

Université de Montréal

2m11.2852.6

**Le rôle des oncoprotéines E6 et E7 du virus du papillome humain de type 16 dans la  
carcinogénèse induite par les UVB**

**Par Caroline Baril**

**Programme de Biologie Moléculaire**

**Faculté des études supérieures**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M. Sc.)  
en biologie moléculaire**

**Avril 2001**

**© Caroline Baril, 2001**



QH

506

1154

2001

n. 005

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures**

**Ce mémoire intitulé:**

**Le rôle des oncoprotéines E6 et E7 du virus du papillome humain de type 16 dans la  
carcinogénèse induite par les UVB**

**Présenté par:**

**Caroline Baril**

**A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

<b>Pierre Belhumeur</b>	<b>Président-Rapporteur</b>
<b>Elliot Drobetsky</b>	<b>Directeur de recherche</b>
<b>Pierre Chartrand</b>	<b>Membre du jury</b>

**Mémoire accepté le 4 avril 2001**

## *Sommaire*

Des données récentes stipulent que 15 à 20% de tous les cancers peuvent être attribués aux infections par le virus du papillome humain (VPH) et on le soupçonne de plus en plus d'être impliqué dans le développement des cancers de peau de type non-mélanome (CPNM). Les oncoprotéines E6 et E7 de VPH16, augmente respectivement la dégradation protéosomale de p53 et de la protéine du rétinoblastome (pRb), ce qui crée un « knock-out » cellulaire fonctionnel de p53 et pRb. Plusieurs études ont démontré que les gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRb jouent un rôle important dans la réponse aux ultraviolets (UV). Les UV produisent, dans l'ADN, des lésions mutagéniques qui sont principalement de type dimères de pyrimidine et ces lésions sont réparées par excision de nucléotides (REN). Il existe 2 types de REN : le REN couplé à la transcription (TCREN), qui répare préférentiellement les régions transcrites de l'ADN et le REN global (GREN) qui répare l'ADN non transcrit. Le gène suppresseur de tumeur p53 joue un rôle important (bien que controversé) dans le REN, alors que pRb, ne semble pas avoir de rôle direct dans le REN. Notre hypothèse est que l'inactivation de p53 et pRb par E6 et E7 respectivement inhibe le REN, ce qui favorise la formation de mutations dans l'ADN et donc le développement des CPNM. Suite à une irradiation aux UVB ( $400\text{J.m}^{-2}$ ), la cinétique de réparation des dimères de pyrimidine a donc été évaluée à l'échelle nucléotidique à l'aide d'une méthode très sensible, la « Ligation-Mediated PCR » (LMPCR). Par cette approche, nous avons démontré que, comparativement aux fibroblastes contrôles, les fibroblastes exprimant E6 sont déficients pour les 2 types de REN, alors que ceux exprimant E7 ne sont déficients que pour le GREN. De plus, des fibroblastes de patients atteints du Syndrome de Li-Fraumeni (génétiquement compromis pour p53) sont déficients en TCREN et GREN (1). L'arrêt du cycle cellulaire en G1 permet à la cellule de vérifier et réparer son ADN avant la phase de réplication. Des études de cycle cellulaire ont permis de démontrer que les lignées E6, E7 et contrôle subissent un arrêt en G1 suite à une irradiation aux UVB et cet arrêt est plus prononcé dans les cellules produisant E6 : la déficience en REN ne peut donc pas être attribué à une inhibition de l'arrêt en G1. L'évaluation de la survie clonogénique a indiqué que les cellules E6 et E7 sont plus sensibles à forte dose d'UVB ( $400\text{J.m}^{-2}$  et +) et cette sensibilité ne s'explique pas

par une augmentation de la mort cellulaire (nécrose ou apoptose) par rapport au contrôle, mais probablement par un arrêt permanent de la croissance cellulaire qui est plus importante dans la lignée E6. Enfin, nous avons voulu déterminer si la déficience en REN corrèle avec une augmentation du nombre de mutations dans l'ADN. La fréquence de mutation au locus *hprt* suite à une irradiation aux UVB ( $400\text{J.m}^{-2}$ ) est plus grande dans lignée E7 puisqu'elle comporte 5 fois plus de mutants induits, alors que l'induction est seulement de 2 fois dans les lignées LXSJ et E6.

À la lumière des résultats obtenus, il est clair qu'en plus d'avoir un rôle dans le GREN, p53 est impliqué dans le TCREN suite à une irradiation aux UVB. De plus, la déficience en GREN dans la lignée E7 suggère un rôle pour pRb dans le REN. Cependant, la déficience en TCREN et GREN dans la lignée E6 ne résulte pas en une augmentation de la fréquence de mutations, alors que la lignée E7 (déficiente en GREN) est hypermutable. Il apparaît donc qu'une déficience en REN ne provoque pas nécessairement une augmentation de la fréquence de mutation et que d'autres mécanismes telle la synthèse translésionnelle fidèle ou non entrent aussi en ligne de compte. Le VPH étant un facteur de risque dans le développement de certains cancers de l'épithélium, nos résultats suggèrent que ce risque n'est pas seulement lié à une déficience en REN, lorsqu'il est associé à une exposition aux UV.

Mots clés : REN, p53, pRb, VPH, UVB

## *Table des matières*

Sommaire .....	III
Table des matières.....	V
Liste des figures .....	VIII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
Remerciements.....	XII
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Les mécanismes d'action des UV et la photocarcinogénèse de la peau.....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Les dommages causés par les UV.....	13
1.1.2 Les mécanismes de défenses.....	15
1.1.2.1 La stabilisation de p53 .....	15
1.1.2.2 L'arrêt du cycle cellulaire .....	16
1.1.2.2.1 L'arrêt en G1 qui est dépendant de p53.....	17
1.1.2.2.2 L'arrêt en G1 qui est indépendant de p53.....	17
1.1.2.3 Excision des nucléotides (REN) .....	19
1.1.2.3.1 Mécanismes .....	19
1.1.2.3.2 Le rôle p53 dans le REN.....	21
1.1.2.4 La mort cellulaire (apoptose ou nécrose).....	22
1.1.2.4.1 L'apoptose dépendante de p53 .....	25
1.1.2.4.2 L'apoptose indépendante de p53 .....	25
1.1.3 La mutagénèse.....	26
1.1.3.1 Les transitions C à T .....	26
1.1.3.2 Les mécanismes de formation des transitions C à T.....	26
1.1.3.3 Le gène suppresseur de tumeur p53 .....	28
<b>1.2 Le virus du papillome humain (VPH).....</b>	<b>29</b>
1.2.1 Épidémiologie.....	29
1.2.2 Les protéines E6 et E7 de VPH16.....	30
<b>1.3 Buts et objectifs de l'étude.....</b>	<b>33</b>

<b>2</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>34</b>
2.1	Lignées cellulaires et infection rétrovirale.....	34
2.2	Irradiations aux UV et aux radiations ionisantes .....	34
2.3	Analyse par immunobuvardage Western .....	35
2.4	Essai de survie clonogénique .....	35
2.5	Ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR).....	36
2.6	Essai de fragmentation de l'ADN.....	36
2.7	Mesure de l'apoptose par la méthode de l'annexin V.....	37
2.8	Analyse du cycle cellulaire .....	37
2.9	Fréquence de Mutation.....	38
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>39</b>
3.1	Les protéines E6 et E7 de VPH16 augmentent respectivement la dégradation de p53 et pRB.....	39
3.2	E6 inhibe le GREN et le TCREN, alors que E7 inhibe le GREN seulement 40	
3.3	Conséquences physiologiques de la déficience en REN.....	41
3.3.1	Les lignées E6 et E7 sont plus sensibles aux UVB.....	42
3.3.2	La lignée E6 est déficiente en apoptose .....	43
3.3.3	L'inhibition du point de contrôle en G1 du cycle cellulaire n'est pas la cause de l'accumulation de CPD dans les lignées E6 et E7.....	51
3.4	La lignée E7 accumule plus de mutations au locus <i>hprt</i> suite à une irradiation aux UVB.....	53
<b>4</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
4.1	Le TCNER varie en fonction du gène.....	57
4.2	Le biais expérimental imposé par la lignée E7 .....	59
4.3	E6 diminue l'apoptose induite par les UV .....	60
4.4	La lignée E7 est hypermutable aux UVB.....	61
4.4.1	La lignée E7 est déficiente en réparation des 6-4 PP ou des dommages oxydatifs?.....	61
4.4.2	Hprt versus c-jun et p53 .....	62

4.4.3	Le « bypass » des lésions est-il en cause?.....	62
4.4.4	Expériences futures .....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>67</b>
	<b>ANNEXE I : .....</b>	<b>93</b>
	<b>ANNEXE II : .....</b>	<b>95</b>



## *Liste des figures*

<b>Figure 1 : Spectre des UV.....</b>	<b>14</b>
<b>Figure 2 : Mécanismes de l'arrêt en G1 suite à une irradiation aux UV .....</b>	<b>18</b>
<b>Figure 3: Réparation par excision de nucléotides.....</b>	<b>23</b>
<b>Figure 4 : Les chemins biochimiques menant à l'apoptose induite par les UV....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 5 : Statut de p53 et pRb dans des fibroblastes humains de poumon produisant les oncoprotéines E6 et E7 de VPH16.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 6 : Survie clonogénique des fibroblastes humains en croissance exponentielle produisant les protéines E6 et E7 de VPH16 après une irradiation aux rayons UVC ou UVB. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figure 7 : Mesure de l'apoptose par la méthode de l' annexin V dans les fibroblastes produisant la protéine E6 ou E7 de VPH16 suite à une irradiation aux UVB.....</b>	<b>45</b>
<b>Figure 8 : Essai de fragmentation de l' ADN dans des fibroblastes humains produisant les protéines E6 et E7 de VPH16 après une irradiation aux UVB.....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 9 : Survie clonogénique des fibroblastes humains en croissance exponentielle produisant les protéines E6 et E7 de VPH16 après une irradiation aux radiations ionisantes. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 10 : Mesure de l'apoptose par la méthode de l' annexin V dans les fibroblastes produisant la protéine E6 ou E7 de VPH16 suite à une irradiation aux UVC, aux UVB et aux RI. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 11 : Détermination de la prolifération cellulaire après une irradiation aux UVB.....</b>	<b>52</b>
<b>Figure 12 : Fréquence de mutation des fibroblastes humains de poumon produisant les protéines E6 ou E7 de VPH16 après une irradiation aux UVB....</b>	<b>54</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 : Délais relatifs dans l'excision des nucléotides (REN) pour des fibroblastes de Li-Fraumeni et de poumon exprimant les oncoprotéines VPH16 E6 ou E7.....</b>	<b>42</b>
--	-----------

## *Liste des abréviations*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARN pol II** : ARN polymérase II

**BNT**: Brin non transcrit

**BrdU** : Bromodéoxyuridine

**BT**: Brin transcrit

**CCB**: Carcinome des cellules basales

**CCS**: Carcinome des cellules squameuses

**CHO** : cellules d'ovaires de hamster chinois

**CPD** : Dimère cyclobutylique de pyrimidine

**CPNM** : Cancer de peau de type non-mélanome

**CS** : Syndrome de Cokcayne

**DHFR** : Dihydrofolate réductase

**dNTP** : Déoxynucléotide triphosphate

**FITC** : Fluorescéine isothiocyanate

**FPH** : Fibroblastes de poumon humains

**Gal-7**: Galectine 7

**GREN** : REN global

**HAT** : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine

**Hprt** : Hypoxanthine phosphorybosyltransférase

**HT** : Hypoxanthine, Aminoptérine

**JNK**: c-jun n-terminal kinase

**KDC** : Kinases dépendantes des cyclines

**LMPCR** : Ligation-mediated PCR

**MNNG** : : N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine

**PCR** : Polymérase chain reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

**PI** : Iodure de propidium

**PKC** : Protein kinase C

**PRb** : Protéine du rétinoblastome

**PS** : Phosphatidylsérine

**6-4 PP** : 6-4 photoproduit

**Pol  $\eta$**  : Polymérase eta

**Pol  $\iota$**  : Polymérase iota

**Pol  $\zeta$**  : Polymérase zeta

**REN** : Réparation par excision de nucléotides

**RI** : Radiation ionisante

**RNR** : Ribonucléotide réductase

**SBF** : Sérum bovin fœtal

**TCREN** : REN couplé à la transcription

**TNF** : Tumor necrosis factor

**6-TG** : 6-thioguanine

**UV** : Ultraviolet

**VPH** : Virus du papillome humain

**XP** : Xeroderma Pigmentosum

## *Remerciements*

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Elliot Drobetsky, pour son soutien tout au long de ce travail.

Je voudrais aussi porter un attention particulière à des amis qui ont aussi été des personnes ressources autant au niveau théorique que technique : Martin Loignon, Anne-Christine Goulet, Caroline Léger et Marc-André Raymond.

J'aimerais remercier le Fond FCAR pour m'avoir offert un soutien financier tout au long de ma maîtrise.

# 1 Introduction

Étoile la plus proche de nous, le soleil se voit attribuer des vertus quasi-thérapeutiques. Par exemple, il a été démontré que certains cas de dépression étaient dus à un manque de rayons solaires. De plus, il semble que le moyen le plus facile et le plus naturel d'absorber la vitamine D demeure l'exposition au soleil, qui déclenche la fabrication de cette vitamine par la peau. Cependant de nos jours, les gens semblent se méfier davantage de cet astre et, plus particulièrement, des rayons ultraviolets (UV) qu'il dégage, puisqu'il a été démontré que ces derniers constituent un agent causal majeur dans le développement des cancers de la peau. Cette tendance s'est amplifiée lorsqu'en 1985, des scientifiques ont découvert des trous dans la couche d'ozone. Cette couche représente un filtre naturel qui retient la plus grande partie des rayons UV du soleil. L'amincissement de la couche d'ozone semble avoir provoqué tout un engouement pour la recherche sur les effets des rayons solaires, puisque près de 25 000 publications (comptabilisées par Pubmed) sur ce sujet ont vu le jour entre 1985 et 2000.

Les prochaines lignes tenteront d'expliquer le phénomène de carcinogénèse induite par les UV en débutant par l'absorption des photons de lumière par l'ADN jusqu'à la formation de mutations, en passant par les mécanismes de défenses tout en discutant du rôle du virus du papillome humain (VPH) dans le développement des cancers de peau de type non-mélanome (CPNM).

## 1.1 Les mécanismes d'action des UV et la photocarcinogénèse de la peau

### 1.1.1 Les dommages causés par les UV

Le rayonnement UV produit par le soleil se divise généralement en trois groupes : les rayons UVA, UVB et UVC. Les rayons UVC (125 à 290 nm) sont les plus

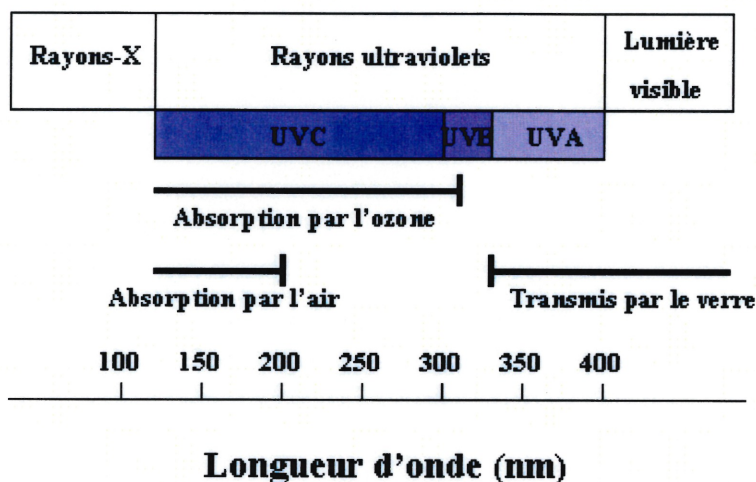


Figure 1 : Spectre des UV (adapté de Friedberg *et al.*, 1995).

généotoxiques, mais sont complètement absorbés par la couche d'ozone et, par conséquent n'atteignent pas la surface terrestre. Le rayonnement UVB (280-315 nm), qui constitue 10 % des rayons qui parviennent à la surface terrestre, sont directement absorbés par l'ADN. L'absorption de cette énergie par l'ADN cause l'excitation d'un électron, qui passera à un niveau plus élevé et instable d'énergie. Cet intermédiaire réactif pourra ensuite se dégrader ou réagir avec d'autres biomolécules environnantes. Les UVB, lorsqu'ils sont absorbés par l'ADN, causent la formation de liens covalents au niveau des bases azotées entre deux pyrimidines adjacentes. Les deux principaux dommages qui en résultent sont les dimères cyclobutyliques de pyrimidine (CPD) et les photoproduits 6-4 (6-4 PP) où il y a respectivement formation d'un lien entre les carbones 5 et 6 ainsi que 4 et 6 de deux pyrimidines adjacentes. Bien que moins fréquents, les rayons UVB peuvent aussi causer certains dommages oxydatifs tels que des bris de brins d'ADN, des thymines glycoles et les 8-oxoguanines. Les rayons UVA, qui constituent 90% des rayons UV qui atteignent la surface terrestre, sont en majeure partie absorbés par des chromophores autres que l'ADN. Cette énergie peut ensuite être transférée à l'ADN par des intermédiaires ou radicaux libres oxygénés générés par les chromophores. Les principaux dommages causés par les UVA sont les 8-oxoguanines, les thymines glycoles et les bris de brins d'ADN (3).

