference for UV-induced *hprt* mutations attributable to CPD originating on the non-transcribed strand (44). Similarly, in the case of humans, mutated p53 alleles in sunlight-induced skin tumors from XP-C patients, who are deficient in GNER only, show an extreme (100%) bias towards mutations due to unrepaired CPD on the nontranscribed strand (45,46). Thus, if p53 inactivation were to, e.g. profoundly reduce GNER efficiency but have no effect on TCNER, then one would clearly expect to recover a higher proportion of SSL-induced mutations due to unrepaired CPD on the non-transcribed strand of *hprt* (which is an actively transcribed locus) in NH32 relative to TK6. However, the two strains actually manifest a similar bias towards SSL-induced mutations on the transcribed strand. On this basis, our data are consistent with the notion that p53 regulates both GNER and TCNER.

The efficiency with which E6 expression is able to abrogate p53 function in diverse human and murine cell types has provided great impetus for its widespread use as a model to investigate the role of p53 in the DNA damage response. We were able to directly assess the validity of this model by comparing p53-null NH32 with TK6-5E, *i.e.*, an isogenic counterpart that constitutively

expresses the E6 oncoprotein and which is demonstrably deficient in p53 function. We observed strong quantitative and qualitative correspondence between NH32 and TK6-5E with respect to mutagenesis at the endogenous *hprt* locus. Despite these similarities however, following exposure to either 254 nm UV or SSL, relative to wild-type TK6, E6-expressing TK6-5E responded somehow differently than NH32 in virtually every other respect. Indeed, unlike NH32, TK6-5E displayed modest but significant hypersensitivity to the cytotoxic effects of either 254 nm UV or SSL, in agreement with previous studies showing that E6 expression can reduce clonogenic survival in different cultured cell types after UV exposure (35,40,47). Moreover, the apoptotic responses displayed by TK6-5E after treatment with either 254 nm UV or SSL were strikingly different, and more complex, than for p53-null NH32. Finally, although TK6-5E, like NH32, manifested a p53-independent G1-S delay after treatment with 254 nm UV or SSL, this arrest endured for a considerably longer time period in the case of TK6-5E.

Although it is often taken for granted that intracellular E6 expression reflects a true p53-null phenotype, the major caveat nonetheless exists that this oncoprotein binds and interferes with the activity of many cellular proteins aside from p53. Furthermore, some of these E6-binding proteins are demonstrably or potentially implicated in the cellular response to genotoxic stress, *eg.*, the bcl-2 family member Bak (48), the (proapoptotic) c-myc transcription factor (49), and the transcriptional co-activator p300/CPB (50). Our own data comparing p53-null NH32 versus its isogenic E6-expressing counterpart TK6-5E provide a direct

physiological demonstration that intracellular E6 expression can influence the global DNA damage response through p53-independent pathways. Furthermore, as demonstrated in the current study (Figure 1), intracellular E6 expression may severely attenuate, but not necessarily abrogate, levels of p53 protein. Therefore it cannot be ruled out that very low residual p53 activity in E6-expressing cells may influence certain responses to DNA damage. In any case, our results clearly emphasize the need for great caution when considering the use of intracellular E6 expression as an experimental paradigm for p53 inactivation.

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 is a research scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). The authors are grateful to Sophie Ouellette for valuable technical assistance with FACS analysis.

REFERENCES

1. Lakin, N.D. and Jackson S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-7655.
2. Brash, D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J. and Ponten J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 10124-10128.
3. 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. (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 4216-4220.
4. Ziegler, A., Jonason A.S., Leffell D.J., Simon J.A., Sharma H.W., Kimmelman J., Remington L., Jacks T. and Brash D.E. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372**, 773-776.
5. 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. (1996) Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 14025-14029.
6. Ford, J.M. and Hanawalt P.C. (1995) 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.*, **92**, 8876-8880.

7. Therrien, J.P., Drouin R., Baril C. and Drobetsky E.A. (1999) 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.*, **96**, 15038-15043.
8. 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. (2000) 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.
9. de Laat, W.L., Jaspers N.G. and Hoeijmakers J.H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, **13**, 768-785.
10. Dulic, V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J. and Reed S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.
11. Waldman, T., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.*, **55**, 5187-5190.
12. Harrington, E.A., Bruce J.L., Harlow E. and Dyson N. (1998) pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 11945-11950.
13. Loignon, M. and Drobetsky E.A. (2002) 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.

14. Mantovani, F. and Banks L. (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, **20**, 7874-7887.
15. Scheffner, M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J. and Howley P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
16. Kesis, T.D., Slebos R.J., Nelson W.G., Kastan M.B., Plunkett B.S., Han S.M., Lorincz A.T., Hedrick L. and Cho K.R. (1993) Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 3988-3992.
17. Ford, J.M., Baron E.L. and Hanawalt P.C. (1998) 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.
18. Thomas, M., Pim D. and Banks L. (1999) The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, **18**, 7690-7700.
19. Liber, H.L. and Thilly W.G. (1982) Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutat. Res.*, **94**, 467-485.
20. Yu, Y., Li C.Y. and Little J.B. (1997) 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.
21. Chuang, Y.Y., Chen Q. and Liber H.L. (1999) Radiation-induced mutations at the autosomal thymidine kinase locus are not elevated in p53-null cells. *Cancer Res.*, **59**, 3073-3076.
 22. Jiang, W., Ananthaswamy H.N., Muller H.K., Ouhtit A., Bolshakov S., Ullrich S.E., El-Naggar A.K. and Kripke M.L. (2001) UV irradiation augments lymphoid malignancies in mice with one functional copy of wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 9790-9795.
 23. Drobetsky, E.A., Turcotte J. and Chateaufneuf A. (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 2350-2354.
 24. Rosenstein, B.S. and Rosenstein R.B. (1992) Survival, excision repair and inhibition of DNA synthesis in normal human skin fibroblasts exposed to simulated sunlight. *J. Photochem. Photobiol.*, **16**, 247-255.
 25. DeLuca, J.G., Weinstein L. and Thilly W.G. (1983) Ultraviolet light-induced mutation of diploid human lymphoblasts. *Mutat. Res.*, **107**, 347-70.
 26. Olive, P.L., Banath J.P. and Durand R.E. (1996) Development of apoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cell cycle at the time of irradiation. *Radiat. Res.*, **146**, 595-602.
 27. Furth, E.E., Thilly W.G., Penman B.W., Liber H.L. and Rand W.M. (1981) Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Anal. Biochem.*, **110**, 1-8.

28. Liber, H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989) A comparison of mutation induction at the tk and hprt loci in human lymphoblastoid cells; quantitative differences are due to an additional class of mutations at the autosomal tk locus. *Mutat. Res.*, **216**, 9-17.
29. Lichtenauer-Kaligis, E.G., Thijssen J.C., den Dulk H., van de Putte P., Giphart-Gassler M. and Tasseron-de Jong J.G. (1995) Spontaneous mutation spectrum in the *hprt* gene in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis*, **10**, 137-143.
30. Tyrrell, R.M. (1996) Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight- -from models to reality. *Bioessays*, **18**, 139-148.
31. Sage, E., Lamolet B., Brulay E., Moustacchi E., Chateauneuf A. and Drobetsky E.A. (1996) Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 176-180.
32. You, Y.H., Li C. and Pfeifer G.P. (1999) Involvement of 5-methylcytosine in sunlight-induced mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, **293**, 493-503.
33. You, Y.H., Lee D.H., Yoon J.H., Nakajima S., Yasui A. and Pfeifer G.P. (2001) Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44688-44694.
34. Zhou, J., Ahn J., Wilson S.H. and Prives C. (2001) A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.*, **20**, 914-923.

35. Smith, M.L., Chen I.T., Zhan Q., O. Connor P.M. and Fornace A.J., Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*, **10**, 1053-1059.
36. Yamagishi, N., Miyakoshi J., Yagi T. and Takebe H. (1997) Suppression of UV-induced mutations by wild-type p53 protein in human osteosarcoma cells. *Mutagenesis*, **12**, 191-194.
37. Wani, M.A., Zhu Q.Z., El-Mahdy M. and Wani A.A. (1999) Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis*, **20**, 765-772.
38. Little, J.B., Nagasawa H., Keng P.C., Yu Y. and Li C.Y. (1995) Absence of radiation-induced G1 arrest in two closely related human lymphoblast cell lines that differ in p53 status. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11033-11036.
39. Loignon, M., Fetni R., Gordon A.J. and Drobetsky E.A. (1997) A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res.*, **57**, 3390-394.
40. Havre, P.A., Yuan J., Hedrick L., Cho K.R. and Glazer P.M. (1995) p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.*, **55**, 4420-4.
41. Yuan, J., Yeasky T.M., Havre P.A. and Glazer P.M. (1995) Induction of p53 in mouse cells decreases mutagenesis by UV radiation. *Carcinogenesis*, **16**, 2295-2300.
42. Ishizaki, K., Nishizawa K., Mimaki S. and Aizawa S. (1996) UV-induced mutations of supF gene on a shuttle vector plasmid in p53-deficient mouse

- cells are qualitatively different from those in wild-type cells. *Mutat. Res.*, **364**, 43-49.
43. Courtemanche, C. and Anderson A. (1999) The p53 tumor suppressor protein reduces point mutation frequency of a shuttle vector modified by the chemical mutagens (+/-)7, 8-dihydroxy- 9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene, aflatoxin B1 and meta- chloroperoxybenzoic acid. *Oncogene*, **18**, 4672-4680.
44. Tang, J.Y., Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C. and Chu G. (2000) Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol. Cell*, **5**, 737-744.
45. Dumaz, N., Drougard C., Sarasin A. and Daya-Grosjean L. (1993) Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 10529-10533.
46. Giglia, G., Dumaz N., Drougard C., Avril M.F., Daya-Grosjean L. and Sarasin A. (1998) p53 mutations in skin and internal tumors of xeroderma pigmentosum patients belonging to the complementation group C. *Cancer Res.*, **58**, 4402-4409.
47. Cistulli, C.A. and Kaufmann W.K. (1998) p53-dependent signaling sustains DNA replication and enhances clonogenic survival in 254 nm ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Cancer Res.*, **58**, 1993-2002.

48. Jackson, S., Harwood C., Thomas M., Banks L. and Storey A. (2000) Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.*, **14**, 3065-73.
49. Gross-Mesilaty, S., Reinstein E., Bercovich B., Tobias K.E., Schwartz A.L., Kahana C. and Ciechanover A. (1998) Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 8058-8063.
50. Patel, D., Huang S.M., Baglia L.A. and McCance D.J. (1999) The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.*, **18**, 5061-5072.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Expression of the p53 and p21 waf1 proteins in IR-exposed human lymphoblastoid strains differing in p53 status. Western blot analysis was performed on TK6-20C (identical to TK6 but carrying an empty expression vector) , TK6-5E, and NH32 following treatment with 150 rad of IR. The identical result was obtained when TK6, rather than TK6-20C, was employed as the p53-proficient counterpart (data not shown).

Figure 2 : Cytotoxicity in human lymphoblastoid cells differing in p53 status. Clonogenic survival was determined in TK6 (●), TK6-5E (■) and NH32 (▲) following treatment with various doses of IR (A) 254 nm UV (B) and SSL (C) .

Figure 3 : Induction of early apoptosis in human lymphoblastoid cells differing in p53 status. Apoptosis was determined by Hoechst/PI staining in conjunction with FACS analysis in TK6 (●), TK6-5E (■) and NH32 (▲) following treatment with 500 rad IR (A), 7.5 Jm^{-2} 254 nm UV (B) and 750 kJm^{-2} SSL (C).

Figure 4 : G1 arrest in human lymphoblastoid cells differing in p53 status. The kinetics of G1-S progression were determined by PI staining in conjunction with FACS analysis following treatment with 150 rads IR (A), 5 Jm^{-2} 254 nm UV (B), or 500 kJm^{-2} SSL (C) in TK6 (●), TK6-5E (■) and NH32 (▲). (◆) designates mock-irradiated TK6 cells. (There was virtually no difference between TK6, TK6-

5E, and NH32 with respect to the kinetics of G1-S progression after mock treatment; data not shown.)

Figure 5 : SSL-induced mutagenesis at an endogenous locus in human lymphoblastoid strains differing in p53 status. The frequency of mutation at the *hprt* locus was established in TK6 (black bars), TK6-5E (white bars) and NH32 (hatched bars) following treatment with various doses of IR (A), 254 nm UV (B) and SSL (C) .

Figure 6 : DNA sequence level characterization of SSL-induced base substitutions along the *hprt* gene in human lymphoblastoid strains differing in p53 status. The five sequences from top to bottom represent portions of the nontranscribed strand. TK6 (mutations in upper case, above the sequence), NH32 (mutations in lower case, above the sequence) and TK6-5E (mutations in upper case, below the sequence). A double backslash indicates a break in the sequence. Tandem and nontandem mutations are boxed

TABLE 1: Classes of mutation induced by SSL at the *hprt* locus in human lymphoblastoid cells differing in p53 status

	TK6	NH32	TK6-5E
Transitions			
G:C → A:T	21 (43%)	22 (55%)	26 (50%)
A:T → G:C	5 (10%)	2 (5%)	0
Transversions			
G:C → T:A	1 (2%)	2 (5%)	1 (2%)
G:C → C:G	0	0	2 (4%)
A:T → T:A	6 (12%)	1 (2%)	0
A:T → C:G	3 (6%)	1 (2%)	1 (2%)
Mutation at A:T base pairs *	14 (29%)	4(10%)	1(2%)
Multiple base substitutions **	2 (4%)	3 (8%)	3(6%)
Deletions/insertions			
Insertions	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
Deletions	5 (10%)	1 (2%)	2 (4%)
Exon skipping ***	7 (14%)	10 (25%)	18 (35%)
Strand bias	65%	62%	72%
TOTAL	49	40	52

* includes tandem and nontandem double base substitutions, and one tandem triple mutation