## 1.1.2 Les mécanismes de défenses

Étant donné que l'ADN est sujet à des attaques constantes par divers mutagènes, la cellule a dû se munir de mécanismes de défense afin de pouvoir maintenir l'intégrité de son génome. Les principaux mécanismes de défenses utilisés par la cellule pour faire face aux dommages induits par les UV sont :

1. L'arrêt du cycle cellulaire;
2. La réparation de l'ADN par excision des nucléotides (REN);
3. La mort cellulaire (apoptose ou nécrose).

Il semble que ces trois mécanismes puissent nécessiter la stabilisation préalable de p53, une protéine suppresseuse de tumeurs, pour leur exécution. Il existe toutefois des voies indépendantes de p53 qui peuvent mener à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose et il en sera aussi question dans les prochains paragraphes.

### 1.1.2.1 La stabilisation de p53

En conditions normales, le niveau basal de p53 est très bas du à sa dégradation protéasomale rapide via son association en N-terminal avec la protéine mdm2 (4). De plus l'activité transcriptionnelle de p53, entre autre celle qui est associée aux co-activateurs CBP et p300, est masquée par l'interaction de mdm2 avec son domaine de transactivation (5). Cependant, lors d'une irradiation aux UV, il y a stabilisation et activation de la protéine suppresseuse de tumeur p53 qui semble s'opérer principalement par des modifications post-traductionnelles telles la phosphorylation et l'acétylation, empêchant ainsi l'interaction avec mdm2 (voir figure 2). A ce jour, il existe plus d'une dizaine de sites connus pour des modifications post-traductionnelles dans p53, mais seulement la ser-20 semble être impliquée dans la stabilisation de la protéine suite aux UV. En effet, le remplacement de la ser-20 par une alanine ou un aspartate, abolit l'induction de p53 suite aux UV (6-8). Cette substitution a pour effet, d'empêcher la phosphorylation de p53 à cette position et d'augmenter sa dégradation via la liaison à mdm2 (9). Suite à une irradiation aux UV, la ser-20 serait phosphorylée par la kinase Chk1 (10) qui serait elle-même phosphorylée par ATR (ATM-Rad3-related) (11).



La stabilisation de p53 déclenche ensuite différentes cascades qui vont ultérieurement mener à l'arrêt du cycle cellulaire, le REN ou l'apoptose (voir sections suivantes). De plus, cette stabilisation a pour effet de transactiver mdm2, ce qui augmente la quantité de protéine mdm2 et donc la dégradation protéasomale de p53. Cette boucle de rétrocontrôle permet de ramener le taux basal de p53, un fois le stress cellulaire terminé (12, 13).

Bien que les résultats actuels tentent de démontrer que la phosphorylation de la ser-20 est celle requise pour la stabilisation de p53 suite aux UV, le mécanisme de stabilisation est probablement plus complexe et fait intervenir un mécanisme de phosphorylation-acétylation séquentielle. De plus, le mécanisme de défense à utiliser (arrêt du cycle cellulaire, REN ou mort cellulaire) pourrait être dicté par des modifications post-traductionnelles de p53. Par exemple, Bulavin *et al.* ont montré que suite à une irradiation aux UV, la kinase p38MAPK phosphoryle p53 sur les ser-33 et 46, ce qui favorise l'apoptose (14).

### **1.1.2.2 L'arrêt du cycle cellulaire**

En conditions normales, la cellule procède sans interruption à travers les différentes phases du cycle cellulaire. Cependant, lorsque celle-ci subit un stress et/ou que son ADN est endommagé, il y a arrêt de la prolifération cellulaire en G1, en S et/ou en G2 afin de permettre à la cellule de réparer son ADN. Les prochains paragraphes se veulent une explication du point de contrôle en G1 (Voir figure 3) et les étapes normales de la progression du cycle cellulaire ne seront pas discutées, mais pour une revue de la littérature, se référer à Shackelford *et al.*, 1999 (15).

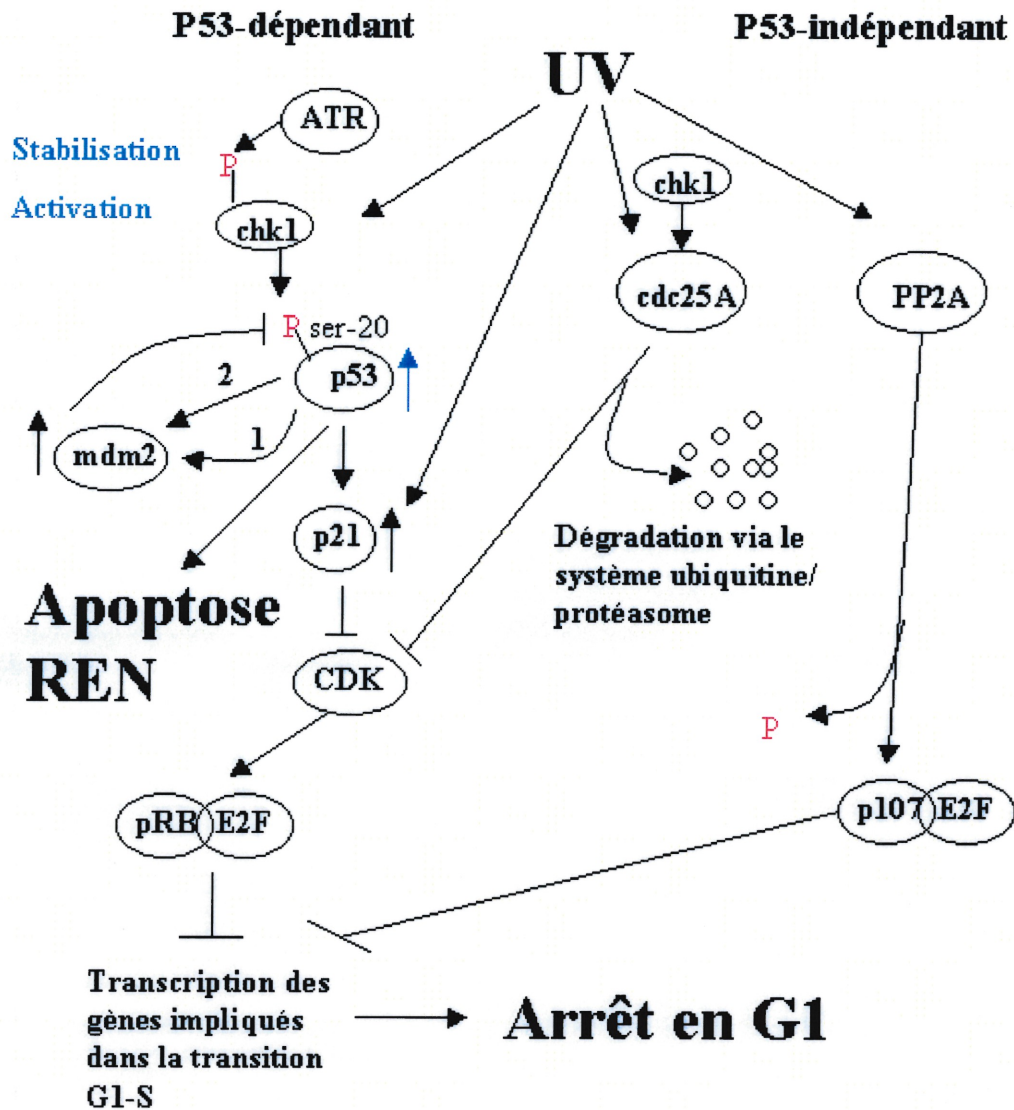
Le phénomène d'arrêt en G1 chez les cellules humaines a été démontré pour la première fois par le groupe de Little en 1968 en utilisant le mutagène modèle des rayons  $\gamma$  (16). Par la suite, il s'est avéré que plusieurs agents chimiques et physiques provoquaient cet arrêt, dont les UV (15, 17).

#### 1.1.2.2.1 L'arrêt en G1 qui est dépendant de p53

Une fois induit, p53 agit comme activateur de la transcription de p21 (18, 19), un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (KDC) (20). Les KDC sont responsables de la phosphorylation de pRb et de la libération subséquente des facteurs de transcription de la famille E2F (E2F1 à 4) (21). Le gène RB-1 code pour la protéine du rétinoblastome ou pRb qui est mutée dans les rétinoblastomes sporadiques, les carcinomes du sein et des petites cellules du poumon, les ostéosarcomes et les glioblastomes. La liaison E2F-pRb semble être impliquée dans la suppression des tumeurs, puisque tous les mutants tumoraux de pRb analysés à ce jour ont perdu la capacité à lier E2F (22). De plus, l'inactivation de E2F1 dans des souris pRB<sup>+/-</sup> diminue le risque de développement de tumeurs (23). Lorsque p21 est activé, il y a inhibition de l'activité kinase des KDC, pRb devient hypophosphorylé (24) et son affinité pour E2F augmente. En liant E2F, pRb réprime la transcription de gènes impliqués dans la transition G1-S. Bien que l'on pensait que la répression de la transcription était essentiellement due à la séquestration de E2F, on affirme maintenant que pRB a un rôle direct dans ce phénomène. En effet, en liant E2F, pRb est transporté jusqu'aux promoteurs des gènes transcrits par E2F et réprime la transcription en recrutant des histones déacétylases (25, 26). Ces enzymes favorisent la déacétylation des histones du promoteur et permettent la formation de nucléosomes, ce qui a pour effet d'inhiber la transcription. Le rôle de pRb dans l'arrêt en G1 est aussi illustré par l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris pRb<sup>-/-</sup> qui ne subissent plus de point de contrôle en G1 suite à une irradiation aux UV (27).

#### 1.1.2.2.2 L'arrêt en G1 qui est indépendant de p53

Plusieurs groupes de recherche ont démontré que p53 ne serait pas essentiel à l'arrêt en G1 suite à une irradiation aux UV (28-30). En effet, l'induction de p21 suite à une irradiation aux UV dans des lignées déficientes en p53 corrèle avec l'arrêt en G1 (31, 32). Aussi, une irradiation aux UV favoriserait la phosphorylation de la protéine cdc25A ainsi que sa dégradation via le système ubiquitine/protéasome entraînant ainsi l'inhibition du complexe cdk2/cyclineE dont l'activité est essentielle à la transition G1-S (33). Une autre voie possible d'arrêt en G1 serait assurée par p107, un des membres de la famille de pRB. Suite à une irradiation aux UVC, p107 serait



**Figure 2 : Mécanismes de l'arrêt en G1 suite à une irradiation aux UV.** 1, Relâchement de mdm2 et stabilisation de p53 et 2, trans-activation de mdm2 et retour au niveau basal de p53

déphosphorylée par une phosphatase de la famille PP2A et séquestrerait E2F, empêchant ainsi ce facteur de transcription de promouvoir la transcription des gènes impliqués dans la transition G1-S (34).

Le mécanisme d'arrêt en G1 lors d'une irradiation aux UV, qu'il soit dépendant ou non de p53, alloue du temps supplémentaire à la cellule pour vérifier l'intégrité de son ADN et par le fait même réparer les dommages qui y ont été créés.

### **1.1.2.3 Excision des nucléotides (REN)**

Le mécanisme d'excision des nucléotides est le système par excellence pour l'enlèvement des CPD et des 6-4 PP, dommages qui sont générés dans l'ADN par une exposition aux UV. Les 6-4 PP produisent une plus grande distorsion de l'ADN que les CPD et on pense que c'est pour cette raison qu'ils sont réparés de 5 à 10 fois plus rapidement que les CPD (35). Dans les cellules humaines, le REN est composé de deux sous-voies : la première voie est utilisée pour la réparation de la totalité du génome (GREN) et la deuxième voie est couplée à la transcription et, par conséquent, est utilisée pour la réparation du brin transcrit des gènes actifs (TCREN). Il a été démontré que le brin transcrit des gènes actifs est réparé beaucoup plus rapidement que les parties non-transcrites du génome (36).

#### **1.1.2.3.1 Mécanismes**

Le NER est un processus séquentiel qui implique plusieurs étapes : (i) la reconnaissance du dommage et l'incision du brin d'ADN, (ii) l'excision de l'oligonucléotide qui contient le dommage, (iii) la resynthèse du brin et ligation (voir figure 3). Le TCREN et le GREN diffèrent essentiellement par leur étape de reconnaissance des dommages. Une lésion qui survient dans une région non-transcrite de l'ADN est reconnue par le complexe protéique XPC-hHR23B qui lie le dommage et recrute les autres facteurs (37). Une autre protéine, XPE, pourrait être impliquée dans l'étape de reconnaissance du GREN. En effet, XPE (p48) aurait la possibilité d'accroître l'enlèvement des CPD dans l'ADN non-transcrit (38) et il a été démontré que les cellules XPE sont déficientes en GREN (39). De plus, XPE possède une affinité pour plusieurs types de dommages (40), affinité qui est plus grande pour les 6-4 PP que pour les CPD (41). Pour le TCREN, il semble que le blocage de l'ARN polymérase II (ARN pol II) par un dommage dans l'ADN constitue le principal signal qui recrute les facteurs CSA et CSB au site de la lésion. Ces facteurs sont essentiels puisque les cellules du groupe CS sont complètement déficientes en TCREN et, dans

ces cellules, le brin transcrit est réparé à la même vitesse que le brin non-transcrit (42). Deux hypothèses expliquent comment s'effectue la reconnaissance des dommages dans le TCREN : lorsque la transcription est bloquée par une lésion, (i) une fraction de la grande sous-unité de l'ARN Pol II est ubiquitinée et dégradée par le protéasome suite à une irradiation aux UV et ce mécanisme serait absent dans les cellules CSA et CSB (43, 44), (ii) l'ARN pol II reculerait de quelques nucléotides pour permettre le recrutement des facteurs essentiels au REN au site de la lésion (45).

Les étapes subséquentes sont identiques pour le GREN et le TCREN. Il y a recrutement des facteurs XPA, RPA et TFIIH au site de la lésion. Étant donné son affinité pour les dommages dans l'ADN (46) et sa capacité à interagir avec d'autres protéines du REN (RPA, TFIIH, XPF), XPA pourrait avoir le rôle de vérifier le dommage et d'orchestrer la machinerie de réparation autour de la lésion (47). TFIIH est un complexe protéique qui, à la base, est impliqué dans l'initiation de la transcription (48). Son rôle dans le REN (49) provient de l'activité hélicase conférée par les sous-unités XPB et XPD : XPB déroule l'ADN dans le sens 3'-5' alors que c'est l'inverse pour XPD (50). Il semble que le facteur RPA en liant l'ADN non-endommagé, aide au déroulement de l'ADN (51). De plus, RPA, en interagissant avec XPG et ERCC1-XPF, est crucial dans l'étape d'excision de l'oligonucléotide (52). XPG et ERCC1-XPF sont des endonucléases qui coupent en 3' (53) et 5' (54) respectivement du dommage. L'incision en 3' survient avant celle en 5' (55) et l'oligonucléotide libéré a une longueur qui varie entre 24 et 32 nucléotides (56). Ensuite, l'ADN polymérase  $\delta$  ou  $\epsilon$  et la ligase vont se charger de resynthétiser et lier l'ADN (57).

L'importance du REN se manifeste par différents syndromes, tels que *Xeroderma Pigmentosum* (XP) et le syndrome de Cockayne (CS) engendrés par un dysfonctionnement des protéines qui sont impliqués dans le REN. Des expériences de fusion cellulaire ont identifiés huit groupes de complémentation chez les patients XP (XPA à XPG et XPV) et deux chez les patients CS (CSA et CSB). Pour un patient XP, le risque de développer un cancer de peau est 1000 fois plus élevé que chez un patient normal (47, 58). Le syndrome de Cockayne se caractérise par une photosensibilité

cutanée accrue qui provient d'une déficience en TCREN. Cependant, ces patients ne sont pas prédisposés au développement d'un cancer de peau. Dans les deux cas, l'espérance de vie est diminuée (XP : 45 ans, CS : 12 ans) et certains patients manifestent des troubles neurologiques (47) .

### 1.1.2.3.2 Le rôle p53 dans le REN

Récemment plusieurs groupes de recherche ont démontré que p53 agissait au niveau du REN. En effet, il a successivement été démontré que des fibroblastes de patients atteints du Syndrome de Li-Fraumeni ou exprimant la protéine E6 (augmente la dégradation protéasomale de p53) ainsi qu'une lignée p53 -/- réexprimant p53 sous le contrôle de la tétracycline étaient déficients en GREN seulement (59-61). Les cellules d'épithéliums mammaires produisant E6 semblent aussi être déficientes seulement en GREN (62). De plus, des kératinocytes infectés par VPH16 sont déficients dans la réparation du brin transcrit et non transcrit de p53 après irradiation aux UV (63). Une autre étude, démontre que les fibroblastes de Li-Fraumeni sont déficients en GREN et en TCREN seulement aux sites réparés plus lentement (64). Bien que ces résultats prouvent l'implication de p53 dans le GREN la controverse règne encore quant à son implication dans le TCREN. Cette controverse semble être alimentée par l'utilisation de modèles cellulaires différents et de techniques de détection des dommages qui sont plus ou moins sensibles ainsi qu'à la détection des dommages à des endroits différents du génome (ex. : p53 versus DHFR).

L'implication de p53 au sein du REN semble provenir de son interaction avec divers partenaires protéiques et de son rôle comme facteur de transcription. En effet, p53 est impliqué dans l'augmentation de la transcription de p21 et GADD45 suite à la formation de dommages dans l'ADN (65). Ces deux protéines interagissent avec PCNA, un facteur essentiel au REN lors de la resynthèse du brin (66, 67). De plus, il a été récemment démontré que GADD45 pouvait moduler la structure de la chromatine en facilitant la relaxation de l'ADN par les topoisomérases (68). La protéine p48 (XPE), est aussi un gène qui est régulé à la hausse suite à une irradiation aux UV et cette hausse serait dépendante de p53 (39). P48 favorise l'enlèvement des dommages sur le brin non-transcrit et diminue la mutagenèse induite par les UV (38).

Récemment, il a été démontré que p53R2, une sous-unité de la ribonucléotide réductase (RNR), est induite de façon dépendante de p53 suite à une irradiation aux UV. La RNR catalyse l'étape limitant la production de déoxynucléotides triphosphates (dNTP) et p53R2 serait importante pour la production urgente de dNTP pour le processus de réparation puisque c'est la seule RNR à être transférée dans le noyau suite à un stress cellulaire (69, 70). Tel que mentionné plus haut, p53 interagit avec d'autres protéines impliquées dans le REN. Par exemple elle lie RPA (71, 72), une protéine essentielle tout au long du processus du REN. Il semble aussi que p53 inhibe l'activité hélicase de XPB et XPD (73, 74), deux protéines impliquées dans le déroulement de l'ADN au site de la lésion. Enfin, p53 interagit avec CSB, une protéine impliquée dans l'étape de reconnaissance du TCREN (74). Un modèle a récemment été proposé stipulant que lors d'un stress cellulaire, CSB, faisant partie du complexe de transcription, serait inhibé par p53. Le complexe de transcription étant bloqué au site de la lésion, il y aurait par la suite recrutement des autres protéines du REN (75).

#### **1.1.2.4 La mort cellulaire (apoptose ou nécrose)**

Il a été proposé que lorsque la cellule subit trop de dommages, cette dernière est simplement éliminée par un des deux processus suivants : l'apoptose ou la nécrose. Ces deux mécanismes sont d'une importance capitale puisque leur dysfonctionnement entraîne des pathologies telles les maladies cardiaques, le cancer, la maladie d'Alzheimer, les maladies inflammatoires, etc. Du point de vue de la morphologie cellulaire, l'apoptose et la nécrose ont des caractéristiques bien différentes. Par microscopie électronique, on peut généralement observer les phénomènes suivants chez une cellule en apoptose : la condensation de la chromatine près de l'enveloppe nucléaire, un rétrécissement de la cellule, la formation de circonvolutions de la membrane cytoplasmique et la formation de corps apoptotiques. *In vivo*, les macrophages phagocytent les corps apoptotiques, mais ne relâchent pas de substances inflammatoires. Certains changements biochimiques surviennent aussi lorsque la cellule meurt par apoptose, soit la translocation des phosphatidylsérines (PS) à la surface membranaire et la dégradation internucléosomale de l'ADN, produisant un

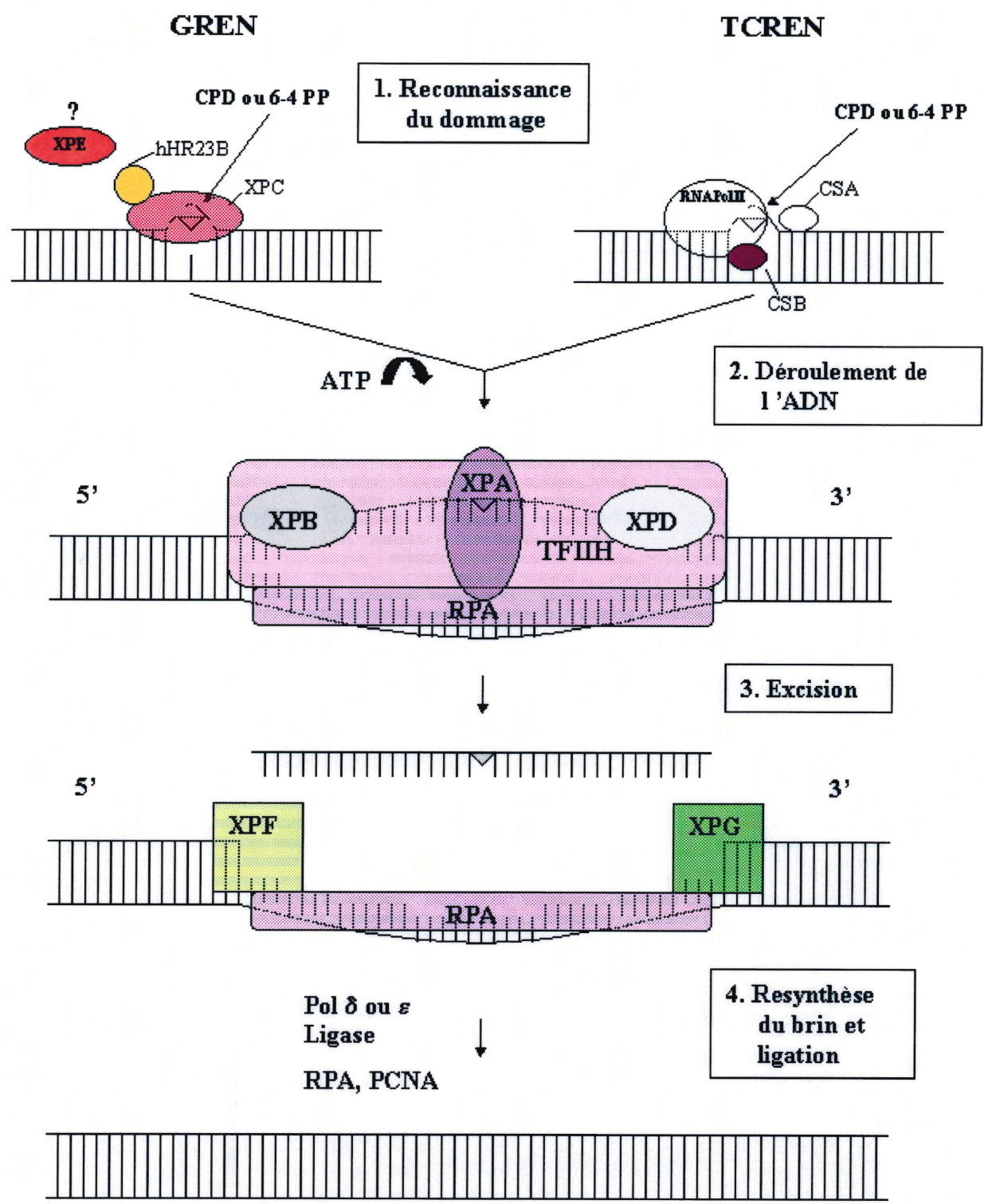


Figure 3: Réparation par excision des nucléotides



## Irradiation aux UV

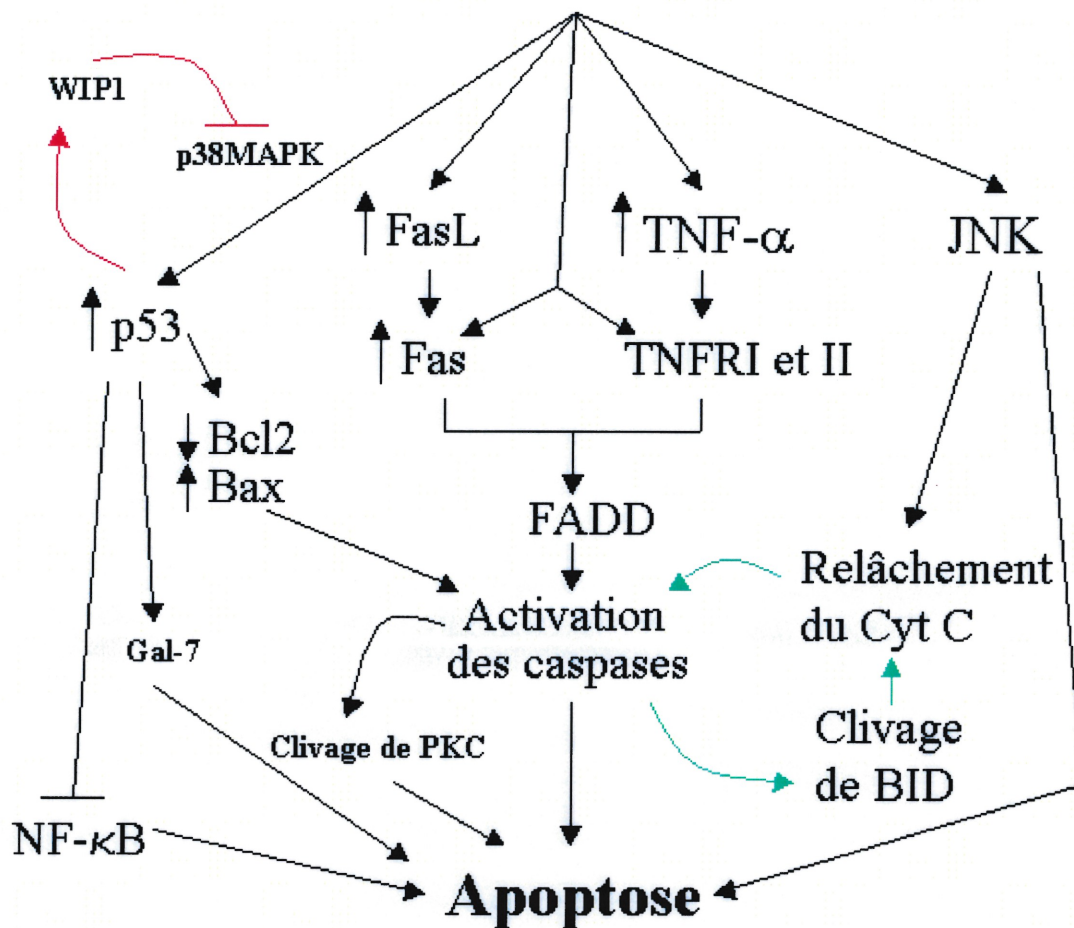


Figure 4 : Les chemins biochimiques menant à l'apoptose induite par les UV.

patron en échelle sur gel d'agarose. Lors du processus de nécrose, la cellule a une tendance à gonfler, l'intégrité de la membrane cytoplasmique est compromise (il y a perforation de la membrane) et il y a dégénérescence des organelles (76).

Plusieurs études ont démontré que les rayons UV sont capables d'induire une apoptose immédiate ( $\leq 4$  h) ou retardée ( $\geq 20$  h) (c a d qu'il doit y avoir synthèse d'ARNm et de protéines) (77). De plus, il semble que l'apoptose immédiate est induite par des dommages au niveau de la membrane, alors que l'apoptose retardée est

provoquée par des dommages à l'ADN. Il a donc été démontré que les UVB et les UVC induisent une apoptose retardée, alors que les UVA induisent les deux types de mort cellulaire (78) (79).

Certains groupes de recherche se sont concentrés sur la signalisation intracellulaire induite par les UV et menant à l'apoptose. Il semble qu'il y ait quatre voies connues par lesquelles les UV induisent l'apoptose : p53, JNK (c-jun n-terminal kinase), Fas et TNF (tumor necrosis factor) (voir figure 4).

#### **1.1.2.4.1 L'apoptose dépendante de p53**

Suite à une irradiation aux UV, p53 est induit et il semble que la kinase p38MAPK phosphoryle p53 sur les ser-33 et 46, ce qui favorise l'apoptose (14). Il y a ensuite une augmentation p53 –dépendante de WIP1 qui inactive p38MAPK par déphosphorylation : il y a formation d'une boucle de rétrocontrôle qui empêche l'apoptose lorsqu'il n'y a plus de stress cellulaire (80). La protéine p53 génère ensuite la réponse apoptotique (i) en diminuant le niveau de Bcl2 (antiapoptotique) et en augmentant le niveau de Bax (proapoptotique) (81) (ii) en trans-activant la galectine-7 (Gal-7), qui est une protéine spécifiquement exprimée dans l'épiderme et qui lie le  $\beta$ -galactoside (82) (iii) en diminuant l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B, un inhibiteur de l'apoptose (83; 84).

#### **1.1.2.4.2 L'apoptose indépendante de p53**

Les rayons UV peuvent aussi induire l'apoptose à partir de l'activation de certains récepteurs à la surface de la membrane cytoplasmique. Ainsi, il y a augmentation de la cytokine TNF- $\alpha$  suite à une irradiation aux UV (85) et cette dernière stimule les deux récepteurs au TNF (I et II) (86). Il y a aussi augmentation rapide des protéines Fas et FasL suite à une irradiation aux UV (87). Cependant, les rayons UV sont aussi capables d'induire l'apoptose sans l'intermédiaire des ligands TNF- $\alpha$  (88) et FasL (89). L'activation des récepteurs au TNF et Fas produit une oligomérisation de ces derniers et il y a ensuite recrutement de FADD, un adaptateur intracellulaire (88) (89). Il existe très peu de données quant à la suite des événements après l'irradiation aux UV, mais on sait cependant que la caspase 3 est activée et qu'il y a clivage du

substrat PARP (89-91). Certains auteurs suggèrent aussi que PKC (proteine kinase C) serait clivée par les caspases et que ce phénomène favoriserait l'apoptose induite par les UV (92, 93). Une étude récente a démontré que BID, un membre de la famille Bcl-2, serait clivé par la caspase 3 et favoriserait le relâchement du cytochrome C, constituant ainsi une boucle d'amplification de l'apoptose (94). Le relâchement du cytochrome C par la mitochondrie serait aussi dû à l'activation de la voie JNK (95), activation qui corrèle avec l'induction de l'apoptose (96-98).

### **1.1.3 La mutagénèse**

#### **1.1.3.1 Les transitions C à T**

Il arrive parfois qu'il y ait réplication d'ADN endommagé avant qu'il n'y ait eu réparation et, lorsqu'un tel phénomène se produit, la polymérase peut insérer un mauvais nucléotide en face de la base endommagée. Dans un tel cas, on dit qu'il y a fixation d'une mutation dans l'ADN. Étant donné que certains agents mutagènes causent plus d'un type de dommages et que la réplication de ces dommages produit souvent divers types de mutations, il est, dans la plupart des cas, impossible de retracer le mutagène responsable. Par contre, les mutations induites par les UV (UVB et UVC principalement) constituent une exception. Certains arrangements de bases, tels deux pyrimidines adjacentes, sont plus susceptibles d'être endommagées par les UV que d'autres combinaisons de bases. Les UV génèrent donc un patron de mutations plus homogène qui se retrouve dans la plupart des cancers de peau et se constitue en majorité de transitions C à T ou CC à TT aux sites dipyrimidiques (99), c'est-à-dire que le dCTP est remplacé par un dTTP lors de la réplication. Ce type de mutations constitue donc la signature moléculaire des UV.

#### **1.1.3.2 Les mécanismes de formation des transitions C à T**

Le blocage de la réplication de l'ADN par les photoproduits induits par les UV a été démontré dans plusieurs systèmes, dont les cellules humaines (100-104). Étant donné que des mutations causées par ces photoproduits sont retrouvées dans l'ADN des cellules, ces dernières doivent posséder des mécanismes qui permettent de poursuivre l'élongation au-delà de la lésion. Dans les années 80, il a été établi que la polymérase

insert préférentiellement un A lorsqu'elle rencontre un site abasique (lésion non-codante) (105). Cette découverte, que l'on nomma « la règle du A » a ensuite permis d'expliquer la formation des transitions C à T ou CC à TT suite à une irradiation aux UV. En effet, la polymérase devait insérer un A vis à vis des cytosines impliquées dans la formation des dimères de pyrimidine, supposant ainsi que ce type de lésion est non-codante. Certains groupes ont par la suite démontré que les cytosines des CPD subissent une déamination pour former de l'uracile et, par conséquent, la polymérase incorpore donc un A vis-à-vis l'uracile (106-110).

Dans la dernière année, une nouvelle famille de polymérases a été identifiée dont la plupart des membres ont la capacité d'effectuer la synthèse translésionnelle (STL), c'est à dire de répliquer l'ADN endommagé avec une fidélité très basse (pour une revue de la littérature voir (111)). Les polymérases  $\iota$  (pol  $\iota$ ) et  $\zeta$  (pol  $\zeta$  ou les 3 sous-unités Rev1, Rev3 et Rev7) font partie de cette famille et semblent fonctionner en synergie pour effectuer, entre autre, le contournement des lésions induites par les UV. En effet, il apparaît que lors de la réplication, pol  $\iota$  incorpore des nucléotides vis-à-vis un 6-4 PP au site T-T, mais est incapable de continuer l'élongation passé le dommage. En contrepartie, pol  $\zeta$  est très peu efficace quant à l'incorporation de nucléotides vis à vis la lésions, mais est capable de continuer l'élongation, lorsque ces nucléotides ont été insérés par pol  $\iota$ . Bien que pol  $\iota$  insert préférentiellement dans l'ordre un A, un G, un T et un C en face du 3'T du 6-4 PP, l'efficacité de pol  $\zeta$  à continuer l'élongation est plus grande lorsqu'il y a un mésappariement de base, favorisant ainsi la formation de mutations (112). Cette étude montre que pol  $\iota$  incorpore des nucléotides seulement vis à vis un 6-4 PP et non un CPD alors que l'équipe de Tissier *et al.*, stipule que pol  $\iota$  contourne les 2 types de lésions (113). Le rôle de pol  $\zeta$  dans la STL des photoproduits est exemplifié par le fait que lorsque l'on exprime un ARN antisens à Rev1 et Rev3 dans des cellules humaines, on observe un diminution drastique de la fréquence de mutation au locus *hprt* induite par les UV (114, 115).