** includes small deletions and insertions ranging from 1 to 6 nucleotides in length.

*** percentage of mutations attributable to unrepaired dipyrimidine photoproducts located on the transcribed strand.

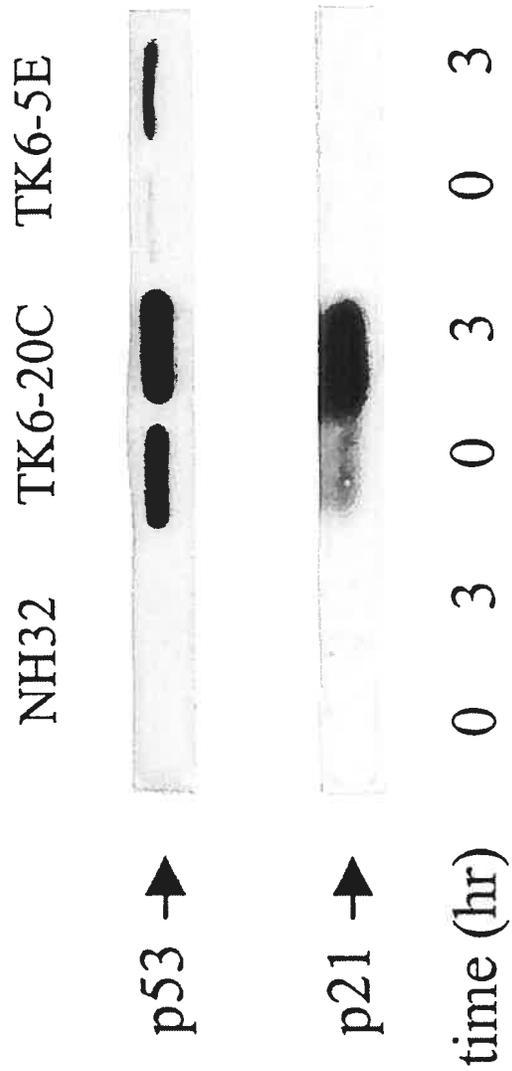


FIGURE 1

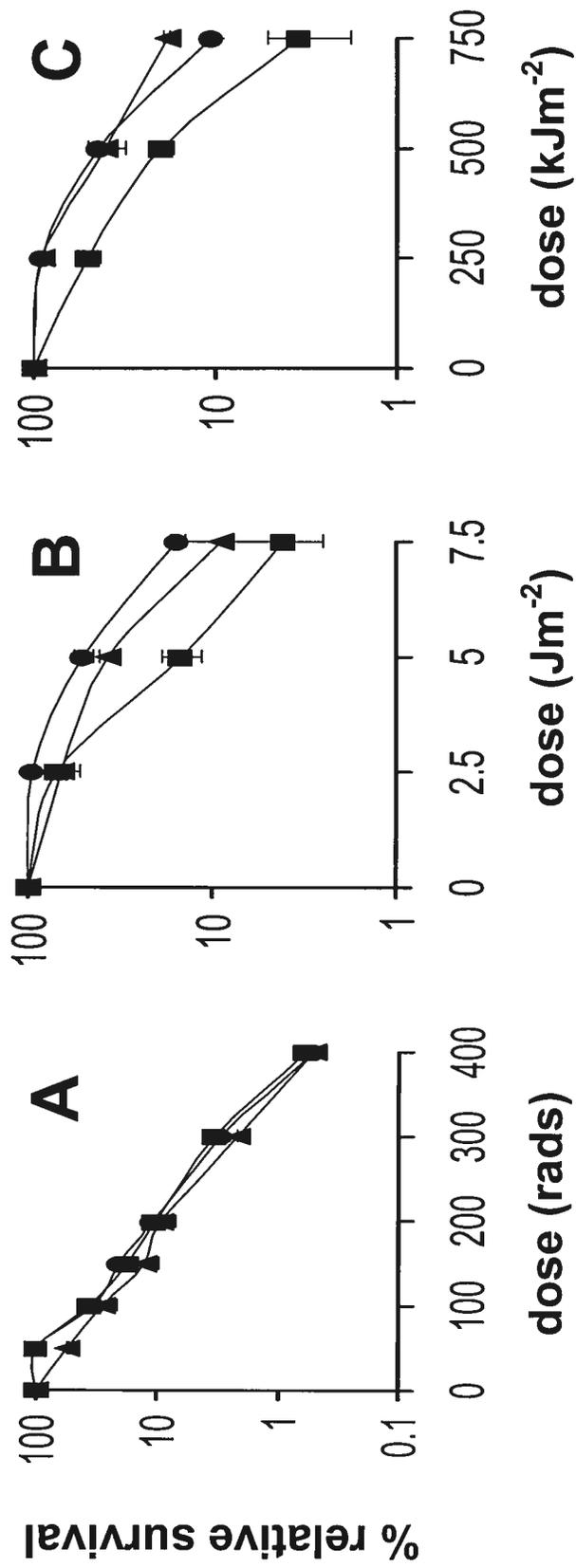


FIGURE 2

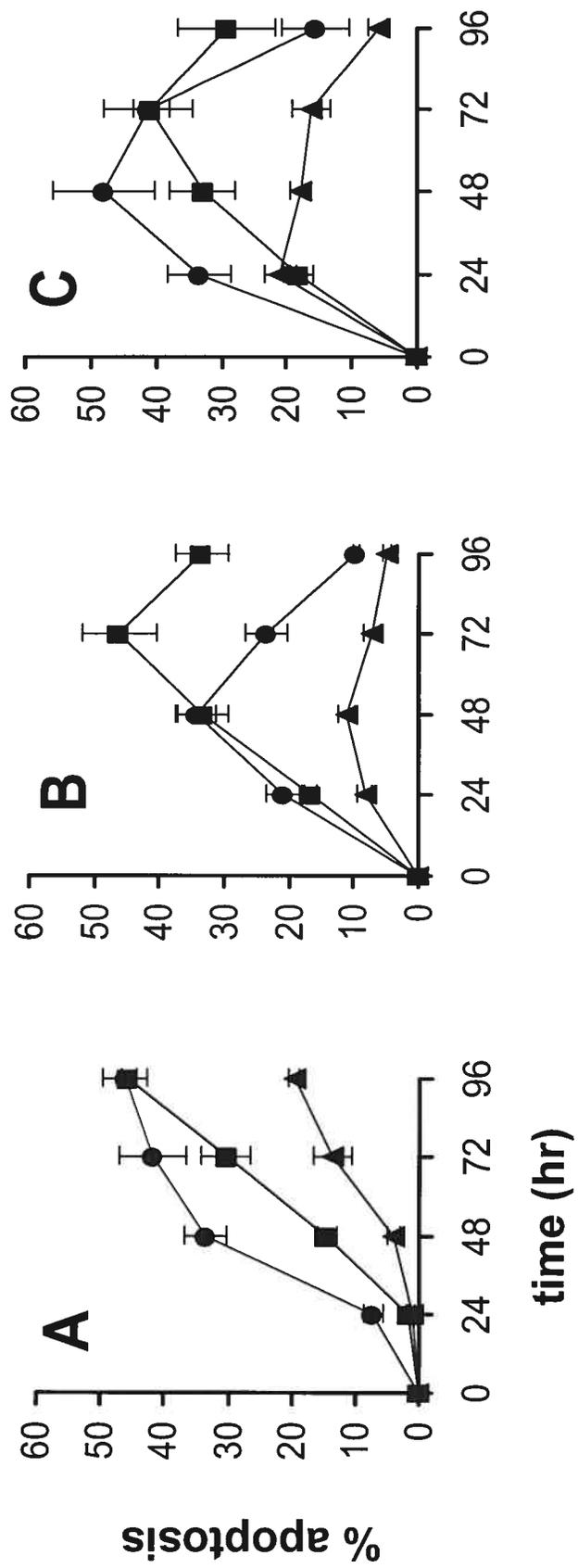


FIGURE 3

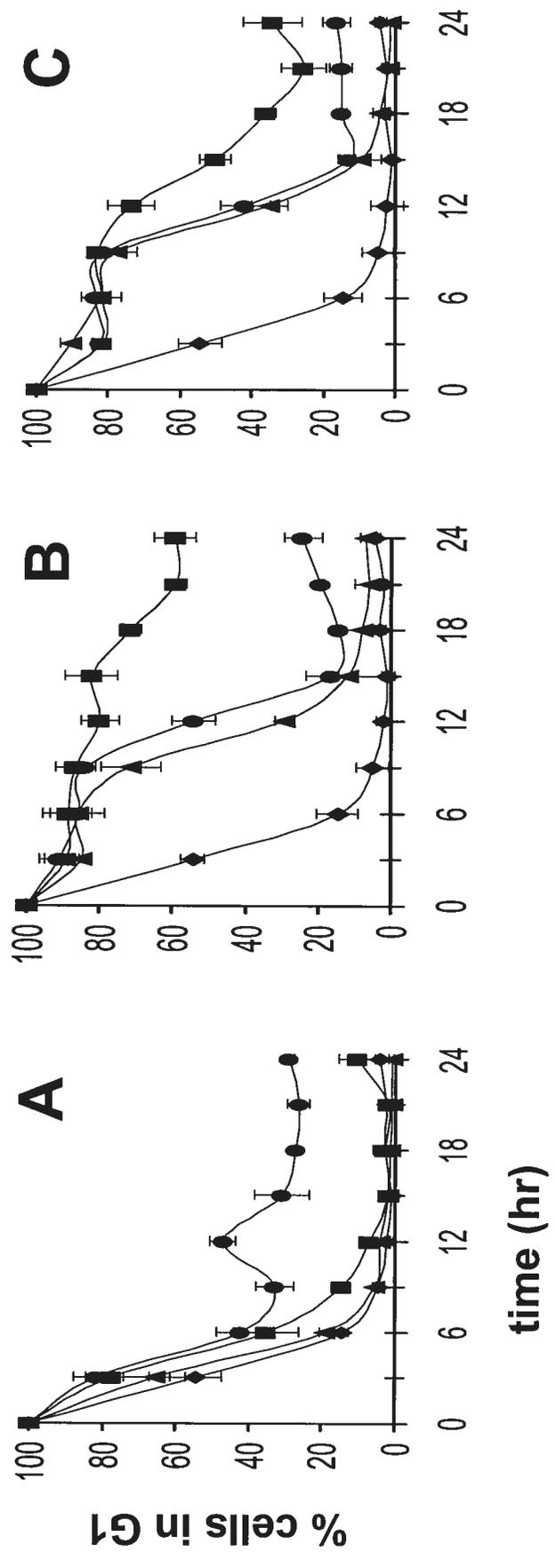


FIGURE 4

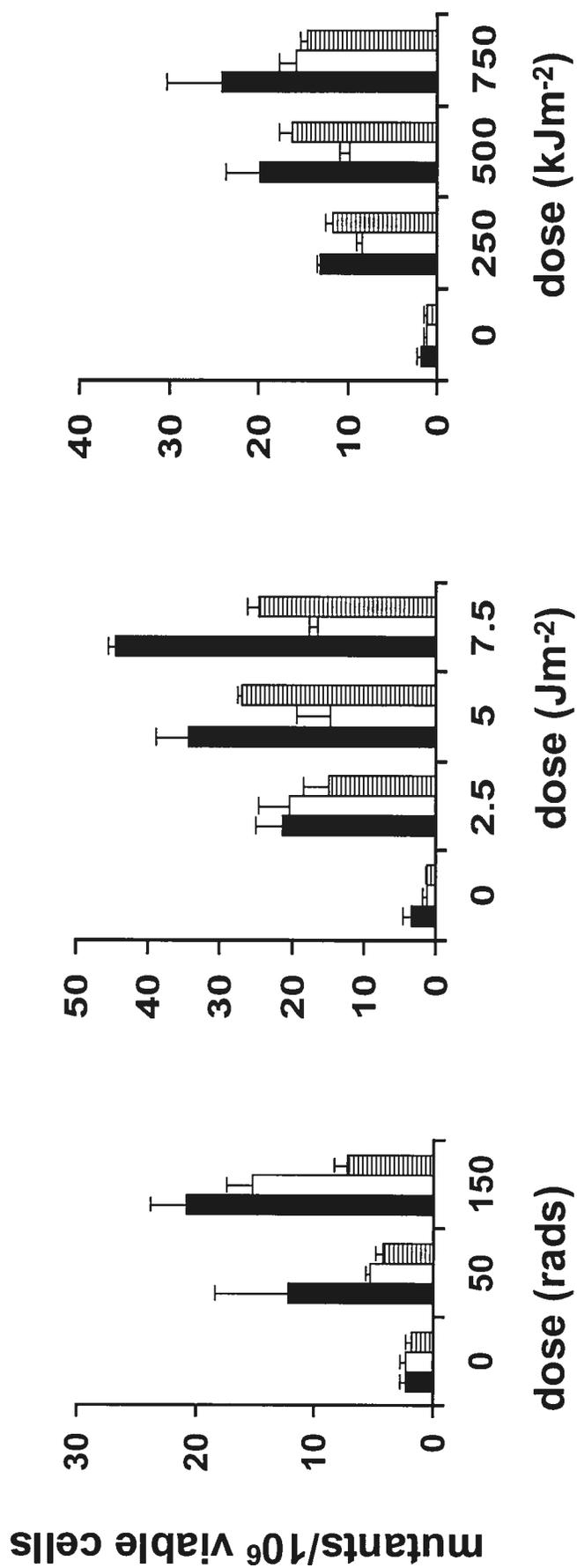


FIGURE 5

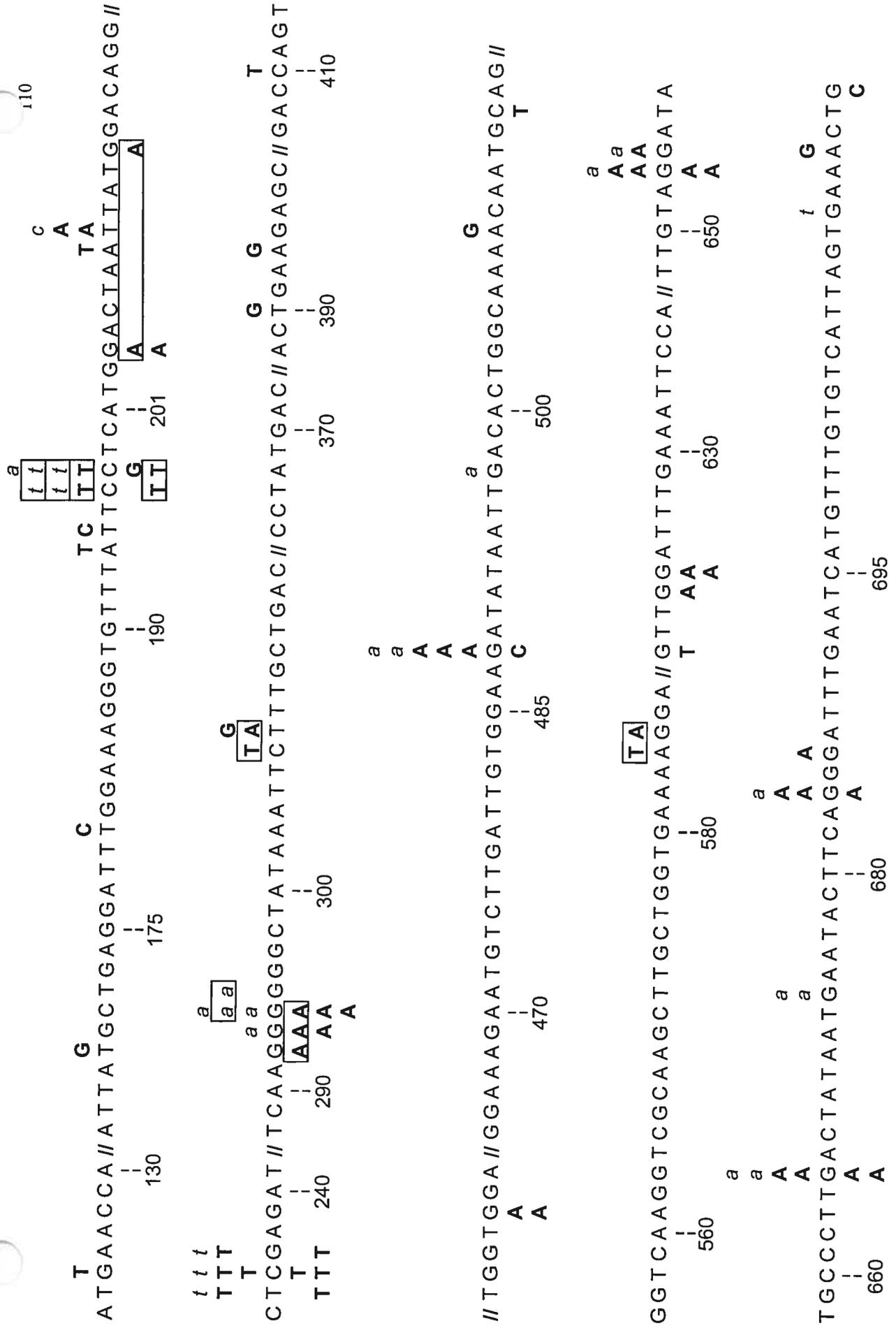


FIGURE 6

Chapitre 3: Deuxième article découlant de mes recherches

Article approuvé pour publication dans:

" Proceedings of the national academy of science of the USA"

et intitulé:

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

Par

Géraldine Mathonnet*, Caroline Léger*, Julie Desnoyers, Régen Drouin, Jean-Philippe Therrien et Elliot A. Drobetsky

(* Ces auteurs ont contribué également au travail.)

Nature de la participation à l'article: J'ai mis au point la méthode de LM-PCR au locus HPRT en me basant sur la méthode existante adaptée au locus c-jun. Par la suite, j'ai réalisé, quantifié et analysé les expériences de LM-PCR au locus HPRT suite à un traitement aux UVC. J'ai contribué de façon substantielle à ce travail et de façon égale à Mme Géraldine Mathonnet. J'ai également contribué à la rédaction de l'article.