### 1.1.3.3 Le gène suppresseur de tumeur p53

On sait maintenant que le développement d'une bonne partie des cancers provient de la formation de mutations au sein d'un ou plusieurs gènes de la cellule. Ces mutations peuvent être héritées des parents (germinales) et donc présentes dans toutes les cellules du corps humain ou elles peuvent survenir spontanément ou de façon induite dans une ou plusieurs cellules de l'organisme. On parle de mutations induites puisque des facteurs environnementaux semblent jouer un rôle primordial dans l'étiologie de certains cancers. Par exemple, la fumée de cigarette, l'aflatoxine B 1 (mycotoxine contaminant les arachides), le radon, les UV, etc., sont des agents carcinogènes bien connus (116). Tel que mentionné précédemment, le rayonnement UV constitue un mutagène modèle puisqu'il produit une signature particulière dans l'ADN, soit des transitions C à T ou CC à TT. Par conséquent, il est plus facile d'identifier les gènes les plus fréquemment mutés par les UV, puisqu'ils peuvent être porteurs de cette signature.

La protéine p53 agit comme suppresseur de tumeurs, puisque son inactivation par une mutation contribue au développement de tumeurs : 50% de tous les cancers possèdent une mutation dans p53. Au début des années 90, certains groupes ont découvert que p53 était muté dans jusqu'à 90% des carcinomes de cellules squameuses et basales de la peau (CCS et CCB) et que les mutations sont principalement de type C à T ou CC à TT (117-121). Ils ont par la suite démontré que la mutation de p53 était un événement précoce dans le processus de carcinogénèse, puisque p53 est muté à un même taux dans les kératoses actiniques, le précurseur des CCS (122). Pour appuyer ce résultat, Jonason *et al* ont remarqué que 4% de l'épiderme normal contient une forme mutante de p53 (120). C'est dans ces conditions que l'on définit p53 comme un gène impliqué dans l'initiation de la photocarcinogénèse. L'inactivation hâtive de p53 a des conséquences néfastes sur les différents mécanismes de défense suite à une irradiation subséquente aux UV puisque l'apparition de cellules apoptotiques dans l'épiderme de souris p53 *-/-* diminue significativement (122, 123). De plus, une étude récente a démontré qu'une exposition chronique des souris *Hairless* aux UV produit une perte de l'expression de FasL, ce qui corrèle avec la diminution du nombre de cellules en apoptose, l'apparition de mutation dans p53 et l'apparition de tumeurs de la peau (87).

On pense donc que, lors d'exposition chronique au soleil, la mutagenèse de p53 et la perte d'expression de FasL favorisent l'expansion clonale des cellules dans lesquelles p53 est muté au détriment des cellules saines ainsi que la formation de mutations dans d'autres gènes, ce qui explique le rôle de p53 dans la promotion de la tumorigénèse.

D'autres gènes comme Patched (124, 125), p16INK4 (126) et Ras (127, 128) sont aussi connus pour posséder la signature moléculaire des UV et être impliqués dans le développement des cancers de peau.

## **1.2 Le virus du papillome humain (VPH)**

### **1.2.1 Épidémiologie**

Les virus du papillome humain de type 16 et 18 ont récemment été déclarés comme étant des carcinogènes humains par l' Agence International pour la Recherche sur le Cancer (129). En fait, des données récentes stipulent que 15 à 20% de tous les cancers peuvent être attribués aux infections par VPH (130) . Dans le passé, il s'est avéré difficile de détecter la présence de ce virus dans les tumeurs, mais avec l'avènement de la technique polymérisation en chaîne (PCR), on a pu constater que près de 100% des tumeurs cervicales contiennent de l' ADN de VPH (131). Maintenant, on soupçonne de plus en plus les VPH d'être impliqués dans le développement des cancers de peau de type non-mélanome (132).

Plusieurs modèles ont été élaborés concernant le développement des cancers de peau associés à VPH. Tout d'abord, une maladie héréditaire très rare, l'épidermodysplasie verruciforme, semble être causée par une infection à VPH. Cette maladie se caractérise par la formation de verrues en bas âge et, par la suite, par l'apparition de CCS aux endroits exposés au soleil chez 30% à 60% des patients atteints. Il a été démontré que 90% des CCS chez ces patients sont positifs pour VPH (132). La déficience des mécanismes biologiques qui est à la base de ce désordre est peu connue, mais certaines études proposent qu'une déficience du système immunitaire soit en cause (133).

Les individus qui sont immunosupprimés ont un risque qui est de 50 à 100 fois plus élevé de développer un cancer de peau de type CCS (134). Ces individus se situent principalement dans trois groupes : les patients transplantés, les patients traités au UVA et ceux atteints du SIDA. En utilisant des amorces dégénérées pour effectuer un PCR niché, un groupe a démontré que chez des patients transplantés, 83% des CCS, 65% des CCB et 95% des lésions précancéreuses sont positifs pour VPH (132). Le psoriasis est une maladie de la peau qui peut être traitée par des irradiations aux UVA. Initialement, on pensait que les UVA produisaient leurs effets bénéfiques en causant des dommages à l'ADN et en inhibant la prolifération cellulaire. On sait maintenant que c'est en exerçant une immunosuppression locale, que les UV soulagent les patients atteints de psoriasis (135). Cependant, ce traitement photo-thérapeutique est aussi associé au développement des CPNM chez les patients atteints de psoriasis (136). Dans une étude récente, 75% des tumeurs de peau chez des patients traités avec de fortes doses d'UVA sont positives pour VPH (137). Enfin, le virus du SIDA se caractérise par une dégradation du système immunitaire et des lésions cutanées sont présentes chez 5% à 30% des patients. Une seule étude a démontré, en utilisant la méthode des dot-blots, que 2 CCS sur 10 sont positives pour VPH (138).

Des études ont aussi démontré que VPH est associé aux CPNM dans la population en général. Récemment, on a trouvé que près de 45% des 69 biopsies de CCB étaient positives pour VPH (139). De plus, près de 95% des tumeurs de patients immunocompétents étudiées par Harwood et al. étaient VPH-positives. Un autre groupe a montré que 6/22 (27.2%) CCS, 11/30 (36.7%) CCB et 6/11 (54.4%) des lésions précancéreuses étudiées possèdent le génome de VPH (140). Ces résultats montrent de façon convaincante que VPH est associé au développement du CPNM non seulement chez des patients immunosupprimés, mais aussi dans la population en général. De plus, on peut penser que l'amélioration des techniques de dépistage de VPH montrera une corrélation encore plus grande entre ce virus et les CPNM.

### **1.2.2 Les protéines E6 et E7 de VPH16**

La protéine E6 de VPH est constituée de 150 acides aminés et a une masse moléculaire de 18 kDa. Au début des années 90, on a fait la découverte que E6 liait la

protéine p53 et que cette association favorisait la dégradation de p53 via le système ubiquitine/protéasome (141, 142). Par la suite, la perte de p53 dans les cellules exprimant E6 a été reliée à plusieurs phénomènes biologiques tels, une augmentation de la fréquence de mutation (143, 144), une mauvaise régulation des points de restriction du cycle cellulaire (145-149) une augmentation de la recombinaison homologue (150) et une inhibition de la réparation de l'ADN (1, 61, 62), le tout entraînant vraisemblablement l'instabilité génomique.

Cependant, ces résultats peuvent être biaisés dû au fait que E6 interagit avec beaucoup d'autres protéines au sein de la cellule. Par exemple, on a rapporté que des cellules produisant la protéine E6 sont résistantes à l'apoptose (151-154) dû à la dégradation protéasomale de la protéine proapoptotique Bak (155, 156) ou à l'inhibition de la voie apoptotique du TNF (157). On a aussi rapporté l'interaction de E6 avec trois protéines contenant des motifs PDZ, soit hDLG (158), E6TP1 (159) et MAGI-1 (160). En général, ce motif est impliqué dans les interactions entre les protéines membranaires et/ou du cytosquelette afin de les recruter à des endroits précis de la membrane cytoplasmique et d'initier plusieurs cascades de signaux de transduction (161). Étant donné que la liaison de E6 à ces trois protéines favorise leur dégradation, on peut penser que cela pourra interférer avec certaines voies de signalisation et par le fait même promouvoir la tumorigénèse. La protéine E6 induit aussi la dégradation protéasomale de c-myc (162). L'inhibition de cet oncogène cellulaire semble favoriser la différenciation, processus essentiel à la réplication virale de VPH (163). On a rapporté l'interaction de E6 avec la protéine qui lie le calcium E6BP (164) et avec la protéine d'adhésion focale paxilline (165), cependant la nature de ces interactions demeurent inconnues. Enfin, plusieurs études ont démontré que l'expression de E6, conjointement avec E7, était suffisante pour l'immortalisation des cellules (166-168) (169). L'immortalisation des cellules pourrait en partie être due à la réactivation de la télomérase par E6 (170, 171).

Pour ce qui est de la protéine E7, son rôle principal est la dérégulation de la prolifération cellulaire à trois niveaux : le cycle cellulaire, la transcription et le métabolisme des hydrates de carbone. La fonction la mieux connue de E7 est sa



liaison à pRb, ce qui provoque la dégradation de pRb via le système ubiquitine/protéasome (172), ce qui pourrait s'effectuer par l'interaction de E7 avec la sous-unité S4 du protéasome (173). La dégradation de pRb libérerait les facteurs de transcription de la famille E2F (174), ces derniers étant impliqués dans la transcription de gènes importants pour la transition G1-S. E7 lie les autres membres de la famille de pRb, soit p107 et p130, sans toutefois affecter leur stabilité (175). Une autre fonction de E7 est l'inactivation fonctionnelle de deux inhibiteurs de KDC : p21 (176) et p27 (177). Mis à part E2F, d'autres facteurs de transcription sont modulés par E7. Par exemple, le contrôle des facteurs de transcription de la famille AP-1 par E7 (178) est important pour l'expression des gènes viraux, puisqu'il a été démontré que ces facteurs contrôlent l'expression des gènes hâtifs de VPH (179). E7 interagit aussi avec la protéine qui lie la boîte TATA (TBP), un autre facteur de transcription (180, 181). On pense qu' E7 aurait une influence sur la transcription par son action sur la structure de la chromatine en interagissant avec l'actine (182), en étant associée à la matrice nucléaire (183) et en liant une histone déacétylase Mi2beta (184). De plus, la protéine E7 agit aussi sur le métabolisme des sucres en liant la kinase M2 pyruvate (185), ce qui provoque une augmentation des phosphométabolites. Étant donné que le niveau de ces métabolites est plutôt bas dans les cellules au repos (186), une augmentation pourrait favoriser la prolifération cellulaire. Le rôle de E7 dans l'apoptose reste nébuleux. Bien que certaines études montrent que l'expression de E7 favorise l'apoptose (187-190), les mécanismes sous-jacents à cette induction ne sont pas connus. Une étude rapporte que la déstabilisation de pRb et l'induction de p53 serait à la base de l'apoptose induite par E7 (191). Enfin, E7 favoriserait l'évasion du système immunitaire et la formation de tumeur en inactivant fonctionnellement IRF-1 (192) (193) et p48 (194), deux effecteurs de la voie de signalisation de l'interféron.

Bien que l'on connaisse beaucoup plus les cibles de E6 et E7, certaines études suggèrent que ces oncogènes sont eux-mêmes régulés par la machinerie cellulaire de l'hôte. Par exemple, E7 est phosphorylée par la kinase caséine II lors du passage en phase S (195), alors qu' E6 est phosphorylée par PKN (196).

## 1.3 Buts et objectifs de l'étude

Étant donné le rôle grandissant de VPH dans le développement des cancers de peau de type non-mélanome, nous voulions comprendre les mécanismes moléculaires qui sont affectés lors de l'introduction de deux protéines virales de VPH16, soit E6 et E7, dans des fibroblastes primaires. Les expériences proposées amélioreront les connaissances sur la contribution de ces protéines virales dans la formation des cancers de peau de type non-mélanome. De plus, nous voulions préciser le rôle de p53 et pRB dans la protection contre la photocarcinogénèse induite par les UV, étant donné que E6 et E7 augmentent respectivement la dégradation de ces deux protéines. Nous avons donc :

- A) Évalué le taux de réparation de l'ADN suite à une irradiation aux UVB dans des lignées isogéniques exprimant les protéines E6 et E7 de VPH16 et dans des fibroblastes de Li-Fraumeni (génétiquement déficient en p53) par la méthode de LMPCR;
- B) Évalué la survie clonogénique, le taux d'apoptose et de nécrose et la progression du cycle cellulaire des lignées E6 et E7 suite à une irradiation aux UVB;
- C) Évalué la fréquence de mutation au locus *hprt* des lignées E6 et E7 suite à une irradiation aux UVB;

## 2 Matériels et Méthodes

### 2.1 Lignées cellulaires et infection rétrovirale

Les fibroblastes humains normaux et la lignée immortalisée LF041 (obtenue du Dr M. Tainsky, Houston, TX) ont été cultivés dans du milieu DMEM avec 10% de sérum bovin fœtal (SBF) et des antibiotiques. Les cellules LF041 ont perdu un allèle de p53 et possède une mutation au codon 184 qui change le cadre de lecture. Les fibroblastes primaires humains de poumons (FPH) LF-1 (don du Dr J. Sedivy, Providence, RI) et leurs dérivés ont été cultivés dans du milieu Ham 's F10 avec 15% de SBF et des antibiotiques. Le vecteur rétroviral et la construction du plasmide LXSN ont été décrits antérieurement (197). La lignée PA317 qui génère les virus défectifs codant pour VPH16 E6 et -16 E7 ont été obtenues de ATCC. Pour l'infection des fibroblastes LF-1, 1 ml de surnageant amphotropique viral a été combiné à 3 ml de milieu régulier (Ham 's F10, 15% SBF et antibiotiques) contenant 4 µg/ml de polybrène. Les LF-1 ont été incubés à 37°C dans ce milieu viral pour une période de 2 h. Par la suite, le milieu viral a été remplacé par du milieu régulier (10 ml) contenant 4µg/ml de polybrène et les cellules ont été incubées 5 h à 37°C. Les LF-1 infectés ont ensuite été incubés 2 jours à 37°C dans du milieu régulier et subséquemment ensemencés dans le milieu de sélection contenant 200 µg/ml de G418. La sélection est maintenue pour un minimum de 7 jours.

### 2.2 Irradiations aux UV et aux radiations ionisantes

Pour les études de LMPCR, les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence et irradiées dans 0.9% NaCl, alors que pour toutes les autres expériences, les cellules ont été maintenues en croissance exponentielle et irradiées dans du PBS Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup> 1X. Les ampoules produisant les UVB ( FS20T12/UVB/BP, Phillips) ont été utilisée à une intensité de 3,5 J.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et le rayonnement a été filtré à travers une feuille d'acétate de cellulose (Kodacel TA-407, clear 0.015 pouce; Eastman Kodak). Les radiations ionisantes proviennent d'une source de <sup>137</sup>césium dont l'intensité est de 7.6 Gy/min.

## 2.3 Analyse par immunobuvardage Western

Afin de confirmer l'expression des oncoprotéines VPH16E6 ou E7 dans les fibroblastes humains, nous avons effectué une analyse de p53 et pRb par immunobuvardage Western. Après une irradiation à  $400 \text{ J.m}^{-2}$  UVB et aux temps appropriés, les cellules ont été lysées en utilisant le tampon RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, and 1% sodium deoxycholate) contenant 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptine, 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinine, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride et 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , suivi par une sonication et une centrifugation. Après migration de quantités égales de protéines totales sur un gel SDS-PAGE, les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps monoclonal primaire (p53: DO-1 Santa Cruz Biotechnology, pRb: Ab-5 Calbiochem) toute la nuit et avec l'anticorps secondaire pour une période de 2 h (Anti-mouse Ig-Horseradish peroxidase: Amersham Life Science) à  $4^\circ\text{C}$  avec agitation. Enfin, les membranes ont été révélées en utilisant un réactif chémiluminescent (NEN<sup>TM</sup> Life Science).

## 2.4 Essai de survie clonogénique

Les fibroblastes de poumon (LF-LXSN, LF-E6, LF-E7) ont étéensemencés pour obtenir 50-70% de confluence le jour de l'irradiation. Les fibroblastes en phase exponentielle de croissance ont été irradiés dans 2 ml de PBS  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  par une source de UVB pour des doses se situant entre 0 et  $500 \text{ J.m}^{-2}$  ou par une source de radiations ionisantes pour des doses variant entre 0 et 500 Rads. Les fibroblastes ont ensuite été trypsinisés, comptés par un compteur automatique et réensemencés à faible densité pour obtenir un nombre significatif de colonies. Après 14 jours d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ , les colonies ont été colorées avec une solution 0.5% méthylène bleu/50% méthanol et comptées. La survie relative a été calculée en comparaison avec les cellules non-traitées.

## 2.5 Ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR)

Les études de LMPCR ont été entièrement effectuées à Québec dans le laboratoire du Dr R. Drouin sous la supervision du Dr J.-P. Therrien. Le protocole de LMPCR a été décrit en détail antérieurement (198). Brièvement, après irradiation et incubation des cellules, l'ADN génomique a été extrait et digéré par l'endonucléase T4 afin d'inciser l'ADN à chaque CPD. La thymidine en 5' qui est protubérante est enlevée par photoréactivation en utilisant la photolyase de *E. coli* afin de créer des bouts cohésifs. Une extension à l'aide de la Sequanase de tous les produits clivés est effectuée en utilisant une amorce spécifique au gène. Un « linker » asymétrique d'ADN double brin est ensuite lié en 5' afin de créer une séquence commune sur tous les fragments. Une amorce complémentaire à l'oligonucléotide le plus long du « linker » et une autre qui est spécifique au gène sont utilisées pour amplifier les fragments par PCR. Le produit de ce PCR est ensuite soumis à une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 8% en même temps qu'une réaction de séquence de Maxam et Gilbert, transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde radioactive (<sup>32</sup>p) qui est spécifique au gène. Le résultat est visualisé par autoradiographie et analysé en utilisant un phosphorimager Fuji BAS 1000. Chaque bande représente la position d'un nucléotide où une incision a été induite par le clivage d'un CPD et l'intensité de la bande représente le nombre de molécules d'ADN avec un bout 5' liable qui se termine à cette position. Le taux de réparation a été étudié au niveau du (i) Brin transcrit (BT) du gène p53 (exon 7 ; nucléotides 14030-14080) (ii) BT du gène c-jun (exon 1 ; nucléotides +30 à +117) (iii) BT du gène c-jun (nucléotides -40 à -10 et/ou (iv) Brin non transcrit (BNT) du gène p53 ( exon 5 et 8 ; nucléotides 13095-13166 et 14510-14575, respectivement). Les amorces utilisées ont été décrites précédemment (199, 200) .

## 2.6 Essai de fragmentation de l'ADN

Les cellules ont été irradiées par 400 J.m<sup>-2</sup> UVB et aux temps appropriés, l'ADN a été extrait de 1x10<sup>6</sup> cellules par la méthode phénol/chloroforme/isoamyle alcool. Après électrophorèse sur gel d'agarose (1.8%) et coloration au bromure d'éthidium, le patron

de fragmentation en échelle a pu être évalué. Brièvement, les cellules (attachées et flottantes) ont été incubées dans un tampon de lyse (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM EDTA, pH 8, 0.5% SDS, 0.1 mg/ml protéinase K) à 37°C toute la nuit ou 1 h à 56°C. L'ADN génomique a ensuite été extrait 3 fois en utilisant un volume égal de solution phénol/chloroforme/isoamyle alcool 25:24:1 et resuspendu dans de l'eau stérile. Avant de charger le gel, l'ARN a été digéré 1 h à 37°C avec 4 µg/ml de RNase A. Les cellules U937 traitées pendant une période de 4 h avec 4 µg/ml de camptothécine ont été utilisées comme contrôle positif.

## **2.7 Mesure de l'apoptose par la méthode de l'annexin V**

Les cellules ont été irradiées par 300 ou 400 J.m<sup>-2</sup> UVB et aux temps appropriés, elles ont été incubées dans un tampon contenant de l'annexin V couplée au FITC selon le protocole du manufacturier (R&D Systems, Mineapolis, MN). Brièvement, 0.25x10<sup>6</sup> cellules ont été récupérées (cellules attachées et flottantes), lavées une fois avec du PBS 1X et resuspendues dans 200 µl de tampon de liaison contenant l'annexin V couplée au FITC et l'iodure de propidium. Après 10 min. d'incubation à température pièce, la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant un FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Les cellules U937 traitées 4 h avec 4 µg/ml de camptothécine ont été utilisées comme contrôle positif.

## **2.8 Analyse du cycle cellulaire**

La prolifération cellulaire a été déterminée par immunofluorescence indirecte en utilisant la technique du marquage au bromodéoxyuridine (BrdU). Les FPH en phase exponentielle de croissance ont d'abord été irradiés, puis 10 µM de BrdU (Roche) a été ajouté 2 h avant la récolte des cellules. Aux temps indiqués, les cellules ont été récoltées, lavées avec du PBS/EDTA 50 mM, resuspendues dans 1 ml PBS/EDTA 50 mM et fixées en ajoutant lentement 3 ml d'éthanol 100% froid tout en vortexant constamment. Les cellules fixées peuvent être gardées plusieurs jours à -20°C. Les cellules fixées ont ensuite été centrifugées, resuspendues dans 1 ml 2N HCl contenant 0,5% Triton X-100 (v/v) et incubées à température pièce pour 1 h. Après

centrifugation, l'acide a été neutralisé en ajoutant 1 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  pH 8,5 et en incubant 1 h à température pièce. Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues dans 1 ml PBS plus 1% BSA (w/v) et 0,5% Tween 20 (v/v) contenant 10  $\mu\text{l}$  de l'anticorps (IgG) monoclonal anti-BrdU (Becton Dickinson) soit 1 h à température pièce ou toute la nuit à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS/BSA/Tween 20 et incubées 1 h dans 1 ml PBS plus 1% BSA (w/v) et 0,5% Tween 20 (v/v) contenant 5  $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-souris couplé au FITC (Sigma). Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de PBS contenant 5  $\mu\text{g/ml}$  d'iodure de propidium (Molecular Probes). Toutes les centrifugations ont été faites à 1500 rpm pendant 10 min à 4°C. L'analyse de la prolifération cellulaire a été accomplie en utilisant un cytomètre en flux FACScan (Becton Dickinson).

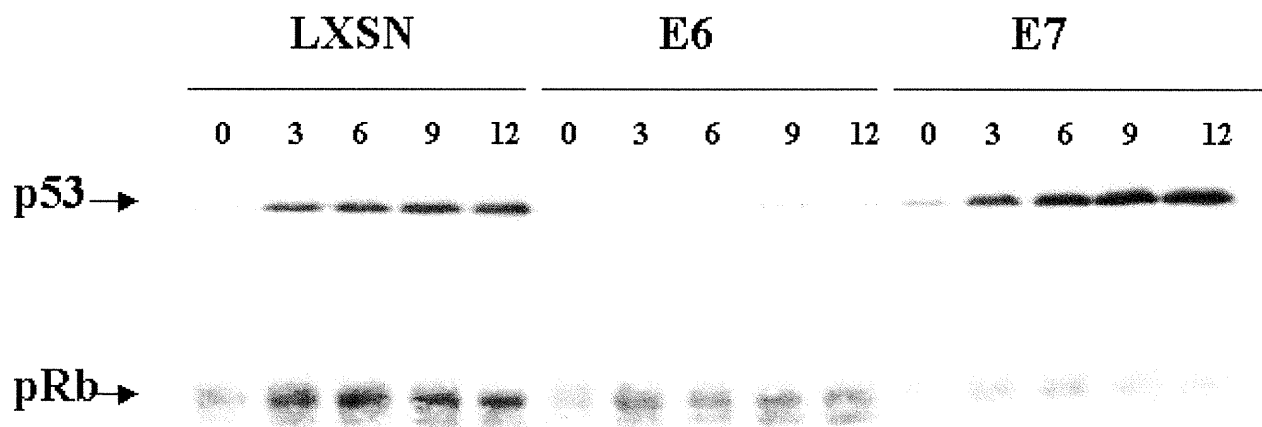
## 2.9 Fréquence de Mutation

Les fibroblastes de poumons humains ont été traités au HAT pour une période 7 jours avant l'irradiation (5 jours avec 100  $\mu\text{M}$  d'Hypoxanthine, 2  $\mu\text{M}$  d'Aminoptérine, 16  $\mu\text{M}$  de Thymidine et 2 jours avec 100  $\mu\text{M}$  d'Hypoxanthine, 4  $\mu\text{M}$  d'Aminoptérine, 16  $\mu\text{M}$  de Thymidine). Les cellules ont ensuite été cultivées dans du milieu HT (100  $\mu\text{M}$  d'Hypoxanthine, 16  $\mu\text{M}$  de Thymidine) pendant au moins 2 jours et irradiées dans du PBS  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  avec 400  $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$  UVB. Après une période d'expression phénotypique de 10 jours, les cellules sontensemencées dans 15  $\mu\text{g/ml}$  de 6-thioguanine a une densité de  $0.25 \times 10^6$  cellules/pétri de 100 mm et incubées à 37°C pendant au moins 14 jours. Les colonies formées sont colorées avec une solution 0,5% bleu de méthylène/ 50% méthanol et comptées. La fréquence de mutation est exprimée en nombre de mutants par millions de cellules et est corrigée par l'efficacité de croissance cellulaire en milieu régulier.

## 3 Résultats

### 3.1 Les protéines E6 et E7 de VPH16 augmentent respectivement la dégradation de p53 et pRb.

Les fibroblastes de poumons (LF-1) utilisés pour l'étude proviennent d'un embryon femelle humain (201) et ont été infectés par un rétrovirus (pLXSN) exprimant la protéine E6 ou E7 de VPH16. Nous avons décidé d'utiliser des cellules primaires pour effectuer des études de réparation de l'ADN et de mutagenèse, car (i) la plupart des autres études de ce genre ont été effectuées avec des lignées tumorales, ce qui ne reflète pas nécessairement la réalité (ii) elle possède un potentiel de division qui est élevé (+ de 100 divisions), ce qui est nécessaire pour les études de mutagenèse (iii) nous possédons une lignée isogénique déficiente pour p21 (« knockout » cellulaire), ce qui peut être intéressant pour des expériences futures. La caractérisation et la validation des lignées polyclonales isogéniques LXSN, E6 et E7 ont été effectuées par



**Figure 5 : Statut de p53 et pRb dans des fibroblastes humains de poumon produisant les oncoprotéines E6 ou E7 de VPH16 . Les cellules ont été irradiées par  $400 \text{ J.m}^{-2}$  d'UVB et extraites aux temps indiqués pour effectuer des études d'immunobuvardage Western.**



immunobuvardage Western. En effet, puisque E6 et E7 augmentent respectivement la dégradation de p53 et pRB (141, 142) (172), nous avons utilisé des anticorps anti-p53 et anti-pRB pour estimer la quantité de ces deux protéines dans les différentes lignées. Tel qu'illustré à la figure 5, on remarque que le niveau de p53 dans la lignée E6 12 h après une irradiation aux UVB est inférieur au niveau basal de la lignée contrôle LXSJN. On note aussi une nette diminution de pRB dans la lignée E7, la forme hypophosphorylée ayant complètement disparue. Fait intéressant, il semble que p53 soit stabilisé dans la lignée E7. Ce résultat a aussi été observé par d'autres groupes (191, 202, 203) et peut s'expliquer par le fait que E7 bloque l'interaction de p53 avec mdm2 et empêche ainsi sa dégradation via le système ubiquitine/protéasome (202).

### **3.2 E6 inhibe le GREN et le TCREN, alors que E7 inhibe le GREN seulement**

Afin d'explorer le rôle des oncoprotéines E6 et E7 de VPH16 dans le REN, et conséquemment dans le développement des cancers de peau de type non-mélanome, nous avons décidé d'évaluer le taux de réparation de l'ADN suite à une irradiation aux UVB en utilisant le LMPCR, une méthode de détection des dommages à l'échelle nucléotidique (voir figure en annexe I ; pour une revue de la littérature (204)). Le LMPCR est une méthode très sensible de détection des dommages puisqu'elle implique une étape d'amplification par PCR. Elle peut quantifier une variété de dommages induits dans l'ADN, en autant que ceux-ci puissent être transformés en extrémités 5' liables. Cette méthode constitue un outil de choix pour la quantification des CPD induits par les UV, puisque ceux-ci sont convertis en extrémités 5' liables de façon très spécifique par l'enzyme T4 endonucléase V (205). Elle nous a permis d'évaluer la réparation des CPD sur les BT et les BNT de p53 et c-jun dans les différentes lignées suite à une irradiation. Les UVB (290-320 nm) ont été utilisés comme source d'irradiation, parce qu'ils constituent un agent mutagène biologiquement pertinent et produisent principalement des CPD dans l'ADN. Toutes les études de LMPCR ont été effectuées à Québec dans le laboratoire du Dr R. Drouin

sous la supervision du Dr J.-P. Therrien. Ces études ont mené à une publication (voir article en annexe II)

Le tableau 1 montre les délais relatifs dans le REN pour le BT et le BNT suite à une irradiation aux UVB. On peut remarquer que pour la lignée E6, il y a un délai dans la réparation qui est 4 fois plus grand que la lignée LXS<sub>N</sub>, et cela, dans les 2 brins. E6 augmentant la dégradation de p53 et créant ainsi un modèle cellulaire fonctionnellement déficient en p53, nous avons voulu évaluer le taux de réparation dans des cellules génétiquement déficientes en p53. Même si plusieurs études ont fait la preuve que p53 était impliqué dans le GREN, son rôle dans le TCREN reste plutôt controversé. Étant donné les résultats obtenus avec la lignée E6, impliquant une déficience dans les 2 types de REN, nous avons décidé de faire la lumière sur l'implication de p53 dans le TCREN. Pour ce faire, nous avons utilisé une lignée de fibroblastes de peau provenant de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (LF041) dans laquelle p53 est inactivée et donc non exprimé (tel que démontré par notre laboratoire (206)). Les résultats du tableau 1 montrent qu'il y a un délai dans la réparation des CPD qui est respectivement de 6 et 3 fois plus grand pour de BT et BNT.

Enfin, les études de LMPCR sur les fibroblastes de poumon produisant la protéine E7 ont montré un délai dans la réparation du BNT seulement, qui était 3,5 fois plus grand que dans la lignée contrôle LXS<sub>N</sub>. Par contre, la réparation du BT ne semble pas être altérée dans la lignée E7 suite à une irradiation aux UVB.

### **3.3 Conséquences physiologiques de la déficience en REN**

Nous avons démontré que des fibroblastes primaires exprimant la protéine E6 ou E7 sont déficients en REN suite à une irradiation aux UVB. Nous avons ensuite voulu savoir si cette déficience avait des conséquences physiologiques pouvant contribuer

**Tableau 1 : Délais relatifs dans l'excision des nucléotides (REN) pour des fibroblastes de Li-Fraumeni et de poumon exprimant les oncoprotéines VPH16 E6**

Type de fibroblastes	Brin	Temps requis pour avoir 50 % de réparation (h)*	Délai dans la réparation	nombre et location des sites analysés
Peau normal	BT	3 (1, 8)	1	16 (exon 1 c-jun); 5 (exon 7 p53)
	BNT	10 (4, 16)	1	10 (exon 5 p53)
Peau LF041	BT	14 (4, 28)	6.1±2.8	16 (exon 1 c-jun); 5 (exon 7 p53)
	BNT	28 (16, 32)	3.1±1.1	10 (exon 5 p53)
LXSN-poumon	BT	3.5 (1, 8)	1	9 (c-jun promoteur); 4 (exon 7 p53)
	BNT	6 (2, 16)	1	7 (exon 5 p53); 9 (exon 8 p53)
E6-Poumon	BT	12 (6, 24)	3.8±1.4	9 (c-jun promoteur); 4 (exon 7 p53)
	BNT	18 (8, 24)	4.1±1.3	7 (exon 5 p53); 9 (exon 8 p53)
E7-Poumon	BT	4 (1, 8)	1.5±0.8	9 (c-jun promoteur); 4 (exon 7 p53)
	BNT	16 (4, 32)	3.6±1.9	5 (exon 5 p53); 5 (exon 8 p53)

\* Les données entre parenthèses représentent le temps le plus lent et le plus rapide pour achever 50% de la réparation parmi les différents sites analysés.

à la formation de tumeurs. Pour ce faire, nous avons évalué la survie clonogénique, l'index apoptotique, la prolifération cellulaire et la fréquence de mutation des lignées LXSN, E6 et E7 suite à une irradiation aux UVB.