RÉSUMÉ

La réparation par excision de nucléotides (NER) prévient le cancer de la peau en éliminant les dimers cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) fortement génotoxiques induits par la composante UVB de la lumière solaire. Le NER est composé de deux sous-voies distinctes mais se chevauchant, i.e. la voie de réparation globale (GNER) qui élimine les CPD du génome entier et la voie couplée à la transcription (TCNER) qui élimine les CPD seulement dans le brin transcrit des gènes actifs. Des études précédentes ont clairement établi que la protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle crucial dans le NER. Dans la présente étude, nous avons utilisé la technique de "PCR médié par une ligation" (LMPCR) pour montrer, au niveau nucléotidique de gènes chromosomiques de cellules humaines, que la nécessité d'une protéine p53 fonctionnelle pour le TCNER, mais non pour le GNER, est dépendante de la longueur d'onde utilisée. En effet, comparativement à son homologue isogénique p53 sauvage, la lignée lymphoblastique humaine déficiente en p53 s'est avérée être significativement moins efficace dans la réparation aussi bien des CPD situés dans le brin transcrit que de ceux situés dans le brin non-transcrit des gènes *c-jun* et *hprt* suite à un traitement aux UVB (290-320). Toutefois, suite à une irradiation aux UV 254nm qui sont absents de la lumière solaire parvenant à la surface de la terre, une déficience en p53 a engendré une réparation des CPD moins efficace seulement lorsque les dommages étaient situés sur le brin non-transcrits des gènes cibles. La révélation de ce nouveau phénomène dépendant de la longueur d'onde réconcilie

des études contradictoires précédentes qui avaient employé soit les UVB ou les UV 254nm pour montrer que p53 était requis ou ne jouait aucun rôle, respectivement, dans le TCNER des CPD. De plus, notre découverte souligne une faiblesse majeure en photobiologie expérimentale en fournissant un exemple éminent et cliniquement significatif par lequel le mutagène modèle "non-solaire" 254nm UV, couramment utilisé, ne reproduit pas les effets des UVB ayant une importance environnementale.

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 environmentally-relevant polychromatic UVB (290-320-nm). However in contrast, after irradiation with 254-nm UV which is absent from terrestrial sunlight, 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 previous highly conflicting studies which employed either UVB or 254-nm UV to claim, respectively, that p53 is required, or plays no role whatsoever, in TCNER of CPD. Furthermore, our finding highlights a critical caveat in experimental photobiology by providing a prominent and clinically-relevant example whereby

the currently widely-used “nonsolar” model mutagen 254-nm UV does not adequately replicate the effects of environmentally-relevant UVB.

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 primarily by the solar UVB component of natural sunlight is the pre-eminent cause of mutations in various oncogenes and tumor suppressor genes which are prerequisite to the development of skin cancer, the most frequent neoplasia in Caucasian populations (1, 2). 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 the repair of CPD (3). As a direct consequence, XP patients exhibit extreme photosensitivity and UV hypermutability, coupled with a striking predisposition to both melanoma and nonmelanoma tumors (4).

NER is comprised of two distinct subpathways which manifest strong mechanistic overlap, *i.e.*, differing only in the initial 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 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 (6). 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 (7, 8).

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 (9, 10). 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 greatly accelerating its proteasomal degradation, are each defective in GNER (11, 12, 13). 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 absolutely 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 (14) and murine embryonic fibroblasts (15). 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 (16). 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* (17, 18).

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 (19). In addition, after exposure to genotoxic agents, p53 transactivates a gene encoding the ribonucleotide reductase subunit p53R2 (20) 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 (21). With the above rationale in mind, we initially employed the ligation-mediated polymerase chain reaction (LM-PCR) technique to demonstrate at nucleotide resolution that either Li-Fraumeni skin fibroblasts or HPV-E6-expressing human skin fibroblasts 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) (22). We reasoned that the discrepancy between these latter data showing p53 dependence for TCNER in human skin fibroblasts, and those cited in the preceding paragraph demonstrating precisely the opposite, might be explained by the circumstances 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 DNA photoproducts and concomitant genotoxic stress responses elicited by 254-nm UV vs. UVB (23), 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 determine whether 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.

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 all 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 J/m²/s. The incident 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 $50\text{J}/\text{m}^2$, 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

LM-PCR 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 LM-PCR protocol employed here to investigate CPD repair rates along the TS and NTS of either *c-jun* or *hprt* has been described in detail (24, 25). Briefly, replicate cultures were irradiated with either $20\text{ J}/\text{m}^2$ 254-nm UV or $450\text{ J}/\text{m}^2$ 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. Aliquots of enzyme-digested DNA were run on denaturing agarose gels, as described previously (26), to show that $450\text{J}/\text{m}^2$ of UVB and $20\text{ J}/\text{m}^2$ of 254-nm UV each induce approximately equivalent initial global CPD

frequencies under our irradiation conditions (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, was 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 ³²P-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 phosphoimager (Bio-Rad Canada Ltd.). Variations in DNA sample loading were carefully controlled for by assessing the relative intensities of non-specific signals between lanes. The LM-PCR primer sets used for quantification of NER rates at the *c-jun* locus have been described previously (27, 28), while those used at the *hprt* locus are listed in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Despite the general accord that functional p53 is essential for efficient GNER of UV-induced CPD, divergent claims initially emerged that this critical tumor suppressor is either also required for TCNER (22), or plays no role whatsoever in this process (11). Although essentially the same p53-proficient-*vs.* -deficient human skin fibroblast strains were compared in these latter conflicting studies, there were some potentially critical disparities in experimental design. For example in each case distinct strand-specific repair assays were employed, *i.e.*, LM-PCR, a PCR-based genomic sequencing method that has been adapted to measure repair of DNA adducts at nucleotide resolution (29), *vs.* a well-characterized Southern blot-based assay that measures repair at the level of the gene (30). 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, and, furthermore, each 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 in our minds to account for the apparent discrepancy regarding the role of p53 in strand-specific NER in human fibroblasts 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 essential 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 HPVE6 oncoprotein that functionally inactivates p53. The p53 status and phenotype of these lymphoblastoid strains have been verified in our laboratory (31) and by others (32, 33). Specifically, following exposure 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 p21waf1.

Following treatment of TK6, TK6-5E, and NH32 with polychromatic UVB, or TK6 and NH32 with 254-nm UV, we employed LM-PCR 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 LM-PCR studies. However, *c-jun* is known to be strongly transcriptionally-activated in a variety of cell types at early times following UV exposure (34), 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 LM-PCR 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 1 shows a sample LM-PCR autoradiogram reflecting CPD repair rates at individual nucleotide positions along a portion of the TS strand of the *hprt* gene in NH32, TK6-5E, and TK6 following irradiation with $450\text{J}/\text{m}^2$ 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 the figure indicate dipyrimidine sites manifesting a clear signal above background, *i.e.*, which could be precisely quantified by phosphoimager 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 2. Two different regions along each strand of each gene were independently evaluated on separate autoradiograms. At least 10-20 dipyrimidine sites were quantified per region to arrive at a total of at least 25-40 sites analyzed/strand/gene. Each data point on the graphs represents a mean value calculated for these 25-40 sites. We emphasize that the results are directly comparable, since the identical sites were always compared among the different strains for each experimental condition. 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 2A and 2B), as well

as from the NTS of these target genes (Figures 2C and 2D). These data provide critical confirmation for our previous highly-controversial finding that p53 regulates GNER and TCNER at the *c-jun* and *p53* loci in human skin fibroblasts (22).

Sample LM-PCR autoradiograms are shown in figures 3 and 4 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 5). 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 5A and 5B). 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 while loss of functional p53 significantly reduces the efficiency GNER and TCNER in human cells exposed to polychromatic UVB, following treatment with monochromatic 254-nm UV this tumor suppressor is essential for efficient GNER but absolutely dispensable for TCNER. The

revelation of this striking wavelength-dependent effect apparently resolves the important controversy discussed in detail earlier regarding the role of p53 in transcription-coupled repair. Although the underlying mechanism remains completely unknown, we suggest a plausible general model. This model is 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 (35). Evidence to support this notion 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 (36, 37). In addition, intriguingly, primary CS-B fibroblasts were shown to be impaired in jun-NH2 terminal kinase activation (38), 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 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 (39, 40). In addition, UVB but not 254-nm UV induced

significant activation of the MAP kinase pathway in either human primary melanocytes (41) or murine keratinocytes (42). 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 (43). 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 (44). 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 (45, 46). Despite the above, since the inception of modern-day photobiological research, a vast *in vitro* and *in vivo* data base 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 the data presented here strongly highlight the necessity of employing properly-filtered UVB sources (as opposed to, or in conjunction with 254-nm UV) for future investigations which specifically aim to elucidate the actual mechanisms of skin cancer development in humans.

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 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.

REFERENCES

1. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. & Ponten, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 10124-10128.
2. You, Y. H., Lee, D. H., Yoon, J. H., Nakajima, S., Yasui, A. & Pfeifer, G. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 44688-44694.
3. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **221**, 47-70.
4. Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. (1984) *Carcinogenesis* **5**, 511-514.
5. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. (1999) *Genes Dev.* **13**, 768-785.
6. Svejstrup, J. Q. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 21-29.
7. Nance, M. A. & Berry, S. A. (1992) *Am. J. Med. Genet.* **42**, 68-84.
8. Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. & Mayne, L. V. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 4707-4711.
9. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. & Brash, D. E. (1994) *Nature* **372**, 773-776.
10. Jonason, A. S., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R. J., Spinelli, H. M., Persing, J. A., Leffell, D. J., Tarone, R. E. & Brash, D. E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 14025-14029.

11. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8876-8880.
12. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28073-28080.
13. Ford, J. M., Baron, E. L. & Hanawalt, P. C. (1998) *Cancer Res.* **58**, 599-603.
14. Adimoolam, S., Lin, C. X. & Ford, J. M. (2001) *J. Biol. Chem.* **30**, 25813-25822.
15. Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C. & Fornace, A. J., Jr. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 3705-3714.
16. Wani, M. A., Zhu, Q., El-Mahdy, M., Venkatachalam, S. & Wani, A. A. (2000) *Cancer Res.* **60**, 2273-2280.
17. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 424-428.
18. Adimoolam, S. & Ford, J. M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 12985-12990.
19. 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. & et al. (1995) *Nature Genet.* **10**, 188-195.
20. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. & Nakamura, Y. (2000) *Nature* **404**, 42-49.
21. McKay, B. C., Francis, M. A. & Rainbow, A. J. (1997) *Carcinogenesis* **18**, 245-249.

22. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C. & Drobetsky, E. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 15038-15043.
23. Tyrrell, R. M. (1996) *Exs* **77**, 255-271.
24. Drouin, R., Therrien, J.P., Angers, M., & Ouellette, S. (2001) in *Methods in Molecular Biology: DNA-Protein Interactions, Principles, and Protocols*, ed. Moss, T., (Humana Press, Totawa, NJ), pp. 175-219.
25. Angers, M. Cloutier, J.F., Castonguay, A., & Drouin, R. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, e83.
26. Drouin, R., Gao, S., & Holmquist, G. P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P., (Plenum Press, New York), pp. 37-43.
27. Tu, Y., Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996) *EMBO J* **15**, 675-683.
28. Rozek, D. & Pfeifer, G. P. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5490-5499.
29. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D. & Holmquist, G. P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1374-1378.
30. Mellon, I., Spivak, G. & Hanawalt, P. C. (1987) *Cell* **51**, 241-249.
31. Leger, C. & Drobetsky, E. A. (2002) *Carcinogenesis* **23**, 1631-40.
32. Chuang, Y. Y., Chen, Q. & Liber, H. L. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3073-3076.
33. Yu, Y., Li, C. Y. & Little, J. B. (1997) *Oncogene* **14**, 1661-1667.
34. Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. & Karin, M. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 2804-28011.

35. Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Jordanov, M., Herrlich, P. & Rahmsdorf, H. J. (1997) *J. Photochem. Photobiol.* **37**, 1-17.
36. Gjerset, R. A., Lebedeva, S., Haghghi, A., Turla, S. T. & Mercola, D. (1999) *Cell Growth Differ.* **10**, 545-554.
37. Potapova, O., Haghghi, A., Bost, F., Liu, C., Birrer, M. J., Gjerset, R. & Mercola, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14041-14044.
38. Dhar, V., Adler, V., Lehmann, A. & Ronai, Z. (1996) *Cell Growth Differ.* **7**, 841-846.
39. Adler, V., Polotskaya, A., Kim, J., Dolan, L., Davis, R., Pincus, M. & Ronai, Z. (1996) *Carcinogenesis* **17**, 2073-2076.
40. Adler, V., Fuchs, S. Y., Kim, J., Kraft, A., King, M. P., Pelling, J. & Ronai, Z. (1995) *Cell Growth Differ.* **6**, 1437-1446.
41. Medrano, E. E., Im, S., Yang, F. & Abdel-Malek, Z. A. (1995) *Cancer Res.* **55**, 4047-4052.
42. Dhanwada, K. R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R. & Pelling, J. C. (1995) *Oncogene* **11**, 1947-1953.
43. Tyrrell, R. M. (1996) *Bioessays* **18**, 139-148.
44. Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D. & Ronai, Z. (1999) *Oncogene* **18**, 6104-6111.
45. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. (2002) *Front. Biosci.* **7**, d765-83.
46. Ullrich, S. E. (2002) *Front. Biosci.* **7**, d684-703.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : 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. 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 LM-PCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. For each strain, the following seven lanes show LM-PCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells that have undergone repair for the indicated times. The last lane for each strain shows LM-PCR 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 2 : Influence of p53 status on CPD removal along the TS and NTS of the *c-jun* and *hprt* loci in TK6, TK6-5E, and NH32 treated with polychromatic UVB. **A**, transcribed strand of *c-jun*; each data point represents the mean of 39 sites using primers JE (nucleotides +18 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 3 : 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. 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 4 : Repair of 254-nm UV-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the TS of the human *hprt* gene in TK6 and NH32. 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.

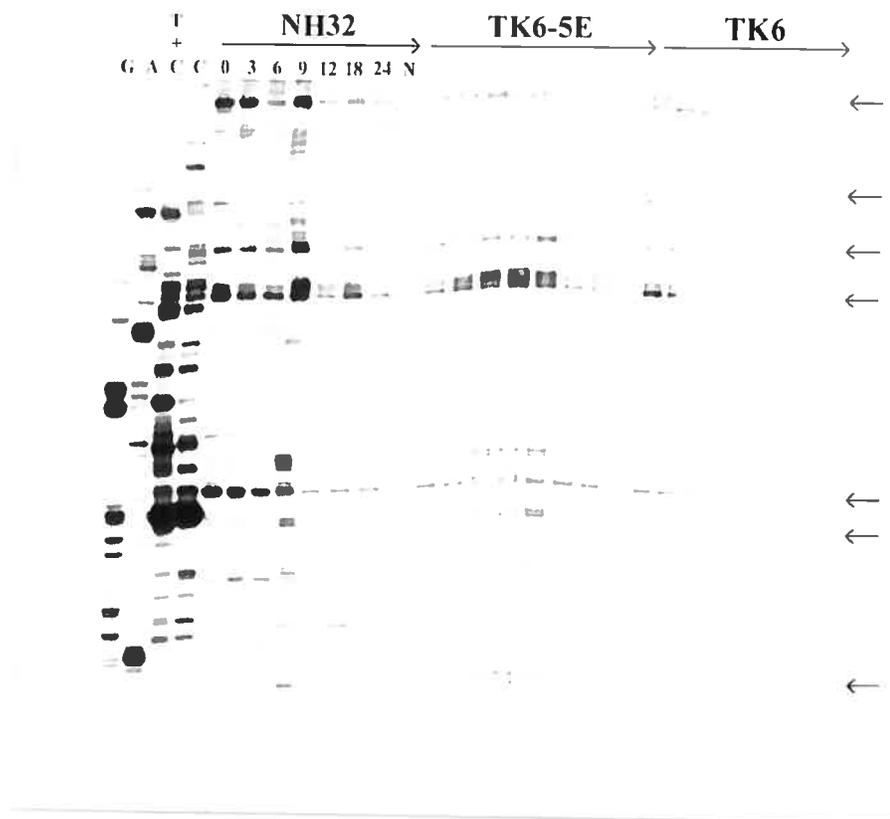
Figure 5 : Influence of p53 status on CPD removal along the transcribed and nontranscribed strands of *c-jun* and *hprt* in TK6 and NH32 treated with monochromatic 254nm-UV. **A**, transcribed and nontranscribed strand of *c-jun* using primers JE (nucleotides +18 - +190) and JS (nucleotides +233 - +389) 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 .

Table I. Oligonucleotide primers for exon 2 and 3 of *hprt* gene.

Primer	Sequence	T _m (°C)	Exon
HA-1	5'-ATCCAATCAAAATGTTGTATC	50.2	
HA-2	5'-GTTGTATCCTGTAATGCTCTCATGAAAC	60.6	2
HB-1	5'-GAAGATTTAGAAAGCATCAG	52.1	
HB-2	5'-CCTAGTTATGTTCAAATAGCAAGTACTCAG	60.7	
HC-1	5'-TTGGTGTGGAAAGTTTAATG	51.0	
HC-2	5'-GTGGAAAGTTTAAATGACTAAGAGGGTGTG	60.6	3
HD-1	5'-GAAAATATAAGAAAACCTACTG	50.7	
HD-2	5'-GAAAACCTACTGTGCCACTAAAAGAATC	60.6	

Legend: This table describes the principals features of the primers used for the LM-PCR of the *hprt* gene. The first primer of each pair is used in the primer-extension reaction while the second primer is used for the amplification (see material and methods). The position refers to the genomic localisation of each primer: these primers are located in the introns on each side of the indicated exon. T_m stands for "melting temperature".

**Figure 1**

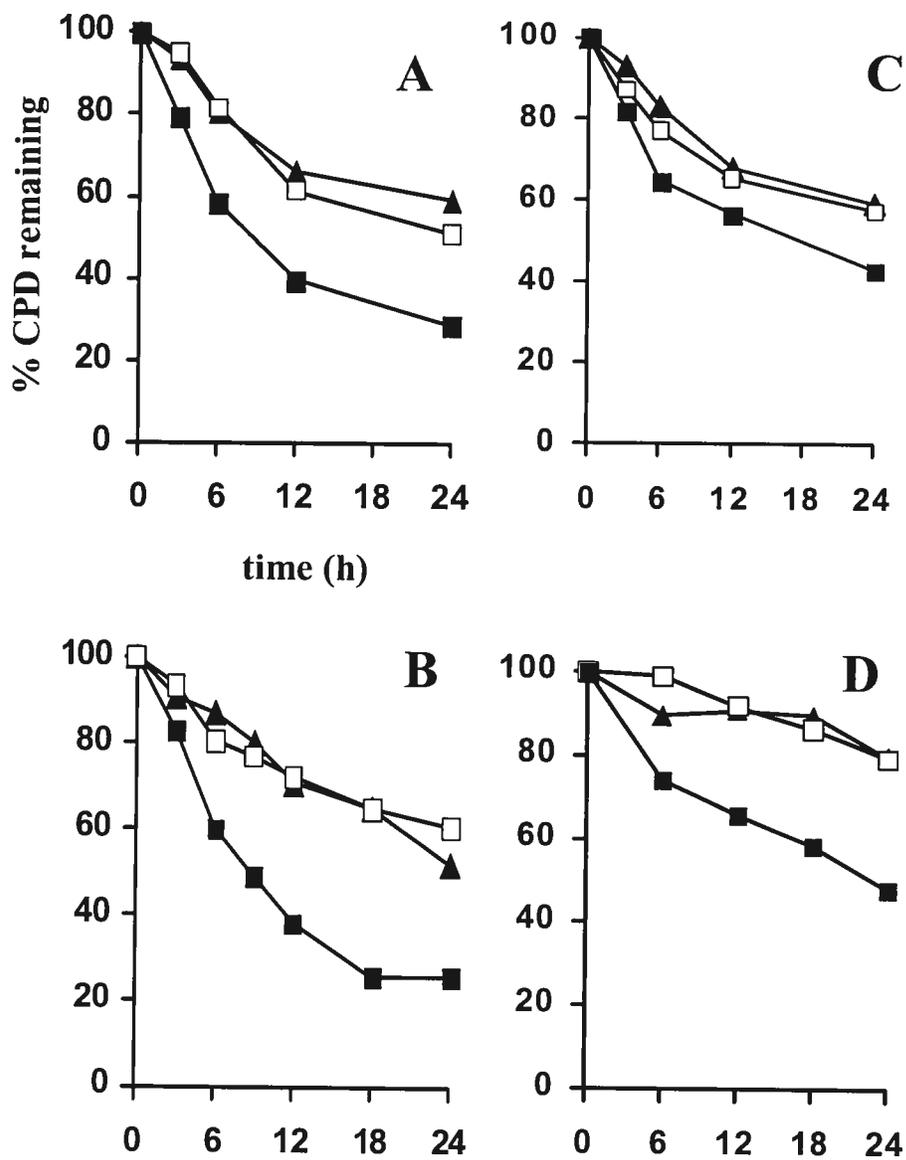
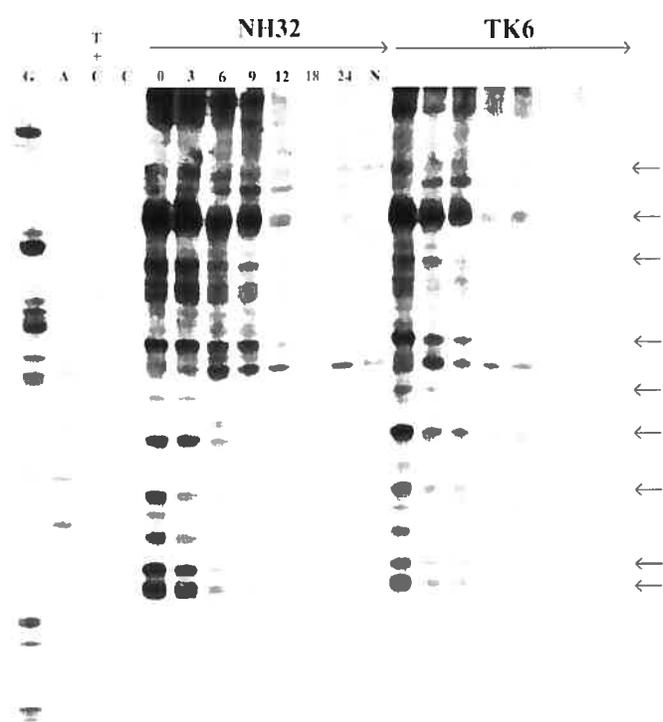
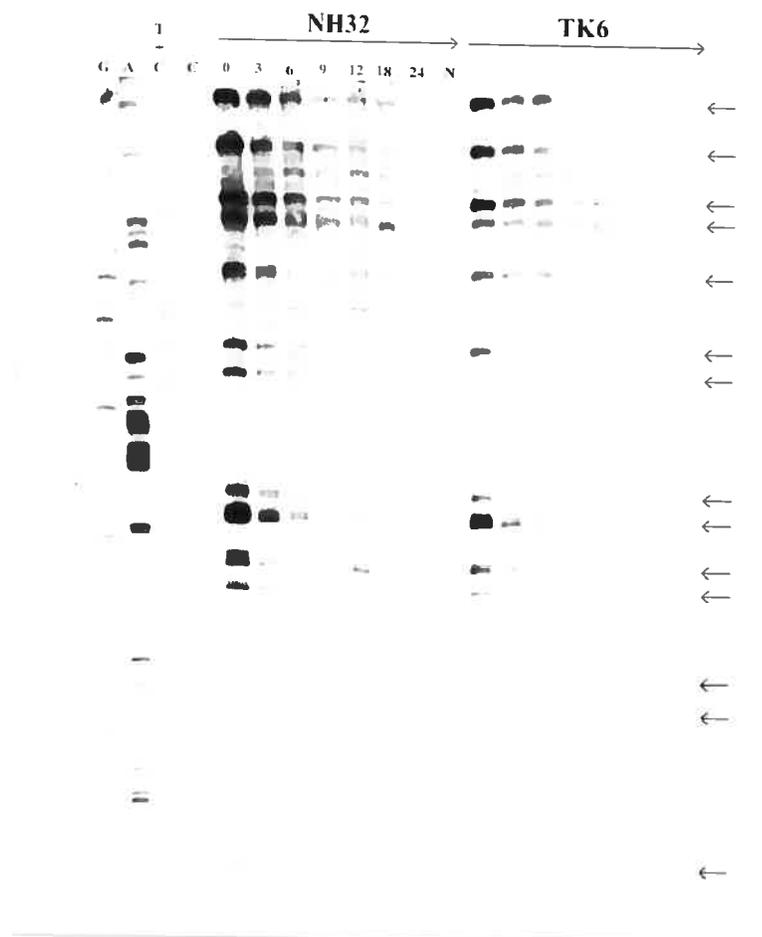


Figure 2

**Figure 3**

**Figure 4**

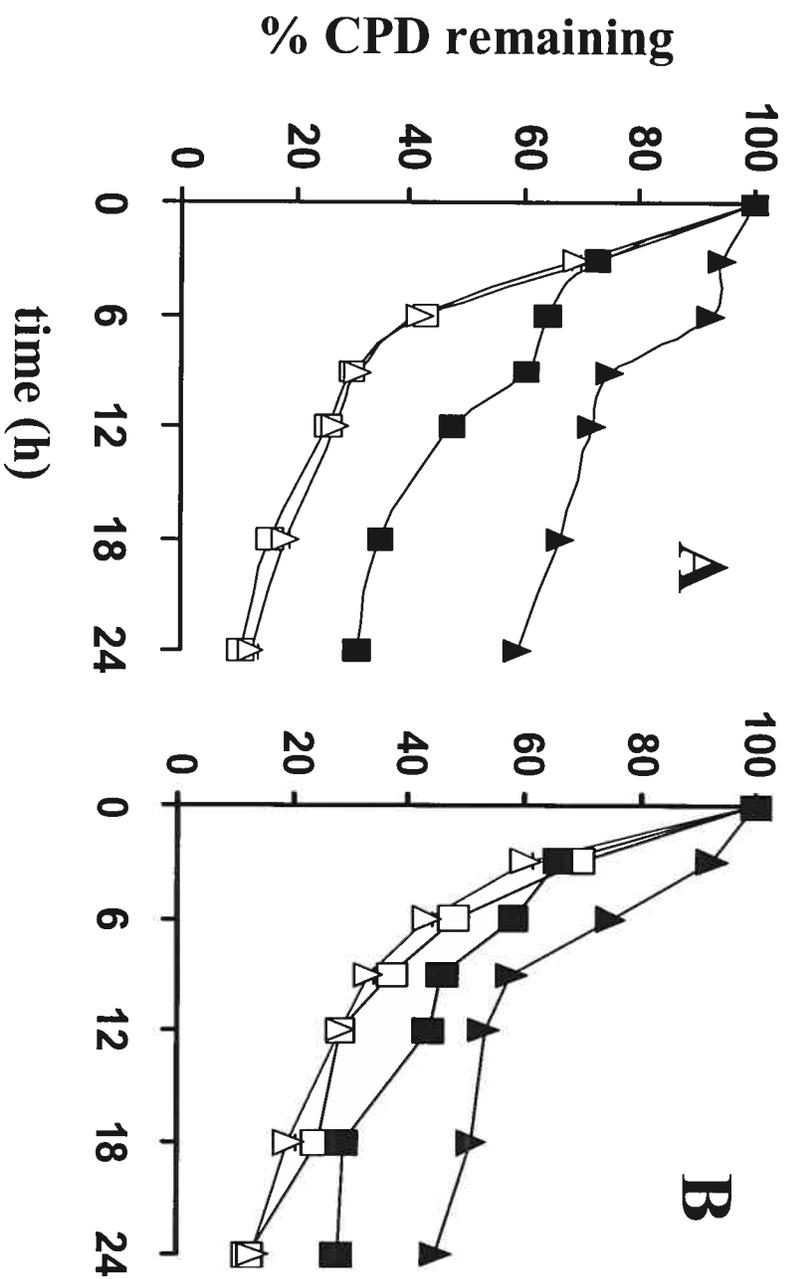


Figure 5

Chapitre 4: Discussion

Cette thèse a pour but l'étude des rôles de la protéine p53 dans la réponse des cellules humaines à un traitement aux UV environnementaux représentés ici par la lumière solaire simulée. Les objectifs secondaires visent à 1) déterminer la validité du modèle d'inactivation de p53 par l'expression de la protéine E6 du virus du papillome humain, 2) déterminer la validité du modèle des UV 254nm pour simuler la réponse aux UV environnementaux et 3) déterminer plus précisément le rôle de la protéine p53 dans la réparation par excision de nucléotides et dans la mutagenèse induite par une exposition aux UV.

1 Comparaison de différents modes d'inactivation de p53

Dans la discussion accompagnant les travaux présentés dans le deuxième chapitre de cette thèse, il a été clairement mentionné que l'expression de la protéine E6 du virus du papillome humain de haut risque n'est pas un bon modèle d'inactivation de la protéine p53, et ce pour l'étude de la majorité des processus cellulaires régulés par ce gène suppresseur de tumeur. Il est tout de même important de remarquer que lors des études de réparation décrites dans le troisième chapitre de cette thèse, nous n'avons observé aucune différence entre la vitesse de réparation des CPD retrouvés dans les cellules p53 K.O. vs celles exprimant la protéine HPV E6 (Voir figure 1 et 2 du chapitre 3). De plus, l'analyse du spectre de mutations produit au locus HPRT suite à un traitement à la lumière solaire simulée (voir figure 6 du chapitre 2) ne présente aucune différence significative entre les deux modes d'inactivation de la protéine p53. La protéine HPV E6 ne semble pas affecter la mutagenèse par d'autres moyens que

l'inactivation de p53 et peut donc être utilisé pour l'étude de l'influence de p53 sur le NER et la mutagénèse induite par les UV.

La découverte de la modulation de la la stabilité et/ou de la fonction de plusieurs protéines cellulaires, en plus de p53, par l'oncoprotéine E6 du virus HPV de haut risque aide à comprendre les différences existantes entre le modèle génétique et le modèle fonctionnel d'inactivation de p53 présentées dans cette thèse. Par exemple, il a été démontré que HPV E6 active la dégradation des protéines cellulaires suivantes: c-myc (Gross-Mesilaty et al. 1998), Bak (Thomas and Banks 1998), E6TP1 (Gao et al. 2001), MAGI-1, -2 and -3, (Glaunsinger et al. 2000), DLG (Lee, Weiss, and Javier 1997), Vartul (Nakagawa and Huijbregtse 2000) et mcm7 (Kuhne and Banks 1998); qu'elle lie les protéines: E6BP (Chen et al. 1995), TNFR1 (Filippova et al. 2002), zyxin (Degenhardt and Silverstein 2001), MAGUK (Thomas et al. 2001) ainsi que le récepteur orphelin TR2 (Collins et al. 2001) et qu'elle inactive les protéines p73 (Park et al. 2001) et ADA3 (Kumar et al. 2002). De plus, l'oncoprotéine E6 est capable d'activer le promoteur du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (Lopez-Ocejo et al. 2000), d'induire des mutations de façon p53 dépendante et indépendante (Kim, Guo, and Park 2000) et de moduler le cycle cellulaire en provoquant l'accumulation de cdc2, la cycline A et B (Thompson et al. 1997).