### 3.3.1 Les lignées E6 et E7 sont plus sensibles aux UVB.

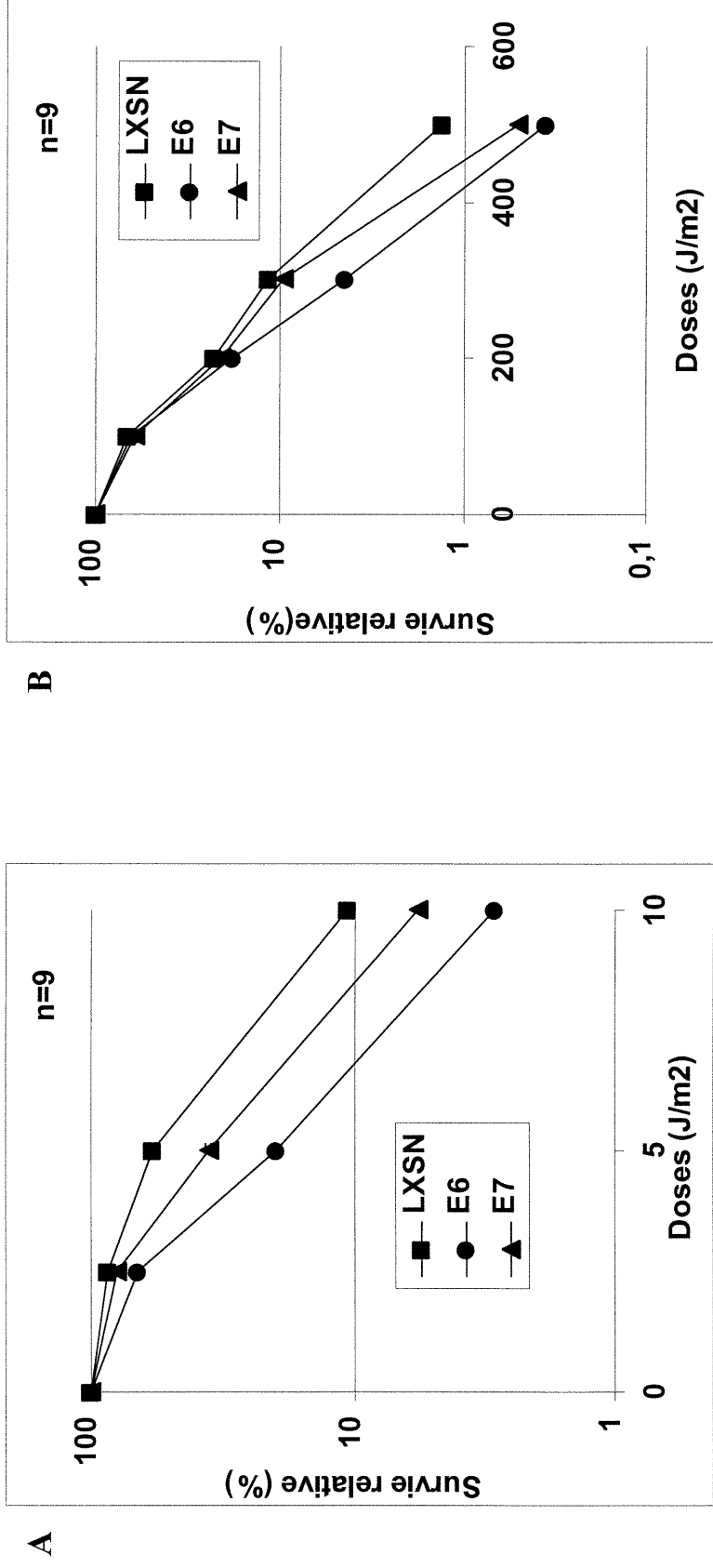
Les courbes de survie sont effectuées en irradiant des cellules en phase exponentielle, en les réensemencant à faible densité et en les incubant à 37°C pour environ 2 semaines. On peut par la suite colorer les colonies formées. La survie relative des lignées E6 et E7 est plus faible que la lignée contrôle suite à une forte dose d'UVB (400 J. m<sup>-2</sup> et +), mais l'écart entre E6 et E7 n'est pas significatif. Cependant, cet écart devient significatif lorsque l'on construit une courbe de survie aux UVC (voir figure 6). Les UVC produisant presque exclusivement des CPD et des 6-4 PP, on peut penser que c'est ce type de dommages qui est responsable de la sensibilité des cellules. En effet, la lignée E6 étant déficiente dans les 2 types de REN, il est normal qu'elle soit plus sensible aux UV que la lignée E7. Fait intéressant, les fibroblastes de Li-Fraumeni (génétiquement déficients en p53) sont résistants aux UVC (59).

L'explication la plus plausible est que l'action de E6 s'étend bien au-delà de l'augmentation de la dégradation de p53 (voir 1.2.2.2.2).

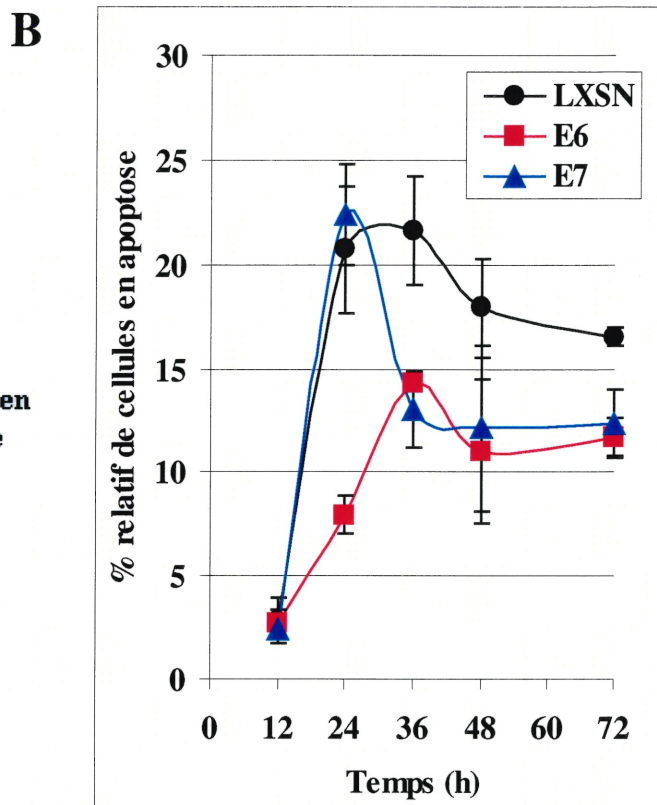
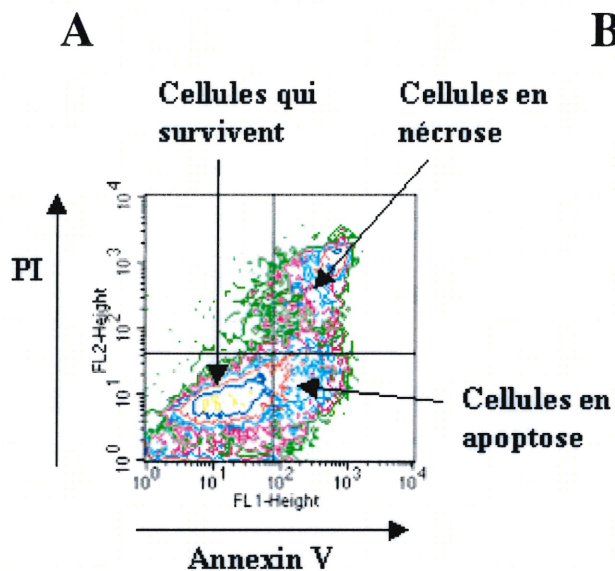
### 3.3.2 La lignée E6 est déficiente en apoptose

Afin de déterminer la cause de la diminution de la survie clonogénique pour les lignées E6 et E7 suite aux UVB, nous avons effectué des études d'apoptose. De plus, une étude ayant démontré que l'induction de l'apoptose pouvait interférer avec le processus de REN (207), nous avons voulu savoir si la déficience en REN que nous observions était causée par une augmentation de l'index apoptotique. Pour ce faire, nous avons utilisé 2 méthodes : l'annexin V et la fragmentation de l'ADN.

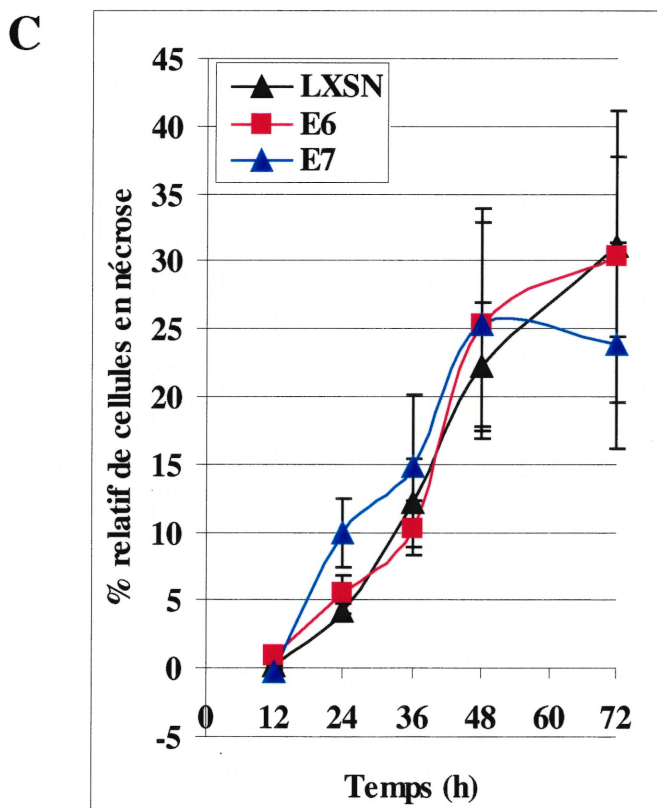
La méthode de l'annexin V se base sur un événement biochimique précoce qui se produit seulement chez les cellules en apoptose : la translocation des PS du feuillet interne au feuillet externe de la membrane cytoplasmique. L'annexin V lie spécifiquement les PS en présence de  $Ca^{2+}$ . L'utilisation de l'annexin V conjointement avec un marquage à l'iodure de propidium (PI) permet de quantifier la quantité de cellules en apoptose versus en nécrose. Le PI est un agent intercalant de l'ADN qui ne peut pénétrer la cellule que si la membrane cytoplasmique est endommagée. Par conséquent, seule les cellules nécrotiques seront positives au PI, car l'intégrité de leur membrane cytoplasmique est menacée. De plus, les cellules en nécrose sont aussi positives pour l'annexin V, car cette dernière pénètre à l'intérieur de la cellule et lie les PS du feuillet interne de la membrane cytoplasmique. Une cellule annexin V + et PI + est donc en nécrose, alors qu'une cellule annexin V + seulement est en apoptose (voir figure 7 a). L'autre méthode utilisée se base sur un événement qui survient généralement après la translocation des PS : c'est la dégradation internucléosomale de l'ADN. En effet, lors du processus apoptotique, une endonucléase dépendante du  $Ca^{2+}$  dégrade l'ADN entre les nucléosomes (environ 180 pb). Lorsque l'on fait migrer cet ADN sur un gel d'agarose, on obtient un patron de dégradation en échelle. En contrepartie, l'ADN d'une cellule en nécrose est clivé de façon aléatoire formant ainsi une traînée sur un gel d'agarose (76).



**Figure 6 : Survie clonogénique des fibroblastes humains en croissance exponentielle produisant les protéines E6 et E7 de VPH16 après une irradiation aux rayons UVC ou UVB. L'habilité de former des colonies a été évalué 14 jours après l'irradiation et est exprimée relativement aux cellules non-traitées. A: UVC, B: UVB. Chaque expérience a été effectuée 3 fois en triplicata (l'écart type est présent sur les graphiques, mais est presque nul).**



**Figure 7 : Mesure de l'apoptose par la méthode de l'annexin V dans les fibroblastes produisant la protéine E6 ou E7 de VPH16 suite à une irradiation aux UVB.** Les cellules ont été irradiées et, aux temps indiqués, ont été marquées à l'annexin V et à l'iodure de propidium, puis analysées par cytométrie en flux. A, schéma de cytométrie en flux. B, % de cellules en apoptose. C, % de cellules en nécrose.



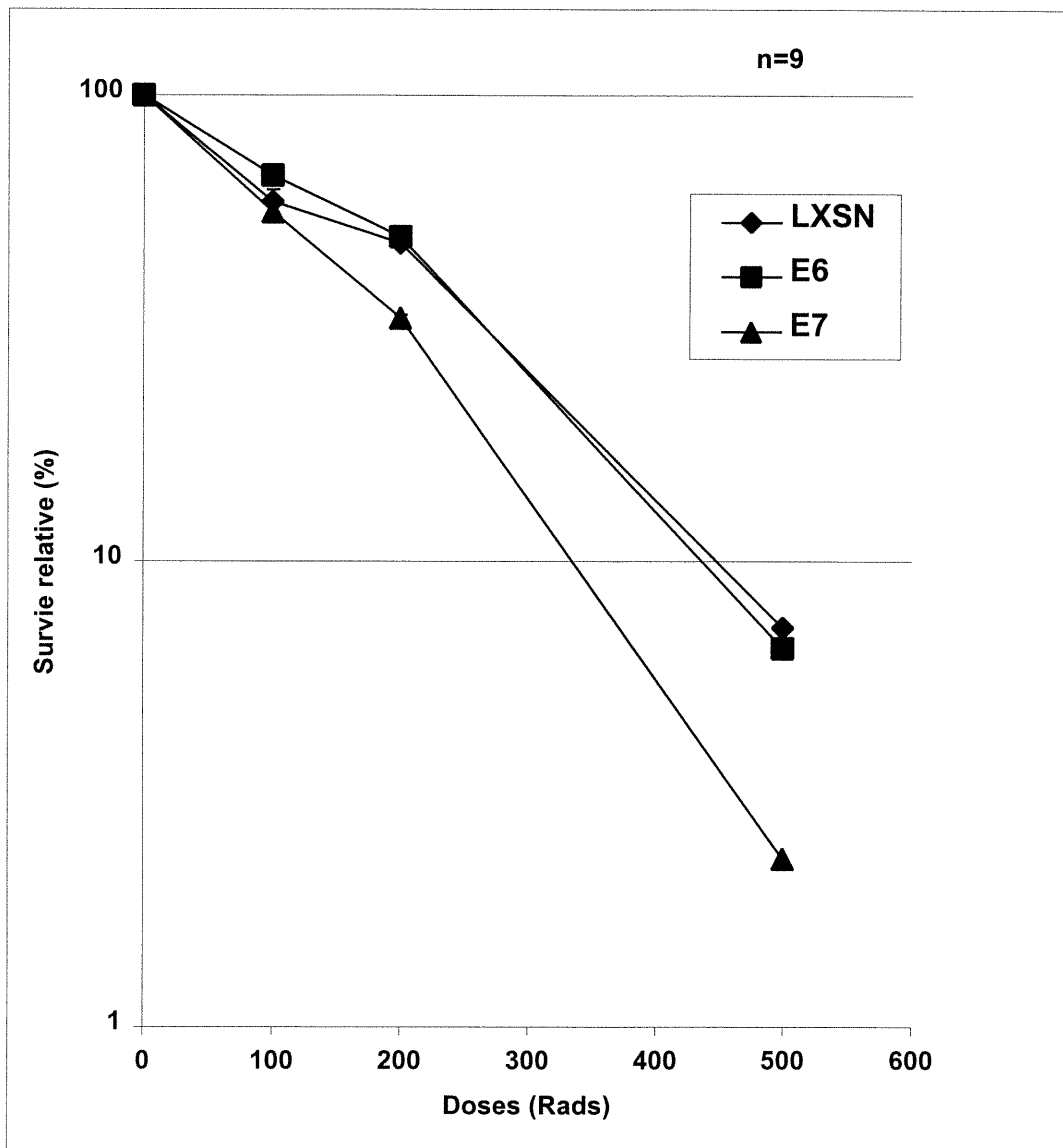


Sur la figure 7 b, on peut remarquer que 12 h après l'irradiation, l'index apoptotique mesuré par l'annexin V est très bas (autour de 2 %) pour les trois lignées. À 24 h, le nombre de cellules en apoptose a considérablement augmenté pour atteindre 20 % dans les cellules LXSN et E7, alors qu'on en a 2 fois moins dans la lignée E6. Le patron de dégradation en échelle se produit beaucoup plus tard, soit 4 jours après l'irradiation dans les lignées LXSN, E6 et E7 (voir figure 8). De façon similaire, la dégradation internucléosomale de l'ADN des cellules E6 est beaucoup plus basse (presque invisible). La nécrose, telle que démontrée dans la figure 7 c, est significativement élevée à 24 h, mais l'écart entre les lignées est non significatif.

De façon générale, on peut assumer que ni l'apoptose, ni même la nécrose n'interfère avec le processus de REN. En effet, 8 h après l'irradiation, le taux de réparation est déjà différent d'une lignée à l'autre (voir article en annexe II), alors que 12 h après l'irradiation, le pourcentage de cellules non-viable est très bas (< 5%).

Fait important, on ne peut faire de corrélation entre le pourcentage de mort cellulaire mesuré par l'annexin V+PI et la survie clonogénique. En effet, bien que les courbes de pourcentage de nécrose soient semblables pour les trois lignées, la lignée E6 garde un % d'apoptose significativement plus bas que la lignée contrôle jusqu'à 72 h après l'irradiation aux UVB (voir figure 7 b). De plus, à chaque temps étudié, le taux de mort cellulaire ne dépasse jamais 50 %, alors qu'à 400 J.m<sup>2</sup> d'UVB, on a entre 1 et 10% de survie clonogénique pour les trois lignées. Certaines études ont montré que des agents qui causent des bris double-brin à l'ADN et des dommages oxydatifs (ex : radiations ionisantes, doxorubicine, étoposide) sont en mesure d'induire un arrêt permanent du cycle cellulaire (208-210). L'hypothèse avancée est que les différentes lignées subissent un arrêt permanent du cycle cellulaire (qui est accentué chez les E6) qui serait dû à une sensibilité accrue aux dommages oxydatifs induits par les UVB: les cellules ne meurent donc pas, mais ne se divisent plus. Pour tester cette hypothèse, nous avons obtenu une courbe de survie clonogénique et le pourcentage de cellules en apoptose (mesuré par essai d'annexin V + PI) pour les trois lignées suite à une exposition aux radiations ionisantes (RI). Si notre hypothèse est bonne, la corrélation entre le résultat de la courbe de survie et le pourcentage de mort cellulaire devrait être





**Figure 9 : Survie clonogénique des fibroblastes humains en croissance exponentielle produisant les protéines E6 et E7 de VPH16 après une irradiation aux radiations ionisantes.** L'habilité de former des colonies a été évalué 14 jours après l'irradiation et est exprimée relativement aux cellules non-traitées. L'expérience a été effectuée 3 fois en triplicata (l'écart type est présent sur le graphique, mais est presque nul).