Bien que la protéine HPV E6 ne soit pas un bon modèle pour l'étude de l'inactivation de p53, il n'en demeure pas moins que cette protéine mérite d'être plus étudiée puis qu'elle est l'une des deux principales protéines oncogéniques du virus du papillome humain. Ce dernier est l'agent viral transmissible sexuellement

le plus commun aux États-Unis et est la principale cause du cancer du col de l'utérus (Barbosa 1996). L'utilisation de lignées isogéniques telles que celles utilisées dans cette étude, en conjonction avec l'utilisation d'une lignée à la fois génétiquement déficiente en p53 et exprimant la protéine HPV E6 (par exemple NH32-E6) pourrait aider à élucider les voies biochimiques régulées par cet oncogène. Toutefois, une telle lignée n'est pas encore construite puisque le gène de sélection du vecteur rétroviral contenant le gène codant pour la protéine HPV E6 est le même que celui utilisé pour inactiver un des allèles de p53 dans la lignée NH32. La sélection de la lignée NH32-E6 serait donc impossible. Afin de contourner ce problème, il faudra remplacer le gène de sélection à la néomycine contenu dans le vecteur rétroviral par un gène conférant une résistance à d'autres drogues (ni la néomycine ni l'histidinol), réintroduire ce vecteur dans la lignée "packaging", réinfecter les lignées TK6 et NH32, et refaire la sélection des clones ayant les mêmes caractéristiques de croissances. Et seulement ensuite il sera possible de reprendre les expériences présentées dans cette thèse afin de comprendre les effets p53-indépendents de HPV E6.

Il est donc possible de conclure que pour toutes nouvelles études portant sur le rôle de la protéine p53 dans un processus cellulaire donné, l'utilisation de modèles cellulaires exprimant la protéine E6 du virus du papillome humain de haut risque ne devrait être réalisée qu'en conjonction avec l'utilisation de modèle d'inactivation génétique afin de permettre la validation interne de ce modèle.

2 Les UV254nm pour modéliser les UV environnementaux

Les UV 254nm sont largement utilisés comme modèle pour l'étude des propriétés physiologiques des UV même s'ils sont bloqués par la couche d'ozone. Ils produisent les deux types de dommages majoritairement impliqués dans la photocarcinogénèse, soit les dimers cyclobutyliques de pyrimidines et les photoproduits 6-4, mais génèrent très peu de dommages oxydatifs ou de bris de l'ADN. Ces longueurs d'ondes peuvent être facilement produites par la simple utilisation de lampes germicides ne nécessitant pas d'appareillage complexe et étant disponible à faible coût. De plus, il existe une grande base de données sur les effets de ces longueurs d'ondes dans divers phénomènes physiologiques et ce dans de nombreux organismes, de *E.coli* à l'humain. Toutefois, tel que mentionné dans l'introduction, ces longueurs d'ondes activent également des chemins biochimiques qui peuvent différer de ceux activés par les UVB et les UVA. Il est donc essentiel de déterminer quelles sont les réponses cellulaires aux UV environnementaux qui peuvent être fidèlement reproduites par les UV 254nm et lesquelles ne le peuvent pas.

Les études rapportées ici indiquent que les courbes de survie suite aux 254nm UV et au SSL peuvent être corrélées par un simple facteur de correction, (i.e qu'à 5J/m^2 de 254nm UV nous retrouvons sensiblement la même survie qu'à 500kJ/m^2 de SSL) et ce pour toutes les doses étudiées. Ceci correspond parfaitement à ce qui avait été rapporté dans des fibroblastes humains (Patton et al. 1984) ou encore dans des cellules CHO (Drobetsky et al. 1994) traitées par ces mutagènes. Bien que l'amplitude de la réponse apoptotique soit plus élevée en

réponse au SSL comparativement aux UV 254nm, la cinétique observée reste la même. L'augmentation de la réponse apoptotique suite aux SSL par rapport aux UV 254nm pourrait être due à la production accrue de réactifs oxygénés endommageant les composantes cellulaires, la mitochondrie et la membrane plasmique par le SSL.

En fait, la seule réponse étudiée à présenter à la fois une cinétique et une étendue de réponse identique entre les UV 254nm et le SSL (à des doses équitoxiques) est l'arrêt en G1 dans les cellules normales. Toutefois, la durée de l'arrêt en G1 suite aux UV 254nm dans des cellules exprimant la protéine E6 du virus du papillome humain est prolongée par rapport à la durée obtenue suite à un traitement à une dose équitoxique de SSL, ce qui suggère que bien que la durée et la cinétique de l'arrêt soient identiques dans les cellules normales, les mécanismes régulant ce processus fondamental de protection diffèrent entre les UV 254nm et la SSL. La quantité de réactifs oxygénés ainsi que les voies de signalisation activées par les UV varient selon la longueur d'onde et ceci constitue probablement l'une des causes des différences observées. L'étude plus approfondie des protéines cellulaires liées par l'oncoprotéine E6 couplée à une analyse des protéines et aux chemins biochimiques induits différenciellement par les UV 254nm et le SSL pourraient également aider à cerner les différentes voies menant à l'activation de l'arrêt en G1.

Une réponse contradictoire entre celle observée suite à un traitement aux UVC par rapport aux UVB n'est observée que dans le cas de la réparation par excision de nucléotides. L'étude au niveau nucléotidique de la vitesse de

réparation des CPD induits par les UVB et logés dans le brin transcrit vs le brin non-transcrit du gène HPRT démontre clairement que la protéine p53 est nécessaire autant pour le TCNER que le GNER. Mes collègues sont également arrivés à la même conclusion en étudiant la réparation à d'autres locus, soit c-jun ou p53 (Therrien et al. 1999; Therrien et al. 2001). Toutefois, suite à une irradiation aux UV 254nm, la protéine p53 n'est plus requise pour le couplage de la réparation et de la transcription (ce sujet est discuté en détails à la section 3a).

Il est également possible d'observer que la vitesse de réparation du brin non-transcrit au locus HPRT est plus rapide que celle au locus c-jun (et ce indépendamment du statut de p53) suite à un traitement aux UV 254nm mais non suite aux UVB. En fait, suite aux UV 254 nm, le brin non-transcrit du gène HPRT est réparé aussi rapidement que le brin transcrit. Ce phénomène avait déjà été rapporté suite à une irradiation aux UV 254 nm pour un autre gène "housekeeping", soit APRT, dans des cellules CHO (Zheng et al. 2001). Ces cellules sont déficientes dans la réparation des CPD situés dans le brin non-transcrit, tel que montré au locus DHFR (même étude). De plus, les auteurs ont déterminé qu'il ne pouvait s'agir d'une réparation couplée à la transcription se produisant sur les deux brins puisque même lorsque l'expérience est répétée avec des cellules CHO dont le promoteur de APRT a été délété (donc sans aucune transcription de ce locus), une forte réparation des deux brins de APRT est tout de même observé. Afin de déterminer si la structure nucléosomique et le contexte génomique du locus étudié pouvait être la cause de cette observation, les auteurs ont étudié la réparation du locus APRT intégré à différents endroits dans le

génomique. Les auteurs en sont venus à la conclusion que le contexte génomique, mais non la structure nucléosomale seule pouvait expliquer cette différence (Feng et al. 2002). Il est possible que cette conclusion s'applique également aux résultats obtenus pour le locus HPRT. Lors d'un traitement aux ultraviolets, les facteurs impliqués dans le NER sont recrutés aux sites d'attachement à la matrice nucléaire (Balajee, May, and Bohr 1998) et un tel site a été retrouvé dans les gènes APRT et c-jun (Johnson 1993) (Chong, Taylor, and Piper 1995). Étant donné que la vitesse de réparation du brin non-transcrit de HPRT suite à un traitement aux UVB est beaucoup plus lente que suite à un traitement aux UV 254nm (50% de réparation: 24hrs vs 9hrs, respectivement), il est possible de supposer que les UV 254nm (mais non les UVB) induisent l'activation d'une protéine responsable du remodelage du contexte génomique environnant les sites d'attachements à la matrice nucléaire permettant une réparation très rapide des deux brins d'ADN des gènes situés près de ces régions. Il serait intéressant d'étudier la réparation de APRT suite à un traitement aux UVB, afin de déterminer si les résultats obtenus aux locus HPRT se reproduisent dans ce locus et également d'étudier la réparation d'autres gènes connus pour contenir une séquence d'attachement à la matrice nucléaire, tel que le gène de la topoisomérase I (Romig et al. 1994). Enfin, il pourrait être intéressant de déterminer quelles sont les protéines liées à aux sites d'attachement à la matrice nucléaire suite à un traitement aux UV 254nm vs aux UVB par DNA ChIP.

3 La protéine p53 et la mutagénèse induite par les UV

3.1 Implication de la protéine p53 dans la réparation par excision de nucléotides:

L'importance du rôle de la protéine p53 dans la réparation couplée à la transcription suite à un traitement aux UVB est en accord avec le rôle connu de p53 dans le rétablissement de la transcription suite à ce mutagène (McKay and Ljungman 1999). Il a en effet été montré, tel que mentionné dans l'introduction, que le TCNER sert à libérer les séquences codantes de dommages pouvant empêcher la transcription de gènes importants pour la survie de la cellule (McKay and Ljungman 1999). Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'implication différentielle de p53 dans le TCNER induit par les UVB vs UV 254nm.

Premièrement il est possible que les UV 254nm induisent l'expression de protéines impliquées dans la réparation couplée à la transcription qui sont fonctionnellement redondantes avec p53 mais qui ne sont pas activées par les UVB. Plusieurs protéines ayant un rôle à jouer dans la réparation par excision de nucléotides ou interagissant avec une des protéines impliquées dans ce processus ont été récemment découvertes dont XAB-1 (Nitta et al. 2000) et -2 (Nakatsu et al. 2000), l'homologue humain de la protéine MMS19 de levure (qui interagit avec les protéines XPB et XPD) (Seroz et al. 2000) et la protéine cullin4A (Shiyanov, Nag, and Raychaudhuri 1999). La première étape à réaliser afin de déterminer si ces protéines peuvent expliquer l'implication différentielle de p53 dans le TCNER serait de déterminer si elles peuvent être activées différemment par les UV 254nm et les UVB. De plus, la technique du

LMPCR en conjonction avec l'utilisation d'un système cellulaire dans lequel p53 et/ou la protéine supposée être impliquée dans le TCNER seront inactivées, permettra de déterminer si ces protéines fonctionnent dans un même chemin biochimique ou si elles font parties de deux voies distinctes. L'inactivation spécifique de ces protéines pourrait être obtenue par l'expression d'un ARNm antisens spécifique à chacune de ces protéines. D'autres protéines, encore inconnues, peuvent également avoir un rôle à jouer dans le TCNER suite aux UV 254nm mais non suite aux UVB. Plusieurs études ont examiné le patron d'expression des gènes avec ou sans traitement aux UVB et aux UV 254nm. Toutefois, aucune de ces études n'a examiné l'expression différentielle des gènes entre ces deux longueurs d'ondes dans une même lignée cellulaire et avec une méthode unique. Afin d'identifier ces protéines, il serait intéressant de comparer le patron d'expression des gènes dans la lignée TK6 suite à un traitement aux UVB, aux UV 254nm, au SSL ou encore sans traitement grâce à la technologie des "high density oligonucleotides arrays". Ce type d'expérience a déjà été réalisé dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (Birrell et al. 2001) et les auteurs ont rapporté que sur les 31 gènes conférants une protection contre les UV 254nm, 27 étaient retrouvés lors d'un traitement aux UVB. Ces résultats devront être ensuite confirmés par des études de RT-PCR en temps réel et complétés par des études fonctionnelles. Ces études ne permettront toutefois pas de détecter des protéines dont l'activation est atteinte par modifications post-traductionnelles ou encore par une relocalisation cellulaire.

Deuxièmement, il est possible que les protéines normalement contrôlées par p53 et impliquées dans le TCNER, soient régulées indépendamment de p53 par les UVC et non par les UVB, et ce dû à l'activation de voies de signalisation différentes. Ceci suppose que ce n'est pas la protéine p53 en elle-même qui agit au niveau du TCNER mais bien l'une de ces cibles transcriptionnelles. Par exemple, la protéine Gadd45, (impliquée dans le GNER), est activée par les UVB de façon p53 dépendante et indépendante (Maeda et al. 2003). Il a été également montré que la kinase "Jun Kinase", faisant partie de la famille des MAP kinases et qui est impliquée dans la phosphorylation de p53, est activée beaucoup plus fortement suite à un traitement aux UV 254nm qu'aux UVB (plus de 15X par les UV 254nm mais seulement à un niveau 3X supérieur au niveau basal par les UVB) et qu'elle est impliquée dans la régulation de la réparation de l'ADN (Potapova et al. 1997). Il est toutefois peu probable que cette kinase contribue à l'initiation de la réparation couplée à la transcription puisqu'elle est activée par le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN (NER (Ramaswamy and Pelling 1999) et MMR (Nehme et al. 1997) au site endommagé et non le contraire (Adler et al. 1995). Il a en effet été démontré que l'induction de cette kinase est diminuée dans les cellules déficientes pour le gène CSB et qu'un extrait cellulaire dérivé de celles-ci ne pouvait induire cette kinase suite à l'ajout d'un ADN endommagé. De plus, cette kinase est activée à un niveau plus ou moins élevé dans plusieurs lignées présentant des déficiences dans des gènes de réparation par excision de nucléotides (Dhar et al. 1996). Toutefois, plusieurs autres voies de signalisation peuvent être impliquées, dont la voie ERK1-2 qui est modulée de façon

différentielle par les UV (Dhanwada et al. 1995). Afin de déterminer plus précisément quels gènes peuvent être impliqués, l'étude de l'expression différentielle des gènes suite aux UVB vs UVC devra être reproduite dans les cellules NH32 et le résultat comparé avec celui obtenu dans la lignée TK6. De plus, des études d'inactivations sélectives de différentes voies des MAPK (JunK, p38 ou ERK-1/-2) permettra de mieux comprendre les voies de signalisation menant à l'activation du TCNER.

La technique de LM-PCR ne permet pas d'identifier une déficience dans n'importe laquelle des étapes du NER. En effet, elle est limitée aux étapes précédant la resynthèse du brin excisé. Il est donc possible que le facteur régulé par p53 et affectant la réparation sur le brin transcrit suite à un traitement aux UVB ne soit pas spécifique à la voie TCNER mais bien qu'il fasse partie d'une des étapes communes qui précèdent la resynthèse, soit la stabilisation de la bulle d'excision ou le positionnement des nucléases. La technique de LMPCR ne nous permet toutefois pas de discriminer entre ces différentes étapes. Il serait intéressant de regarder la régulation de l'expression, de la localisation et de la fonction des protéines connues pour avoir un rôle spécifiquement dans le TCNER (comme par exemple les protéines CSB-A et CSB-B) et modulées par la protéine p53 lorsque les cellules sont traitées aux UVB comparativement aux UV 254nm.

3.2 Le contournement des dommages résiduels:

La réparation adéquate de l'ADN est primordiale pour les cellules, quoiqu'une réparation imparfaite ne mène pas nécessairement à l'accumulation de mutations et à la progression cancéreuse, tel qu'illustré par la très faible augmentation d'incidence de cancer de la peau chez les patients atteints du syndrome de cockaine (de Boer and Hoeijmakers 2000a). Les cellules de ces patients démontrent une augmentation accrue de la réponse apoptotique en réponse aux UV (van Oosterwijk MF 1996). Toutefois, lorsque l'induction de l'apoptose est également anéantie, tel que chez les souris déficientes en p53, il y a augmentation de l'incidence de ce type de cancer. Elles accumulent ainsi des mutations inactivatrices dans des gènes essentiels pour le contrôle du cycle cellulaire, l'inhibition de contact et le maintien de l'intégrité génétique, favorisant l'apparition d'un phénotype tumoral. Les mutations sont causées par deux mécanismes différents soit l'infidélité de polymérisation des ADN polymérase impliquées dans la réparation ou la réplication à partir d'un brin non-endommagé ou encore le contournement avec erreur des dommages causés par les UV par les polymérase spécialisées (Strauss 2002). Donc, il est raisonnable de s'attendre à ce que mes résultats démontrent une augmentation des mutations dans les cellules déficientes en p53 suite à un traitement aux UV, ce qui n'est toutefois pas le cas (voir figure 5 du chapitre 2). Il est important de se rappeler que la fréquence de mutation a été mesurée dans les cellules ayant survécu à l'irradiation et que bien que l'apoptose soit une composante importante pour décider si une cellule continue à proliférer suite à un traitement ou non, elle n'est pas la seule

composante. Ainsi, une cellule peut arrêter de façon permanente dans le cycle cellulaire, s'éteindre par mort répllicative ou encore entrer en sénescence précoce. Des études ont déjà démontré que les cellules lymphocytaires n'entrent pas en arrêt permanent, mais très peu d'études ont porté sur les deux autres mécanismes. Toutefois, comme mentionné plus haut, seules les cellules survivantes ayant accumulé des mutations au niveau de gènes critiques mèneront à un cancer; alors il est important de pouvoir mesurer le rythme de mutation dans ces cellules. Un fait intéressant à remarquer est que la fréquence de mutations à une faible dose de radiation, soit 5J/m² ou 500KJ/m² de SSL induit la même fréquence de mutation dans les cellules p53 déficientes que dans la lignée sauvage. Toutefois, dans les cellules déficientes en p53, la courbe de mutabilité ne suit pas une progression dose-dépendante telle que retrouvée dans les cellules sauvages: on remarque plutôt la formation d'un plateau.

Il est possible d'envisager deux hypothèses qui expliqueraient ce phénomène: premièrement, les cellules présentant un niveau de dommages plus élevé que le niveau retrouvé à la dose où débute le plateau meurent. Il ne reste donc que les cellules faiblement endommagées. Ceci impliquerait que beaucoup plus de cellules ne parviendraient jamais jusqu'au stade de colonies dans les cellules p53 déficientes que les cellules sauvages, ce qui n'est toutefois pas le cas puisque l'on note que l'apoptose est diminuée dans les cellules p53 déficientes par rapport à la lignée sauvage et que la survie clonogénique est identique entre les deux lignées isogéniques.

La deuxième hypothèse, plus probable, implique une saturation du mécanisme de contournement des dommages avec erreur qui survient plus rapidement dans les cellules déficientes en p53 que dans les cellules sauvages. L'existence d'un contournement des dommages avec erreur vs sans erreur fut proposée en 1979 suite à la comparaison des niveaux de mutations induit après un traitement aux UV 254nm dans des fibroblastes normaux versus issus de patients atteints de la maladie Xeroderma Pigmentosum de type Variant (XPV) (Maher et al. 1979). Depuis, les protéines impliquées dans chacune de ces voies ont été identifiées. Le gène codant pour la protéine responsable du contournement sans erreur des CPD (la polymérase η) se nomme *XPV* et a été cloné par homologie au gène Rad30 de levure (Johnson et al. 1999). La polymérase responsable de la majorité des mutations suite aux UV est la polymérase zéta (Lawrence and Hinkle 1996). Elle est composée de trois sous-unités, soit Rev1, Rev3 et Rev7. La protéine Rev3 abrite le site catalytique de l'enzyme. La polymérase zéta est modérément processive mais ne possède pas d'activité exonucléase 3'→5'. Elle nécessite toutefois la sous-unité Rev7 afin de stimuler son activité catalytique (Lawrence and Hinkle 1996). Ce n'est qu'en 1998 que fut cloné, par deux groupes différents, l'homologue humain de la protéine Rev3 de *S. cerevisiae* (Gibbs et al. 1998; Xiao et al. 1998). Il a été démontré, par l'expression d'un ARN messager antisens à hRev3, que cette protéine est essentielle pour la formation des mutations suites aux UV et que l'inactivation de hRev3 n'interfère pas avec la survie de la cellule (Gibbs et al. 1998). Le contournement des dommages avec erreur ne représente qu'environ 5% du contournement total

effectué par une cellule, tel que déterminé lors d'expérience chez la levure ou encore en utilisant des cellules dérivées de patients XPV (Cordonnier and Fuchs 1999),(Cordonnier, Lehmann, and Fuchs 1999).

En effet, il est quelques fois plus avantageux pour la cellule de survivre, au prix d'une mutation, que de mourir (Kunz, Straffon, and Vonarx 2000). La polymérase zéta, chez la levure, n'est pas contrôlée au niveau transcriptionnel (Singhal, Hinkle, and Lawrence 1992). Il est donc peu probable que la protéine p53 influence l'homologue humain de cette polymérase à ce niveau. Il est également peu probable que ce gène suppresseur de tumeur influence directement la sous-unité catalytique puisqu'il a été démontré que l'expression d'un ARNm antisens à la protéine REV3 inhibe fortement la formation des mutations suite aux UV. Seul un faible niveau de mutations subsiste, équivalent au niveau de mutation induite par le métabolisme normal de la cellule. Toutefois, tel qu'observé à la figure 5 du chapitre 2, un niveau faible mais clairement plus élevé de mutations que le niveau basal est induit dans les cellules NH32 suite à un traitement aux UV. Récemment, plusieurs autres polymérases accessoires, i.e. impliquées seulement dans le contournement des dommages, ont été identifiées (Goodman 2002). Ainsi, il a été démontré que la polymérase iota agit de façon séquentielle avec la polymérase zéta afin de faciliter le contournement des CPD (Johnson RE 2000) et que cette polymérase est recrutée au site endommagé via une interaction avec la protéine PCNA (Haracska et al. 2001). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse suivante: la protéine p53 est impliquée soit dans la régulation de la sous-unité Rev7 (qui agit comme stimulateur de l'activité

enzymatique de Rev3), de la protéine iota ou encore dans la régulation d'une protéine interagissant avec l'une des sous-unités de la polymérase zéta. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant (1) de déterminer le niveau d'expression de l'ARNm de chacune des sous-unités de la polymérase zéta ainsi que de la polymérase iota. (2) De réaliser des études de contournements des CPD en utilisant des extraits cellulaires de cellules déficientes en XPV ou en XPV et en p53. (La déficience en XPV est nécessaire afin de s'assurer que nous observons bien les événements de contournement avec erreur et non le contournement sans erreur dû à la polymérase θ .) Cette expérience nécessitera l'utilisation d'un système *in vitro* de réplication utilisant un vecteur dont la réplication sera compatible avec p53. L'origine de réplication de SV40 est couramment utilisée mais ne pourra être utilisée puisque l'antigène grand T de ce virus, nécessaire à la réplication, inactive p53, ce qui rendrait l'étude des effets de p53 inefficace. La réplication du polyomavirus n'étant pas affectée par p53 (Kanda et al. 1994), cette origine de réplication virale pourra être clônée à la place de l'origine de réplication de SV40 du plasmide double-brins contenant un CPD utilisé pour étudier le contournement des dommages (Svoboda and Vos 1995).

3.3 La spécificité des mutations induites par les UV:

Le spectre de mutations produit suite à un traitement au SSL au locus HPRT n'a pas été corrélée avec la vitesse de réparation mesurée à ce même locus puisque l'expérience de LMPCR a été réalisée avec les UVB et non le SSL. Les UVB ont été utilisés au lieu du SSL pour une raison purement technique.

Toutefois, bien qu'il soit admis que la majorité des CPD produits par le SSL soient en fait induits par la composante UVB du SSL, il est possible que les mécanismes de contrôle de la réparation des CPD et/ou la fixation des mutations soit influencés par la longueur d'ondes utilisée. De plus, la corrélation entre la quantité de dommages et la formation d'une mutation à un site donné a déjà été effectuée dans les gènes HPRT (Kotturi et al. 1998) et gène p53 (You, Szabo, and Pfeifer 2000) pour les UVC 254nm et les UVB (respectivement). Une corrélation entre les "hotspots" de mutations dans le gène p53 des cancers de la peau chez l'humain et la vitesse de réparation à ces sites suite à un traitement aux UVB a également été réalisée (Tornaletti and Pfeifer 1994).

La lignée NH32 est plus résistante au 6-TG que la lignée sauvage, ce qui porte à croire que cette lignée est déficiente dans la voie de réparation des mésappariements (MMR) (Swann et al. 1996). Un site de liaison pour le facteur de transcription p53 est retrouvé dans le promoteur du gène hMSH2 (Scherer et al. 1996), codant pour une protéine impliquée dans le MMR. La présence de ce site de liaison à un impact fonctionnel puisqu'il a été montré que la protéine p53, en coopération avec la protéine c-jun, est capable d'induire la transcription de hMSH2 suite à un traitement aux UV254nm (Scherer et al. 2000). Étant donné que l'expression de la protéine p53 est abolie génétiquement dans la lignée NH32, il est possible de supposer que le phénotype de déficience en MMR est provoqué par une diminution (ou une abolition) de l'expression de hMSH2 dans cette lignée, d'où son phénotype de résistance à la 6-thioguanine.

La protéine hMSH2 peut former un hétéroduplexe avec la protéine hMSH6 et ainsi former le complexe MutS α qui reconnaît les mésappariements de bases et les petites insertions/délétions. hMSH2 peut également se lier avec hMSH3 pour former le complexe MutS β qui reconnaît les petites insertions/délétions mais qui démontre une très faible affinité pour les mésappariements base-base. Toutefois, les dimères de pyrimidines ne sont pas reconnus par le système de réparation des mésappariements (O'Driscoll et al. 1999). De plus, il a été démontré que les dommages composés (dimères et mésappariements) sont reconnus deux fois moins bien qu'un mésappariement simple (Mu et al. 1997). Toutefois, ces études ne permettent pas de conclure de façon définitive que le MMR n'a aucun effet sur la spécificité des mutations retrouvées suite aux UV. Afin de déterminer l'impact d'une déficience en MMR sur le spectre de mutation produit suite à un traitement aux UV 254nm, un gène rapporteur traité aux UV 254nm a été introduit dans une lignée dérivée de TK6 présentant une déficience en hMSH6 (nommée MT1). Les résultats de cette étude démontrent que l'abolition de hMSH6 n'influence ni la survie, ni la fréquence de mutation suite à un traitement aux UV 254nm mais qu'elle influence la localisation des mutations (Tobi et al. 1999). Les auteurs ont noté une augmentation des mutations de type C \rightarrow T dans une suite de 5 cytosines présentes dans le vecteur navette pSP189 lorsque introduit dans la lignée MT1 par rapport à la lignée TK6.

Un site intéressant de la séquence codante de l'exon 2 du gène HPRT consiste en une suite de 6 guanines (positions 292-297, voir figure 6 du chapitre 2) situé sur le brin non-transcrit (6 cytosines sur le brin transcrit). A ce site, il est

possible d'observer 5 mutations dans la lignée p53 déficientes NH32 mais aucune dans la lignée sauvage TK6. L'hypothèse suivante a donc été émise: l'apparition du site d'occurrence multiples de mutations dans la suite de 6 guanines du gène HPRT retrouvée dans la lignée p53-déficiente suite à un traitement au SSL est causée par l'inactivation du MMR.

Cette hypothèse devra être vérifiée expérimentalement. Dans un premier temps, le niveau d'expression du gène hMSH2 dans les lignées NH32 et TK6 devra être évalué autant au niveau de l'expression de l'ARN messager que de la protéine. De plus, afin d'évaluer si la résistance est bel et bien due à l'incapacité de la cellule à effectuer le MMR, la résistance à d'autres drogues que le 6-thioguanine, telle que l'étoposide ou encore le cisplatine, (Lage and Dietel 1999) devra être évaluée. Si le niveau d'expression de la protéine n'est pas affecté, il est peu probable que la résistance au 6-TG observée dans la lignée NH32 soit causée par une diminution de la capacité de la cellule à effectuer le MMR. Il sera alors possible que la lignée NH32 soit résistante au 6-TG suite à une augmentation de l'expression de la protéine MRP4, qui est responsable du transport du 6-TG hors de la cellule (Chen et al. 2003), (Lai and Tan 2002) et que l'hypermutabilité du site contenant 6 guanines de l'exon 2 du gène HPRT dans la lignée NH32 ne soit pas due à une déficience en MMR. Toutefois, si une diminution de l'expression de hMSH2 est observée dans les cellules NH32, il sera intéressant de passer à l'expérience qui suit. Premièrement, l'inactivation de la protéine hMSH2 par l'introduction d'un vecteur exprimant de façon constitutive l'ARN messager antisens à celui de la protéine hMSH2 endogène permettra d'inactiver cette

dernière autant dans la lignée NH32 que dans la lignée TK6. Après avoir obtenu les lignées transfectées stables et s'être assuré que la protéine hMSH2 est bien inactivée dans ces lignées, il sera intéressant de reproduire le spectre de mutations dans ces lignées, aux mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre 2 et de comparer les résultats avec ceux représentés à la figure 6 du chapitre 2. Si l'analyse des résultats ne démontre pas l'apparition d'une augmentation des mutations au site étudié dans la lignée TK6 transfectée, il sera alors possible de conclure que le système MMR ne joue pas de rôle dans le phénotype d'hypermutableté observé dans la lignée NH32.

Il est également possible de supposer que l'augmentation des mutations à ce site soit simplement dû à l'inactivation du système du NER, ce qui entraîne une persistance des dommages à ce site et donc une augmentation des mutations lors de la réplication. Toutefois, lorsque étudié par la méthode du LMPCR, ce site ne semble pas être un site préférentiel (par rapport à un autre site dypirimidique) de formation des CPD. De plus, le niveau de dommage est trop faible pour permettre de déterminer si ce site est réparé de façon moins efficace que la moyenne.

3.4 Influence de la méthylation sur les mutations induites par le SSL:

Il a été démontré que la lumière solaire et les UVB induisent préférentiellement la formation de dimers de pyrimidine aux cytosines méthylées en 5' (5'-Met-CpG) situés dans un site dypirimidique. La position des sites méthylés n'a pas été déterminée expérimentalement dans le gène HPRT chez l'humain. La séquence codante de HPRT comporte neuf exons dans lesquels on

retrouve huit sites potentiellement méthylés. Trois de ces sites, si mutés, donneront naissance à une mutation silencieuse (parce que situés à la position Wooble d'un trinuécléotide) qui ne pourront être détectés par notre méthode de détection des mutations. Sur les cinq sites restants, seulement trois comportent aux moins deux pyrimidines adjacentes (soit CCG ou TCG) pouvant être la cible des UV. Un de ces sites (5'*CTCGAG*, position 236) est un site fortement muté suite au SSL dans les trois lignées étudiées. Toutefois, aucune mutation n'a été retrouvée aux deux autres sites potentiellement méthylés (5'*CCCGCA*, position 95 et 5'*TTCGTG*, position 593), et ce dans les trois lignées étudiées lors de cette expérience. Il est important de garder en mémoire que ce ne sont pas nécessairement tous les sites méthylés qui présenteront une augmentation des mutations. L'étude des gels de LMPCR au temps zéro (cette portion de gel n'est pas illustrée) nous permet d'estimer la quantité de CPD formés par le traitement, sans qu'il y ait eu réparation. Nous pouvons conclure que, suite à un traitement aux UVB, le niveau de dommage est effectivement plus élevé à ce site comparativement aux sites environnants. Tel que vu précédemment, un autre facteur pouvant influencer la formation des mutations à un site particulier est la vitesse de réparation à ce site. Toutefois, dans ce cas ci, la vitesse de réparation ne semble pas jouer un rôle prépondérant puisqu'elle est la même que la vitesse moyenne des sites environnant.

4 Objectif global: Étude des rôles de p53 dans la réponse aux UV:

Tel que mentionné dans la discussion du chapitre 2, les observations suivantes ressortent quant au rôle de p53 dans la réponse aux UV. Premièrement, p53 est un des déterminants majeurs de la réponse apoptotique des cellules humaines traitées aux UV. Deuxièmement, tel que démontré précédemment (Loignon and Drobetsky 2002), la protéine p53 ne joue aucun rôle dans l'arrêt à la frontière G1/S des cellules traitées aux UV. Troisièmement, la protéine p53 est impliquée dans le TCNER et GNER lorsque les cellules sont soumises à une irradiation aux UVB, la composante la plus mutagénique des UV environnementaux. Finalement, la protéine p53 influence la mutagenèse provoquée par les UV.