A

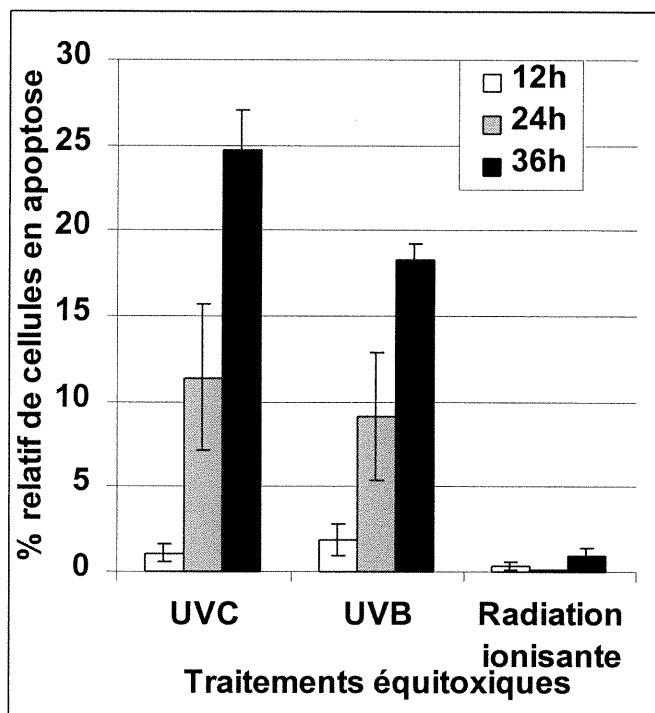
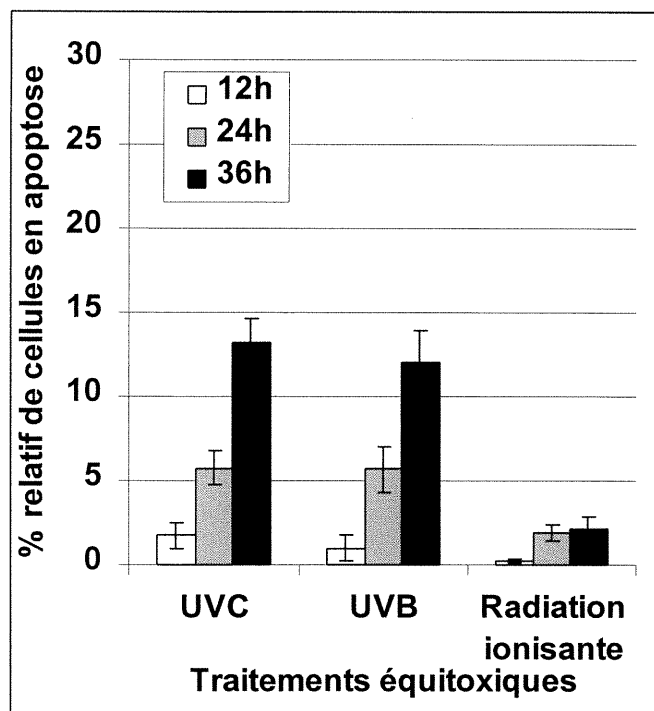
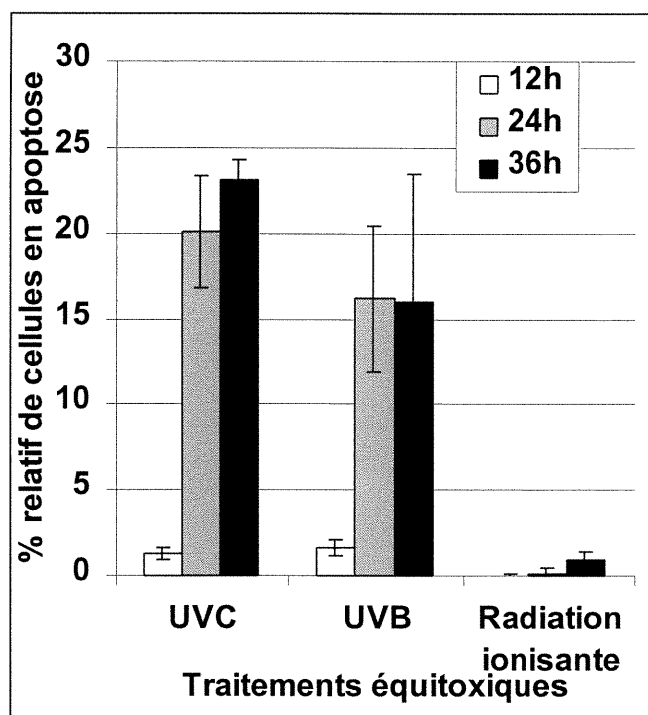


Figure 10 : Mesure de l'apoptose par la méthode de l'annexin V dans les fibroblastes produisant la protéine E6 ou E7 de VPH16 suite à une irradiation aux UVC, aux UVB et aux RI. Les cellules ont été irradiées et, aux temps indiqués, ont été marquées à l'annexin V et à l'iodure de propidium, puis analysées par cytométrie en flux. A, LXSN. B, E6. C, E7.

B



C



encore plus faible lorsque nous irradiions les 3 lignées aux RI. Sur la figure 10, on peut remarquer que, suite à une irradiation aux RI, le pourcentage d'apoptose est nul pour les trois lignées même jusqu'à 36 h, alors que sur la figure 9, le pourcentage de survie clonogénique au RI se situe entre 1 et 10 %. Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif engendré par les RI produit un arrêt permanent de la prolifération cellulaire qui est responsable de la diminution de survie clonogénique. On peut donc conclure que la diminution de survie clonogénique des trois lignées suite à une irradiation aux UVB est due en partie à un arrêt permanent de la prolifération cellulaire causé par les dommages oxydatifs, mais ce résultat n'explique pas la situation de E6, c'est-à-dire un plus faible taux d'apoptose et une plus grande sensibilité telle que mesurée par la courbe de survie aux UVB .

Bien que jamais mentionné dans la littérature, les cellules E6 pourraient subir un arrêt permanent du cycle cellulaire dû à l'accumulation de CPD (ou 6-4 PP) dans son ADN (causé par la déficience en GREN et TCREN). Les UVC ne produisant pratiquement que ce type de dommage, nous pouvons remarquer que la lignée E6 est plus sensible aux UVC que les autres lignées, tel que montré par la courbe de survie clonogénique (voir figure 6 a). De plus, le pourcentage de cellules qui meurent par apoptose est plus bas 36 h après l'irradiation aux UVC comparativement aux deux autres lignées. Ces résultats étant presque identiques à ceux obtenus pour les UVB, on peut penser que l'accumulation de CPD favorise un arrêt permanent de la prolifération cellulaire chez E6, expliquant ainsi la diminution de la survie clonogénique suite à une irradiation aux UVB.

Bref, dans notre cas, il est impossible de comparer le pourcentage de survie clonogénique à celui de la mort cellulaire mesurée par l'annexin V + PI, car aux moins un autre facteur entre en ligne de compte : l'arrêt permanent du cycle cellulaire. Il est possible que la faible survie clonogénique (entre 1 et 10%) des trois lignées suite aux UVB soit due à un arrêt permanent du cycle cellulaire causé par des dommages oxydatifs à l'ADN. De plus, nous spéculons que la faible survie clonogénique de la lignée E6 suite à une irradiation aux UVB est due en partie à la mort cellulaire, mais aussi à un arrêt permanent suite à une persistance des CPD et 6-4 PP induits par les

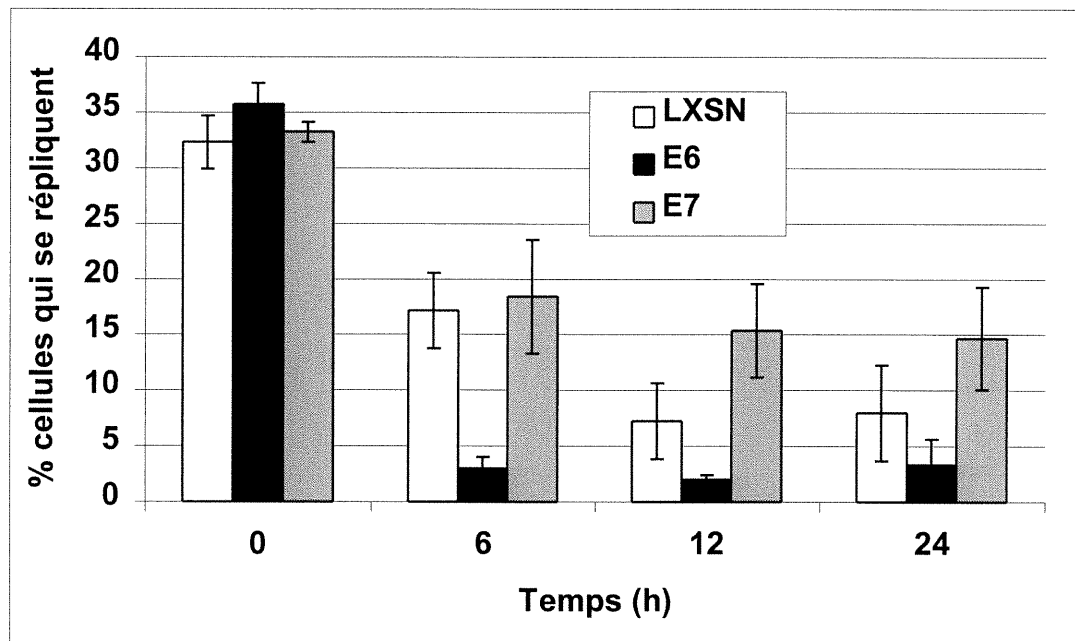
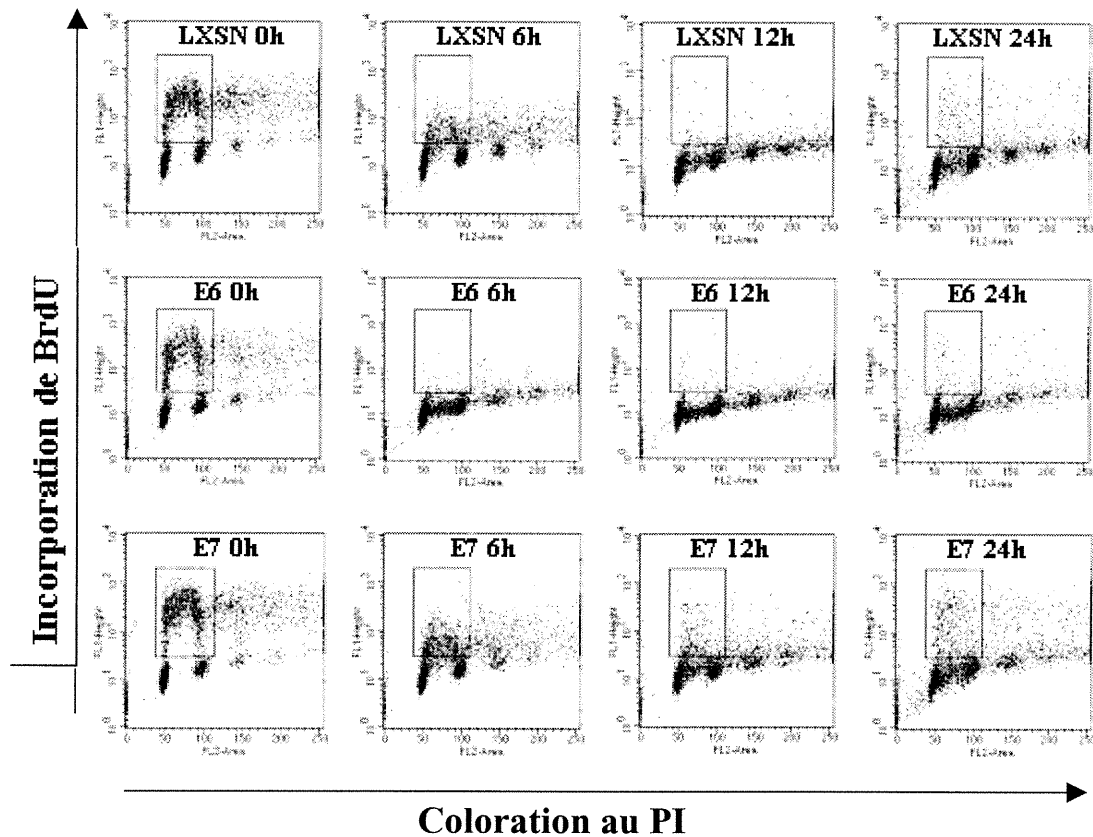
UVB (la lignée E6 est profondément déficiente en REN comparativement aux deux autres lignées).

### **3.3.3 L'inhibition du point de contrôle en G1 du cycle cellulaire n'est pas la cause de l'accumulation de CPD dans les lignées E6 et E7**

Des études de prolifération cellulaire ont ensuite été effectuées dans le but de démontrer que (i) le taux de réparation différentiel n'était pas du à un indice de prolifération cellulaire qui est différent entre les lignées (ii) que la prolifération cellulaire de la lignée E6 était plus basse que LXS et E7 suite à une irradiation aux UVB (iii) l'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire n'est pas la cause de l'accumulation de CPD dans les lignées E6 et E7.

Afin de pouvoir comparer des résultats de LMPCR obtenus dans différentes lignées, la prolifération cellulaire de ces dernières doit être sensiblement la même. En effet, la réparation pourra sembler être plus rapide si la prolifération cellulaire est plus grande dans une lignée, du à un effet de dilution par l'ADN nouvellement répliqué. Par exemple, la lignée LXS répare le BNT de son ADN plus rapidement que E6 et E7. On pourrait ainsi penser que les cellules LXS prolifèrent plus rapidement. Bien que suite à une irradiation aux UV les cellules subissent un arrêt de prolifération cellulaire (15, 17), cette expérience contrôle est essentielle. Les études de prolifération cellulaire suite aux UVB telles que montrées à la figure 11 peuvent aussi donner des indices quant l'arrêt permanent du cycle cellulaire, ce que nous soupçonnons pour la lignée E6. Enfin, l'arrêt du cycle cellulaire suite à un stress est censé être utilisé pour vérifier et réparer l'ADN endommagé. L'expérience de prolifération cellulaire peut nous servir à montrer que ce n'est pas une déficience à ce niveau qui explique le taux de réparation plus bas dans les lignées E6 et E7.

Nous avons utilisé la méthode d'incorporation du bromodéoxyuridine (BrdU) conjointement avec le marquage au PI pour l'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux. Le BrdU étant un analogue de la thymidine, il est incorporé dans l'ADN lors



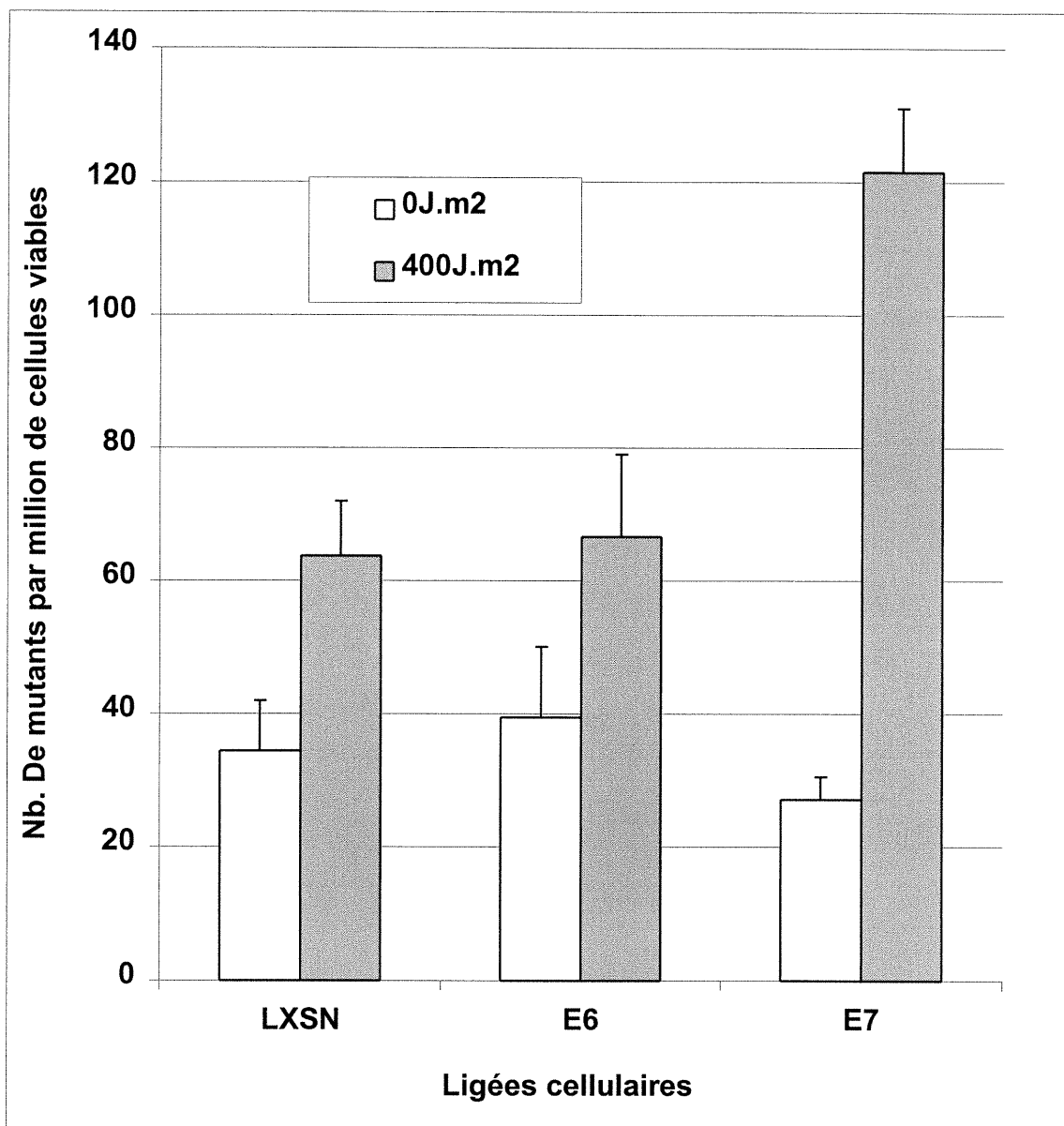
**Figure 11 : Détermination de la prolifération cellulaire après une irradiation aux UVB.** Les cellules ont été irradiées par  $400 \text{ J.m}^2 \text{ d' UVB}$  et 2 h avant la récolte,  $10 \mu\text{M}$  de BrdU a été ajouté au milieu de culture. L'incorporation du BrdU a été détectée par immunofluorescence indirecte en utilisant la cytométrie en flux.

de la réplication et constitue donc un marqueur de la prolifération cellulaire. Il existe des anticorps anti-BrdU qui sont couplés à un fluorochrome (dans notre cas FITC) et qui peuvent être utilisés pour détecter la quantité de BrdU incorporé dans une cellule par cytométrie en flux. Le PI est un agent qui intercale l'ADN et il est utilisé pour la quantification de l'ADN dans une cellule à un moment précis. Le genre de profil obtenu est montré dans le haut de la figure 11.