Toutes ces réponses sont interreliées. Par exemple, il est généralement admis que l'arrêt en G1 permet à la cellule de mieux réparer son ADN simplement en lui donnant plus de temps pour éliminer les nombreuses lésions qui l'encombrent avant de procéder à la duplication de son matériel génétique. Toutefois, dans la présente étude, il n'existe aucune différence dans la cinétique d'arrêt entre les cellules déficientes en p53 (et en réparation de l'ADN) et les cellules normales. Il semble donc que la quantité de dommages restant dans le génome ne soit pas le facteur clef déterminant la durée de l'arrêt G1/S.

Les études entreprises pour la réalisation de cette thèse permettent de conclure que, suite à une exposition aux UV, le rôle de suppresseur de tumeur attribué à la protéine p53 est principalement médié par deux mécanismes distincts soit l'induction de l'apoptose et la réparation par excision de nucléotides.

5 Conclusion générale:

Cette thèse renforce l'importance de la protéine p53 dans la protection des individus contre les cancers induits par les UV et contribue à l'avancement des connaissances scientifiques en décrivant clairement, et de façon détaillée, dans un modèle de lignées humaines isogéniques, les changements phénotypiques associés à l'abolition du gène suppresseur de tumeurs p53 dont l'importance dans l'étiologie de la majorité des cancers humains est maintenant fortement établie.

Les présentes études mettent l'emphase sur la nécessité de choisir avec soin les modèles utilisés pour étudier les UV environnementaux et l'effet de l'inactivation de p53 sur la réponse des cellules humaines. De plus, ces recherches permettent de mieux cerner les relations existant entre les différentes voies de protection des cellules humaines face aux UV environnementaux.

Cette étude jette donc les bases d'une meilleure connaissance des effets néfastes des UV environnementaux et ainsi permet la mise au point de moyens de protection et/ou de traitements des cancers induits par les UV qui sont, ironiquement, émis par la source même de toute vie sur terre.

Bibliographie

1. Abeyama K et al (2000) A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J.Clin.Invest* 2000.Jun.;105.(12.):1751.-9. 105:1751-1759.
2. Adams PD (2001) Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cds. *Biochi. et biophys. Acta* 1471:M123-M133.
3. Adimoolam S and Ford JM (2002) p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (20):12985-12990.
4. Adler V et al (1995) jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell Growth Differ* 6 (11):1437-46.
5. Al-Mohanna MA et al (2001) p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 22 (4):573-8.
6. Aragane Y et al (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140 (1):171-82.
7. Ashkenazi A and Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11 (2):255-60.
8. Assefa Z et al (1997) Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* 108:886-891.
9. Baker SJ et al (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 (4901):217-21.
10. Balajee AS, May A, and Bohr VA (1998) Fine structural analysis of DNA repair in mammalian cells. *Mutat.Res.* 404 (1-2):3-11.
11. Barak Y (1995) Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. *J. Biol. Chem.* 270 (41):24174-24179.
12. Barbosa MS (1996) The oncogenic role of human papillomavirus proteins. *Crit Rev Oncogene* 7 (1-2):1-18.
13. Benchimol S et al (1985) Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 11 (5):505-10.
14. Bennett M et al (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282 (5387):290-3.

15. Bennett MR (1999) Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 58 (7):1089-95.
16. Benzer S (1961) On the topography of the genetic fine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 47:403-416.
17. Berg RJ, de Gruijl FR, and van der Leun JC (1993) Interaction between ultraviolet A and ultraviolet B radiations in skin cancer induction in hairless mice. *Cancer Res* 53 (18):4212-7.
18. Berg RJ et al (2000) Impact of global genome repair versus transcription-coupled repair on ultraviolet carcinogenesis in hairless mice. *Cancer Res* 60 (11):2858-63.
19. Berg RJ et al (1996) Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UVB radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93 (1):274-8.
20. Bertrand P et al (1998) Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (24):14278-83.
21. Birrell GW et al (2001) A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:12608-12613.
22. Bissonnette N and Hunting DJ (1998) p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 16 (26):3461-9.
23. Bohr VA et al (1985) 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 (2):359-69.
24. Boyle JM and Setlow RB (1970) Correlations between host-cell reactivation, ultraviolet reactivation and pyrimidine dimer excision in the DNA of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 51 (1):131-44.
25. Brash DE (1988) UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer. *Photochem Photobiol* 48 (1):59-66.
26. Brash DE et al (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88 (22):10124-8.
27. Brugarolas J et al (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377 (6549):552-7.

28. Buettner VL et al (1997) Spontaneous mutation frequencies and spectra in p53 (+/+) and p53 (-/-) mice: a test of the 'guardian of the genome' hypothesis in the Big Blue transgenic mouse mutation detection system. *Mutat Res* 379 (1):13-20.
29. Cadet J et al (1992) Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B* 15 (4):277-98.
30. Cariello NF (1993) Analysis of mutations occurring at the human hprt locus. *Journal of molecular biology* 231 (1):41-57.
31. Chen JJ et al (1995) Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* 269 (5223):529-31.
32. Chen ZS et al (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 *Mol Pharmacol* 63(2):351-8 .
33. Chereau D et al (2003) Structural and functional analysis of caspase active sites. *Biochemistry* 42 (14):4151-4160.
34. Chong S, Taylor KA, and Piper AA (1995) Intragenic matrix attachment and DNA-protein interactions in the human X-linked Hprt gene. *Biochim.Biophys.Acta* 1264:103-114.
35. Chuang YY et al (1999) Radiation-induced mutations at the autosomal thymidine kinase locus are not elevated in p53-null cells. *Cancer Res.* 59 (13):3073-3076.
36. Coffey PJ et al (1995) UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene* 11 (3):561-9.
37. Collins LL et al (2001) Feedback regulation between orphan nuclear receptor TR2 and human papilloma virus type 16. *J Biol Chem* 276 (29):27316-21.
38. Cordonnier AM and Fuchs RP (1999) Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res* 435 (2):111-9.
39. Cordonnier AM, Lehmann AR, and Fuchs RP (1999) Impaired translesion synthesis in xeroderma pigmentosum variant extracts. *Mol Cell Biol* 19 (3):2206-11.
40. Courtemanche C and Anderson A (1999) The p53 tumor suppressor protein reduces point mutation frequency of a shuttle vector modified by the chemical mutagens (+/-)7, 8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene, aflatoxin B1 and meta-chloroperoxybenzoic acid. *Oncogene* 18 (33):4672-80.
41. Courtois SJ et al (1997) Early ultraviolet B-induced G1 arrest and suppression of the malignant phenotype by wild-type p53 in human squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res* 233 (1):135-44.
42. Dammann R and Pfeifer GP (1997) Lack of gene- and strand-specific DNA repair in RNA polymerase III-transcribed human tRNA genes. *Mol Cell Biol* 17 (1):219-29.

43. de Boer J and Hoeijmakers JH (2000b) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21 (3):453-60.
44. de Boer J and Hoeijmakers JH (2000a) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21 (3):453-460.
45. de Laat WL (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and development* 13:768-785.
46. de Laat JM and de Gruijl FR (1996) The role of UVA in the aetiology of non-melanoma skin cancer. *Cancer Surv* 26:173-91.
47. de Laat WL et al (1998) DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes Dev* 12 (16):2598-609.
48. Degenhardt YY and Silverstein SJ (2001) Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J Virol* 75 (1):151-60.
49. DeLeo AB et al (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (5):2420-4.
50. Deng C et al (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82 (4):675-84.
51. Devary Y et al (1992) The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71 (7):1081-91.
52. Devary Y et al (1993) NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* 261 (5127):1442-5.
53. Dhanwada KR et al (1995) Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* 11 (10):1947-53.
54. Dhar V et al (1996) Impaired jun-NH2-terminal kinase activation by ultraviolet irradiation in fibroblasts of patients with Cockayne syndrome complementation group B. *Cell Growth Differ* 7 (6):841-6.
55. Douki T et al (1999) Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol* 70 (2):184-90.
56. Drobetsky EA et al (1994) The mutational specificity of simulated sunlight at the aprt locus in rodent cells. *Carcinogenesis* 15 (8):1577-83.
57. Drobetsky EA, Turcotte J, and Chateaufneuf A (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (6):2350-4.
58. Dulic V et al (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76 (6):1013-23.

59. Dumaz N et al (1997) The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice. *Carcinogenesis* 18 (5):897-904.
60. el-Deiry WS et al (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (4):817-25.
61. Eller MS, Ostrom K, and Gilchrest BA (1996) DNA damage enhances melanogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:1087-1092.
62. Eller MS, Yaar M, and Gilchrest BA (1994) DNA damage and melanogenesis. *Nature* 372:413-414.
63. Feng Z et al (2002) Transcription-coupled DNA repair is genomic context-dependent. *J.Biol.Chem.* 277 (15.):12777.-83.
64. Filippova M et al (2002) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277 (24):21730-9.
65. Ford JM, Baron EL, and Hanawalt PC (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 58 (4):599-603.
66. Ford JM and Hanawalt PC (1995) 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 (19):8876-80.
67. Franklin WA, Doetsch PW, and Haseltine WA (1985) Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct. *Nucleic Acids Res* 13 (14):5317-25.
68. Freedman DA, Wu L, and Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55 (1):96-107.
69. Frit P, Bergmann E, and Egly JM (1999) Transcription factor IIIH: a key player in the cellular response to DNA damage. *Biochimie* 81 (1-2):27-38.
70. Fuchs RPP (1984) DNA binding spectrum of the carcinogen N-acetoxy acetyl amino flourene significantly differs from the mutation spectrum. *J. mol. biol.* 177:173-180.
71. Gale JM, Nissen KA, and Smerdon MJ (1987) UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (19):6644-8.

72. Gao Q et al (2001) Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells. *J Virol* 75 (9):4459-66.
73. Garssen J et al (2000) Transcription-coupled and global genome repair differentially influence UV-B-induced acute skin effects and systemic immunosuppression. *J Immunol* 164 (12):6199-205.
74. Geng Y et al (1999) Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. *Cell* 97 (6):767-77.
75. Geyer RK et al (2000) Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ* 11 (3):149-56.
76. Giaccia AJ and Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12 (19):2973-83.
77. Gibbs PE et al (1998) A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12):6876-80.
78. Glaunsinger BA et al (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* 19 (46):5270-80.
79. Godar DE and Lucas AD (1995) Spectral dependence of UV-induced immediate and delayed apoptosis: the role of membrane and DNA damage. *Photochem Photobiol* 62 (1):108-13.
80. Gonzalzo ML and Jones PA (1997) Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res* 386 (2):107-18.
81. Goodman MF (2002) Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu.Rev.Biochem.* 71:17-50.
82. Griffiths HR et al (1998) Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci* 35 (3):189-237.
83. Gross-Mesilaty S et al (1998) Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (14):8058-63.
84. Gross A, McDonnell JM, and Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13 (15):1899-911.
85. Gujuluva CN et al (1994) Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene* 9 (7):1819-27.
86. Gupta S (1996) Apoptosis/programmed cell death. A historical perspective. *Adv Exp Med Biol* 406:1-9.

87. Haapajarvi T et al (1999) UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin-kinase inhibitor in a p53-independent manner. *Exp Cell Res* 248 (1):272-9.
88. Haapajarvi T et al (1995) Cell cycle dependent effects of u.v.-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 11 (1):151-9.
89. Haracska L et al (2001) Targeting of human DNA polymerase δ to the replication machinery via interaction with PCNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001.Dec.4;98.(25.):14256.-61. 98:14256-14261.
90. Harper JW et al (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4):805-16.
91. Havre PA et al (1995) p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* 55 (19):4420-4.
92. Hebra F KM (1874) On diseases of the skin, including the exanthemata. *New Sydenham Soc.* 61:252-258.
93. Hill LL et al (1999) Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* 285 (5429):898-900.
94. Hollstein M et al (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22 (17):3551-5.
95. Hollstein M et al (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 24 (1):141-6.
96. Horsfall MJ, Borden A, and Lawrence CW (1997) Mutagenic properties of the T-C cyclobutane dimer. *J Bacteriol* 179 (9):2835-9.
97. Howard A PS (1953) Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6 (supp):261.
98. Hsu YT WKYR (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:4386-4391.
99. Huang RP et al (1996) UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J.Cell Biol.* 133:211-220.
100. Hwang BJ et al (1999) 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 (2):424-428.
101. Jiang W et al (1999) p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* 18 (29):4247-53.
102. Jinno S et al (1994) Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *Embo J* 13 (7):1549-56.

103. Johnson RE WMHLP SPL (2000) Eukaryotic polymerase iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406:1015-1019.
104. Johnson DG and Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:295-312.
105. Johnson DH (1993) Adenine phosphoribosyltransferase genes in two *Drosophila* species: dosage compensation, a nuclear matrix attachment site, and a novel intron position. *Mol.Gen.Genet.* 238:383-389.
106. Johnson RE et al (1999) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* 285 (5425):263-5.
107. Johnson RE et al (2000) Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature* 406 (6799):1015-9.
108. Jonason AS et al (1996) Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24):14025-9.
109. Jones CJ and Wood RD (1993) Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* 32 (45):12096-104.
110. Kanda T et al (1994) Stimulation of polyomavirus DNA replication by wild-type p53 through the DNA-binding site. *Mol.Cell Biol.* 14 (4):2651-2663.
111. Kastan MB et al (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51 (23 Pt 1):6304-11.
112. Kelner A (1972) Remarks on some biological and evolutionary problems of photoreactivation and dark repair. *Res.Prog.Org.Biol.Med.Chem.* 3 Pt 1:421-432.
113. Kerr JF and Searle J (1972) A mode of cell loss in malignant neoplasms. *J Pathol* 106 (1):xi.
114. Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (4):239-57.
115. Kim HJ, Guo W, and Park NH (2000) HPV-16 E6 oncoprotein induces mutations via p53-dependent and -independent pathways. *Oncol Rep* 7 (4):707-12.
116. Kim KJ et al (2002) Modulation of base excision repair alters cellular sensitivity to UVA1 but not to UVB1. *Photochem Photobiol* 75 (5):507-12.
117. Kim PK et al (2003) Ultraviolet irradiation increases FADD protein in apoptotic human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 302 (2):290-295.
118. Kim ST et al (1996) Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyase. *Mutat Res* 363 (2):97-104.

119. Klotz LO, Briviba K, and Sies H (1997) Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 408 (3):289-91.
120. Knebel A et al (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* 15 (19):5314-5325.
121. Kotturi G et al (1998) Correlation of UV-induced mutational spectra and the in vitro damage distribution at the human hprt gene. *Mutat Res* 403 (1-2):237-248.
122. Krajewski S TSTSSMFWRJ (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. *Cancer Research* 53:4701-4714.
123. Kress M et al (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31 (2):472-83.
124. Kress S et al (1992) Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res* 52 (22):6400-3.
125. Kuerbitz SJ et al (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (16):7491-5.
126. Kuhne C and Banks L (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* 273 (51):34302-9.
127. Kulms D et al (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (14):7974-7979.
128. Kulms D et al (2002) DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 21 (38):5844-5851.
129. Kumar A et al (2002) Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22 (16):5801-12.
130. Kunz BA, Straffon AF, and Vonarx EJ (2000) DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis. *Mutat Res* 451 (1-2):169-185.
131. Kusumoto R MCSKISAMUAMTHF (2001) Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res* 485:219-227.
132. Kuzminov A (1999) Recombinational repair of DNA damage in Escherichia coli and bacteriophage lambda. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (4):751-813.
133. Lage H and Dietel M (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 125 (3-4):156-65.

134. Lai L and Tan TM (2002) Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)- mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem.J.* 361 (Pt 3):497-503.
135. Lakin ND and Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18 (53):7644-55.
136. Lawrence CW and Hinkle DC (1996) DNA polymerase zeta and the control of DNA damage induced mutagenesis in eukaryotes. *Cancer Surv* 28:21-31.
137. Le Page F et al (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 101 (2):159-71.
138. Lee SS, Weiss RS, and Javier RT (1997) Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (13):6670-5.
139. Leverkus M, Yaar M, and Gilchrist BA (1997) Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res.* 232 (2):255-262.
140. Levy DD MANCSM (1996) The influence of single base changes on UV mutational activity at two translocated hotspots. *J mol biol* 255:435-445.
141. Liang SH and Clarke MF (2001) Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 268 (10):2779-83.
142. Linzer DI and Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17 (1):43-52.
143. Linzer DI, Maltzman W, and Levine AJ (1979) The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* 98 (2):308-18.
144. Lippke JA GLBDHW (1981) Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: Detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78:3388-3392.
145. Little JB (1968) Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells. *Nature* 218 (146):1064-5.
146. Little JB (1969) Repair of sub-lethal and potentially lethal radiation damage in plateau phase cultures of human cells. *Nature* 224 (221):804-6.
147. Little JB et al (1995) Absence of radiation-induced G1 arrest in two closely related human lymphoblast cell lines that differ in p53 status. *J Biol Chem* 270 (19):11033-11036.

148. Lloyd RS (1998) Base excision repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res* 408 (3):159-70.
149. Loignon M and Drobetsky EA (2002) 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 (1):35-45.
150. Loignon M et al (1997) A p53-independent pathway for induction of p21^{waf1/cip1} and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res* 57 (16):3390-4.
151. Lopez-Ocejo O et al (2000) Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 19 (40):4611-20.
152. Maeda T et al (2003) UV Induces GADD45 in a p53-Dependent and -Independent Manner in Human Keratinocytes. *J Cutan Med Surg* 7 (2):119-123.
153. Maher VM et al (1979) DNA excision-repair processes in human cells can eliminate the cytotoxic and mutagenic consequences of ultraviolet irradiation. *Mutat Res* 62 (2):311-323.
154. Mailand N et al (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288 (5470):1425-9.
155. May P and May E (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18 (53):7621-36.
156. McKay BC and Ljungman M (1999) Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light. *Neoplasia* 1 (3):276-84.
157. McKay BC, Ljungman M, and Rainbow AJ (1999) Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 20 (8):1389-96.
158. McKay BC, Winrow C, and Rainbow AJ (1997) Capacity of UV-irradiated human fibroblasts to support adenovirus DNA synthesis correlates with transcription-coupled repair and is reduced in SV40-transformed cells and cells expressing mutant p53. *Photochem Photobiol* 66 (5):659-64.
159. Minshull J et al (1989) The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl* 12:77-97.
160. Mitchell DL JJCJ (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.* 20 (2):225-229.
161. Mitchell DL, Nguyen TD, and Cleaver JE (1990) Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J Biol Chem* 265 (10):5353-6.

162. Miyake H et al (1998) p53 modulation of Fas/Apo-1 mediated apoptosis in a human renal cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 12 (2):469-73.
163. Miyashita T et al (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 (6):1799-805.
164. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, and Lozano G (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378 (6553):203-6.
165. Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
166. Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Ann. Rev. Cell. Develop. Boil.* 13:261-291.
167. Moriya M and Grollman AP (1993) Mutations in the mutY gene of Escherichia coli enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet* 239 (1-2):72-6.
168. Mowat M et al (1985) Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* 314 (6012):633-6.
169. Mu D et al (1997) Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. *Mol Cell Biol* 17 (2):760-9.
170. Mueller PR and Wold B (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246 (4931):780-6.
171. Mullenders LH (1998) Transcription response and nucleotide excision repair. *Mutat Res* 409 (2):59-64.
172. Nakagawa S and Huibregtse JM (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 20 (21):8244-53.
173. Nakatsu Y et al (2000) XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 275 (45):34931-7.
174. Nehme A et al (1997) Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* 57 (15):3253-7.
175. Nicholson DW TN (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22 (8):299-306.
176. Nikolaishvili-Feinberg N and Cordeiro-Stone M (2000) Discrimination between translesion synthesis and template switching during bypass replication of thymine dimers in duplex DNA. *J Biol Chem* 275 (40):30943-50.

177. Nitta M et al (2000) A novel cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA. *Nucleic Acids Res* 28 (21):4212-8.
178. O'Driscoll M et al (1999) Combined mismatch and nucleotide excision repair defects in a human cell line: mismatch repair processes methylation but not UV- or ionizing radiation-induced DNA damage. *Carcinogenesis* 20 (5):799-804.
179. Oltvai ZN, Milliman CL, and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 (4):609-19.
180. Oren M (1985) The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta.* 823 (1):67-78.
181. Paggi MG (2001) Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother. *Cancer Research* 61:4651-4654.
182. Painter RB and Cleaver JE (1969) Repair replication, unscheduled DNA synthesis, and the repair of mammalian DNA. *Radiat Res* 37 (3):451-66.
183. Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1286-1290.
184. Park JS et al (2001) Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int J Cancer* 91 (6):822-7.
185. Patrick MH (1977) Studies on thymine-derived UV photoproducts in DNA--I. Formation and biological role of pyrimidine adducts in DNA. *Photochem Photobiol* 25 (4):357-72.
186. Patton JD et al (1984) Xeroderma pigmentosum fibroblasts including cells from XP variants are abnormally sensitive to the mutagenic and cytotoxic action of broad spectrum simulated sunlight. *Photochem Photobiol* 39 (1):37-42.
187. Pavletich NP (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators and cip and ink4 inhibitors. *J mol biol* 287:821-828.
188. Pehrson JR (1995) Probing the conformation of nucleosome linker DNA in situ with pyrimidine dimer formation. *J Biol Chem* 270 (38):22440-4.
189. Perdiz D et al (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* 275 (35):26732-42.
190. Petit C SA (1999) Nucleotide excision repair: from *E.coli* to man. *Biochimie* 81:15-25.
191. Pfeifer GP (1997) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol* 65 (2):270-83.

192. Pfeifer GP (2000) Involvement of DNA damage and repair in mutational spectra. *Mutat Res* 450 (1-2):1-3.
193. Pfeifer GP et al (1991) 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 (4):1374-8.
194. Pfeifer GP et al (1989) Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 246 (4931):810-3.
195. Potapova O et al (1997) 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 (22):14041-4.
196. Prakash S and Prakash L (2002) Translesion DNA synthesis in eukaryotes: a one- or two-polymerase affair. *Genes Dev.* 16 (15):1872-1883.
197. Price MA, Cruzalegui FH, and Treisman R (1996) The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* 15:6552-6563.
198. Proietti DS et al (2002) Transcription coupled repair efficiency determines the cell cycle progression and apoptosis after UV exposure in hamster cells. *DNA Repair (Amst)* 1 (3):209-223.
199. Radler-Pohl A et al (1993) UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase. *EMBO J.* 12:1005-1012.
200. Ramaswamy NT and Pelling JC (1999) Mutational status of the p53 gene modulates the basal level of jun N-terminal kinase and its inducibility by ultraviolet irradiation in A1-5 rat fibroblasts. *Mol Carcinog* 25 (4):262-72.
201. Regan JD, Setlow RB, and Ley RD (1971) Normal and defective repair of damaged DNA in human cells: a sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4):708-12.
202. Reich NC, Oren M, and Levine AJ (1983) Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* 3 (12):2143-50.
203. Rickert P SSFCHLE (1996) Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene* 12:2631-2640.
204. Rochette PJ et al (2002) 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 (37):5743-52.
205. Romig H et al (1994) Characterisation of two intronic nuclear-matrix-attachment regions in the human DNA topoisomerase I gene. *Eur.J.Biochem.* 221:411-419.

206. Rosenstein BS and Mitchell DL (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 45 (6):775-80.
207. Rotter V, Abutbul H, and Ben-Ze'ev A (1983) P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *Embo J* 2 (7):1041-7.
208. Roy R et al (1994) The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* 79 (6):1093-101.
209. Russo AA JPPN (1996) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature Structural biology* 3:696-700.
210. Sachsenmaier C et al (1994a) Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors. *Biochem Pharmacol* 47 (1):129-36.
211. Sachsenmaier C et al (1994b) Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell* 78 (6):963-72.
212. Sands AT et al (1995) p53 deficiency does not affect the accumulation of point mutations in a transgene target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (18):8517-21.
213. Scheffner M et al (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75 (3):495-505.
214. Scherer SJ et al (2000) p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV. *J Biol Chem* 275 (48):37469-73.
215. Scherer SJ et al (1996) Specific in vitro binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. *Biochem Biophys Res Commun* 221 (3):722-8.
216. Schreiber M et al (1995) Fos is an essential component of the mammalian UV response. *EMBO J.* 14:5338-5349.
217. Schwarz A et al (1995) Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J. Invest Dermatol.* 104 (6):922-927.
218. Seroz T et al (2000) Cloning of a human homolog of the yeast nucleotide excision repair gene MMS19 and interaction with transcription repair factor TFIIH via the XPB and XPD helicases. *Nucleic Acids Res* 28 (22):4506-13.
219. Setlow RB (1966) Cyclobutane-type pyrimidine dimers in polynucleotides. *Science* 153:379-386.
220. Setlow RB (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3363-3366.

221. Setlow RB (1965) Pyrimidine dimers in UV-irradiated poly dI:dC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53 (5):1111-1118.
222. Setlow JK (1966) Photoreactivation. *Radiat.Res. Suppl.*6 :141+
223. Setlow RB (2002) Shedding light on proteins, nucleic acids, cells, humans and fish. *Mutat Res* 511 (1):1-14.
224. Shaulsky G, Ben-Ze'ev A, and Rotter V (1990) Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5 (11):1707-11.
225. Shen Y and White E (2001) p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 82:55-84.
226. Sherr CJ (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and development* 13 :1501-1512.
227. Shieh SY et al (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91 (3):325-34.
228. Shiyanov P, Nag A, and Raychaudhuri P (1999) Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J Biol Chem* 274 (50):35309-12.
229. Simon MM et al (1994) UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts. *J Invest Dermatol* 102 (4):422-7.
230. Singhal RK, Hinkle DC, and Lawrence CW (1992) The REV3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is transcriptionally regulated more like a repair gene than one encoding a DNA polymerase. *Mol.Gen.Genet.* 236:17-24.
231. Slebos RJ, Resnick MA, and Taylor JA (1998) Inactivation of the p53 tumor suppressor gene via a novel Alu rearrangement . *Cancer Res* 58 (23):5333-6.
232. Smerdon MJ FL (1995) Repair of UV Damage in actively transcribed ribosomal genes. *Biochemistry* 34:13117-13124.
233. Smith ML and Fornace AJ, Jr. (1997) p53-mediated protective responses to UV irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (23):12255-7.
234. Soussi T and May P (1996) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* 260 (5):623-37.
235. Spruck CH3, Rideout WM3, and Jones PA (1993) DNA methylation and cancer. *EXS* 64:487-509.
236. Stary A SA (1996) The genetic basis of xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy syndromes. *Cancer surveys* 26: skin cancer:155-206.
237. Stege H et al (2000) Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97.(4):1790-1795.

238. Stommel JM et al (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* 18 (6):1660-72.
239. Strauss BS (2002) The "A" rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. *DNA Repair (Amst)* 1(2):125.-35.
240. Sugasawa K et al (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2 (2):223-32.
241. Suzuki I et al (1999) Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV control of pigmentation. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 4:29-34.
242. Svoboda DL, Briley LP, and Vos JM (1998) Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts. *Cancer Res* 58 (11):2445-8.
243. Svoboda DL and Vos JM (1995) Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (26):11975-9.
244. Swann PF et al (1996) Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 273 (5278):1109-11.
245. Therrien JP et al (1999) 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 (26):15038-43.
246. Therrien JP et al (2001) Ablation of p21waf1cip1 expression enhances the capacity of p53-deficient human tumor cells to repair UVB-induced DNA damage. *Cancer Res* 61 (9):3781-6.
247. Thomas M and Banks L (1998) Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17 (23):2943-54.
248. Thomas M et al (2001) HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene* 20 (39):5431-9.
249. Thompson DA et al (1997) The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene* 15:3025-3035.
250. Tissier A et al (2000) poliota, a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes Dev* 14 (13):1642-50.
251. Tobi SE et al (1999) Sequence-dependent mutations in a shuttle vector plasmid replicated in a mismatch repair deficient human cell line. *Carcinogenesis* 20 (7):1293-301.

252. Todo T et al (1996) Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272 (5258):109-12.
253. Tommasi S, Denissenko MF, and Pfeifer GP (1997) Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Res* 57 (21):4727-30.
254. Tornaletti S and Pfeifer GP (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science* 263 (5152):1436-8.
255. Tornaletti S and Pfeifer GP (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18 (3):221-8.
256. Tu Y, Bates S, and Pfeifer GP (1998) The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during the elongation stages of RNA polymerase II transcription. *Mutat Res* 400 (1-2):143-51.
257. Tu Y, Tornaletti S, and Pfeifer GP (1996) DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *Embo J* 15 (3):675-83.
258. van Kranen HJ et al (1997) Low incidence of p53 mutations in UVA (365-nm)-induced skin tumors in hairless mice. *Cancer Res* 57 (7):1238-40.
259. van Oosten M et al (2000) Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21):11268-73.
260. van Oosterwijk MF et al (1996) The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA-damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes. *Mol Cell Biol* 13:1975-1980.
261. van Oosterwijk MF et al (1996a) The sensitivity of human fibroblasts to N-acetoxy-2-acetylaminofluorene is determined by the extent of transcription-coupled repair, and/or their capability to counteract RNA synthesis inhibition. *Nucleic Acids Res* 24 (23):4653-9.
262. van Oosterwijk MF et al (1996b) The sensitivity of Cockayne's syndrome cells to DNA-damaging agents is not due to defective transcription-coupled repair of active genes. *Mol Cell Biol* 16 (8):4436-44.
263. Varghese AJ and Wang SY (1967) Ultraviolet irradiation of DNA in vitro and in vivo produces a 3d thymine-derived product. *Science* 156 (3777):955-7.
264. Voorhoeve PM et al (1999) Rapid dephosphorylation of p107 following UV irradiation. *Oncogene* 18 (3):679-88.
265. Wang XW et al (1995) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10 (2):188-95.

266. Wei D, Maher VM, and McCormick JJ (1995) Site-specific rates of excision repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene of human fibroblasts: correlation with mutation spectra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (6):2204-8.
267. Werness BA, Levine AJ, and Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248 (4951):76-9.
268. Wisdom R (1999) AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*. 253:180-185.
269. Wold MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61-92.
270. Wolf BB and Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274 (29):20049-52.
271. Wood RD et al (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291 (5507):1284-9.
272. Wu X et al (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7 (7A):1126-32.
273. Xia F et al (1995) Altered p53 status correlates with differences in sensitivity to radiation-induced mutation and apoptosis in two closely related human lymphoblast lines. *Cancer Res*. 55 (1):12-15.
274. Xiao W et al (1998) Identification, chromosomal mapping and tissue-specific expression of hREV3 encoding a putative human DNA polymerase zeta. *Carcinogenesis* 19 (5):945-9.
275. Yamagishi N et al (1997) Suppression of UV-induced mutations by wild-type p53 protein in human osteosarcoma cells. *Mutagenesis* 12 (3):191-4.
276. Yandell DW and Little JB (1986) Chromosome 14 marker appearance in a human B lymphoblastoid cell line of nonmalignant origin. *Cancer Genet Cytogenet* 20 (3-4):231-239.
277. Yoon JH et al (2000) The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J Mol Biol* 299 (3):681-93.
278. You YH, Szabo PE, and Pfeifer GP (2000) Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis* 21 (11):2113-7.
279. Yu Y, Li CY, and Little JB (1997) 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 (14):1661-1667.
280. Yuan F et al (2000) Specificity of DNA lesion bypass by the yeast DNA polymerase eta. *J Biol Chem* 275 (11):8233-9.

281. Zhen W et al (1995) The relative radiosensitivity of TK6 and WI-L2-NS lymphoblastoid cells derived from a common source is primarily determined by their p53 mutational status. *Mutat Res* 346 (2):85-92.
282. Zheng Y et al (2001) Cyclobutane pyrimidine dimers and bulky chemical DNA adducts are efficiently repaired in both strands of either a transcriptionally active or promoter-deleted APRT gene. *J Biol Chem* 276(20):16786-16796.
283. Zhuang L et al (1999) TNF receptor p55 plays a pivotal role in murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation. *J Immunol* 162 (3):1440-1447.
284. Ziegler A et al (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372 (6508):773-6.
285. Ziegler A et al (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (9):4216-20.