Il n'y a pas de différences majeures entre le taux de prolifération des trois lignées qui pourraient expliquer la déficience en réparation des lignées E6 et E7. Par exemple, les cellules LXS et E7 ont le même indice de prolifération, mais pourtant, la lignée E7 est déficiente en GREN. On peut aussi constater que l'arrêt de la prolifération est plus marqué pour les cellules E6, et cela, jusqu'à 24 h après l'irradiation. Cela peut suggérer que suite aux UVB, il y a effectivement un arrêt prolongé des cellules E6. Enfin, les trois lignées subissent un arrêt du cycle cellulaire suite aux UVB et nous pouvons donc conclure que ce n'est pas une déficience à ce niveau qui explique la déficience en REN. De plus, la lignée E6 subit un arrêt de prolifération qui est prolongé et, pourtant, son taux de réparation de l'ADN semble être le plus affecté des trois lignées. Cette arrêt prolongé pourrait être du à la persistance des dommages dans l'ADN de la lignée E6, tel que démontré par les expériences de LMPCR.

### **3.4 La lignée E7 accumule plus de mutations au locus *hprt* suite à une irradiation aux UVB.**

Les études antérieures sont plutôt controversées sur le rôle de p53, pRB, E6 ou E7 dans la mutagenèse. En effet, un groupe a démontré que chez la souris, p53 n'affecte pas l'accumulation de mutations ponctuelles dans un transgène après un traitement au 4-nitroquinoline 1-oxyde (211). De plus, il n'y a pas d'augmentation de la fréquence de mutation du gène supF (dans un vecteur navette) préalablement irradié aux UV et introduit dans des fibroblastes embryonnaires de souris p53 +/- et p53-/- ou une lignée murine p53-/- et son contrôle isogénique dans lequel p53 est réexprimé (212) (213). Par contre, il semble qu'il y ait 4 fois moins de mutations induites dans le gène supF par les UV dans une lignée de fibroblastes murins p53 -/- où p53 a été



**Figure 12 : Fréquence de mutation des fibroblastes humains de poumon produisant les protéines E6 ou E7 de VPH16 après une irradiation aux UVB.** Les cellules ont été traitées au HAT, puis irradiées par 400 J.m<sup>-2</sup> de rayons UVB et ensemencées à faible densité dans du milieu de culture contenant de la 6-thioguanine. Le nombre de mutants est corrigé par l'efficacité d'ensemencement.

réintroduit (214). L'inactivation de p53 par VPH16 E6 dans une lignée de carcinome du colon (RKO) conduit à une augmentation de la fréquence de mutations au locus *hprt* suite à une irradiation aux UV comparativement à la lignée parentale (144). Enfin, des kératinocytes humains produisant les protéines E6 ou E7 de VPH 16 sont hypermutables (vecteur navette supF) suite à un traitement au N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) (143). Afin de déterminer si l'inhibition de la réparation de l'ADN corrèle avec l'augmentation de la fréquence de mutation, nous avons décidé d'évaluer la fréquence de mutation au locus *hprt*. Cette méthode est biologiquement plus pertinente que l'utilisation d'un vecteur navette puisqu'elle mesure la fréquence de mutation dans un gène endogène où la structure de la chromatine est intacte. De plus, nous avons utilisé des fibroblastes primaires humains dans lesquels E6 ou E7 est exprimé, parce que nous croyons que l'utilisation de lignées cellulaires primaires reflète plus la réalité. En effet, la plupart du temps, les lignées tumorales ont subi des réarrangements de leur ADN ou possèdent des mutations dans d'autres gènes susceptibles d'influencer la fréquence de mutation.

Le locus *hprt* est situé sur le chromosome X et code pour une enzyme qui catalyse la phosphoribosylation de l'hypoxanthine et de la guanine pour former les nucléotides correspondants : l'IMP et le GMP. Cet enzyme fait partie de la voie de récupération des purines et agit conjointement avec la voie de synthèse *de novo* (c'est à dire la synthèse des purines à partir de précurseur plus petit). L'aminoptérine est un composé chimique qui bloque la synthèse *de novo* des purines : seules les cellules ayant un *hprt* fonctionnel peuvent survivre à ce traitement. On l'utilise pour diminuer la fréquence de mutation spontanée. Le 6-thioguanine (6-TG) est un analogue de la guanine qui, lorsque converti en nucléotide par *hprt*, est incorporé dans l'ADN. L'incorporation de ce nucléotide modifié a pour effet de bloquer la réplication. Seules les cellules *hprt*<sup>-/-</sup> vont survivre à ce traitement : on utilise donc le 6-TG pour évaluer la fréquence de mutation (inactivation) de *hprt* suite à divers traitements mutagéniques (215).

Nous avons donc traité les trois lignées (LXSN, E6 et E7) à l'aminoptérine pour éliminer les mutants spontanés, les cellules ont été irradiées avec 400 J.m<sup>-2</sup> d'UVB et ensuite ensemencées à faible densité dans du milieu contenant du 6-TG. Tel que montré à la figure 12, la fréquence de mutation de la lignée E6 ne diffère pas de la



lignée contrôle. Par contre, il y a une induction dans la lignée E7 qui est de 5 (5 fois plus de mutants induits que spontanés) alors qu'elle est seulement de 2 pour E6 et LXS<sub>N</sub>. On peut aussi remarquer que le nombre de mutants induits par les UVB dans les lignées LXS<sub>N</sub> et E6 est approximativement de 60 alors qu'il est de 120 dans la lignée E7. Nous travaillons présentement à l'élaboration du spectre de mutations au locus *hprt* induit par les UVB dans les lignées LXS<sub>N</sub>, E6 et E7.

Bien que les fibroblastes aient été traitées à l'aminoptérine, le taux de mutations spontanées est tout de même élevé. D'autres études utilisant des cellules tumorales, des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO), ou des lignées lymphoblastoïdes ont démontré des fréquences de mutations spontanées qui sont plus basses que celle que nous obtenons (254-257). Il n'existe cependant pas d'explications fondées pour expliquer ce phénomène. Cependant, une hypothèse serait que les cellules primaires que nous utilisons ont une tendance à accumuler des mutations spontanées lorsqu'elles sont dépourvues de leur environnement physiologique naturel.

## 4 Discussion

### 4.1 Le TCNER varie en fonction du gène

Nous avons démontré que des cellules rendues fonctionnellement déficientes en p53 par l'expression de la protéine E6 de VPH16 sont non seulement déficientes en GREN, mais aussi en TCREN. Afin de démontrer que cet effet n'était pas du à d'autres propriétés de E6 que celle d'augmenter la dégradation de p53, nous avons aussi effectué des études de LMPCR dans des fibroblastes de Li-fraumeni qui sont génétiquement déficients en p53. Les résultats étant similaires pour les deux lignées, nous en concluons que la déficience en p53 est responsable de la défaillance du GREN et TCREN suite à une irradiation aux UVB.

Tel que mentionné précédemment, il existe une controverse sur le rôle de p53 dans le TCREN et, de toute évidence, les résultats que nous avons obtenus se situent au cœur de cette controverse. Deux explications s'imposent alors (*i*) les méthodes utilisées pour évaluer le taux de réparation de l'ADN sont différentes (*ii*) les gènes utilisés pour étudier la réparation sont différents. Les explications précédentes se basent principalement sur la comparaison de nos résultats avec des études précédentes qui ont démontré un rôle pour p53 seulement dans le GREN (59-61).

Une autre méthode de quantification des CPD utilisée est de type Southern et quantifie la réapparition d'un fragment de pleine longueur après clivage par l'enzyme T4 endonucléase (clive spécifiquement les CPD). Notre méthode se base sur le PCR, qui théoriquement, est capable de détecter une seule molécule et de l'amplifier des milliers de fois, ce qui paraît d'emblée beaucoup plus sensible. Cependant, nous ne croyons pas que ce soit le manque de sensibilité de la technique de type Southern qui provoque la divergence des résultats, car une étude récente a démontré une déficience profonde en TCNER dans le gène p53 suite à une irradiation aux UV en utilisant des kératinocytes infectés avec le virus complet de VPH16 (63). Nous croyons que c'est plutôt l'utilisation de différentes cibles géniques pour évaluer le taux de réparation qui favorise la divergence des résultats. Les groupes ayant remarqué une déficience en TCNER dans des lignées p53  $-/-$ , ont la plupart du temps évalué le taux de réparation

sur le BT de c-jun ou p53 (1, 63, 64), alors que ceux qui ont constaté un taux de réparation normal ont utilisé le BT de DHFR (59-61). Nous avons donc posé l'hypothèse que suite à l'irradiation aux UVB de cellules p53<sup>-/-</sup>, la transcription de p53 et c-jun est diminuée, alors que celle de DHFR reste sensiblement la même. Le niveau de transcription des gènes corrèlerait donc avec leur capacité à être réparés par le TCREN. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études qui ont été menées au cours des dernières années. Tout d'abord, il a été démontré que suite à une irradiation aux UV, il y a diminution générale de la transcription tel que mesuré par un marquage métabolique de l'ARN (216, 217). De plus, il semble que cette diminution de la transcription soit prolongée dans les fibroblastes de Li-Fraumeni (218).

Deuxièmement, notre hypothèse devient intéressante quand on pense que p53 est un facteur de transcription et qu'il interagit avec des facteurs de transcription bien connus. D'ailleurs, une étude a démontré que p53 provoque une résistance à l'inactivation par les UV d'un plasmide rapporteur lorsque ce dernier possède un élément de reconnaissance par p53 dans son promoteur (219). Ce groupe suggère que les gènes ayant un élément de reconnaissance par p53 - il semble qu'il y ait de 200 à 300 sites consensus de p53 dans le génome humain (220)- serait réparé préférentiellement suite à une irradiation aux UV. Certains exemples plus spécifiques ont aussi été démontrés : (i) p53, en interagissant avec c-jun, augmente la transcription de MSH2, un gène impliqué dans la réparation par mésappariement de bases (221) (ii) p53R2, une sous-unité de la ribonucléotide réductase, possède un élément de réponse pour p53 dans son premier intron et est régulée de façon dépendante de p53 en réponse aux UV (70) (iii) p53 est associé à p300/CBP, un coactivateur de transcription durant le cycle cellulaire (222, 223) (iv) p53 réprime aussi la transcription de cdc2 et bcl2 (224, 225) (v) p53 possède un site consensus en aval de l'exon 1 de mdm2 et trans-active ce gène (226) et (vi) p53 régule sa propre transcription (227).

Afin de vérifier notre hypothèse, nous devons mesurer le niveau de transcription des gènes p53, c-jun et DHFR dans une lignée p53<sup>-/-</sup> par rapport à une lignée contrôle suite à une irradiation aux UVB. Pour ce faire, nous utiliserons l'essai de transcription nucléaire de type run-on. Cet essai mesure de façon spécifique la transcription des gènes en fonction de l'état de la cellule. Brièvement, les noyaux cellulaires sont isolés

et incubés avec du [ $\alpha$ - $p^{32}$ ] dUTP afin de marquer l'ARN nouvellement synthétisé. L'ARN total est ensuite purifié et hybridé au cDNA d'intérêt qui sont eux-mêmes immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. Il est à noter que le buvardage de type Northern n'est pas pertinent ici, car il mesure la quantité totale d'ARN dans une cellule, c'est à dire celui qui provient de la transcription, mais aussi celui qui provient de la stabilisation des ARNm.

L'inactivation de p53 semble être impliquée dans l'initiation de la tumorigénèse, car on retrouve fréquemment des clones mutés pour cette protéine dans la peau normale exposée au soleil. Il y a ensuite promotion de la tumorigénèse, car les cellules possédant une mutation dans p53 sont résistantes à l'apoptose induite par les UV et favorisent ainsi l'expansion clonale des cellules possédant une mutation de p53 (120, 122). La formation de mutations dans le gène p53 pourrait signifier un autre rôle dans la promotion de la tumorigénèse. En effet, la diminution de la transcription de certains gènes suite à une irradiation aux UV dans des lignées p53  $-/-$  corrèlerait avec une diminution du TCREN et probablement avec une augmentation de la fréquence de mutation. La déficience en p53 favoriserait donc la formation de mutations dans d'autres gènes au sein de la cellule.

## **4.2 Le biais expérimental imposé par la lignée E7**

Nous avons montré pour la première fois que des fibroblastes produisant la protéine E7 de VPH16 sont déficients pour la réparation du BNT de l'ADN suite à une irradiation aux UVB. A prime abord, il est tentant de spéculer que c'est la déficience en pRB qui en est la cause. En effet, nous savons que l'inactivation de pRB cause des tumeurs de la rétine et que l'œil est exposé aux rayons solaires pratiquement tous les jours. Des mutations dans pRB pourraient donc, en inhibant le GREN, favoriser le développement de rétinoblastomes. De plus, pRB interagit avec plusieurs complexes protéiques qui sont impliqués dans le remodelage de la chromatine (pour une revue de la littérature voir (228)), ce qui pourrait avoir une incidence sur la réparation de l'ADN. Par exemple, il semble que la chromatine des cellules pRB  $-/-$  soit plus accessible tel que démontré par une digestion à la nucléase (229). La protéine pRb affecte aussi la structure de la chromatine de façon plus directe, en interagissant avec

des histones déacétylase (230-232) et le complexe SWI/SNF (233, 234). D'un autre côté, E7 a une panoplie d'autres effets non-négligeables (voir section 1.2.2.2). Par exemple, E7 est localisé dans la matrice nucléaire et semble faire un complexe avec l'actine (182, 183). De plus, E7 lie une histone déacétylase, qui en déacétylant le promoteur de certains gènes, favorise la formation de nucléosomes (184). Il est donc aussi possible qu' E7 module le REN en provoquant des changements dans la structure de la chromatine. Afin de confirmer que pRB est impliqué dans le REN, des études de LMPCR devraient être entreprises soit en utilisant un knock-out cellulaire de pRB ou soit des lignées de rétinoblastomes.

### 4.3 E6 diminue l'apoptose induite par les UV

En utilisant deux méthodes de détection de l'apoptose, l'annexin V et la fragmentation de l' ADN, nous avons démontré que l'index apoptotique de la lignée E6 était 2 fois plus bas que dans la lignée contrôle. Bien que ces résultats ne corrélaient pas avec la courbe de survie clonogénique suite à une irradiation aux UVB, ils sont en accord avec des études antérieures. En effet, la protéine E6 de HPV 5, 10, 18 et 77 inhibe l'apoptose induite par les UV (151). Il a récemment été démontré que Bak, une protéine proapoptotique, était induite suite à une irradiation aux UVB et que cette induction était inhibée dans des lignées produisant la protéine E6, diminuant ainsi l'apoptose provoquée par une irradiation aux UV. De plus, il semble que la protéine Bak soit absente dans 100% des CPNM HPV+ analysés, ce qui n'est pas le cas dans les CPNM HPV- (235). Ce mécanisme d'inhibition de l'apoptose par HPV E6 favorise sûrement la survie du virus et il démontre de façon claire qu'il y a coopération du virus et des UV dans le développement de tumeurs de la peau. p53 est aussi connu pour induire l'apoptose en activant Fas (236), en diminuant les niveaux de bcl2 et en augmentant les niveaux de bax (81). En augmentant la dégradation de p53, E6 fournit un autre moyen d'échapper à l'apoptose induite par les UV.

Plusieurs études ont montré qu'une déficience en TCREN sensibilisait les cellules à l'apoptose induite par les UV. En effet, des cellules CSB (déficientes en TCREN) et XPA (déficientes en TCREN et GREN) entrent en apoptose plus facilement après une irradiation aux UV (218, 237, 238). Cette sensibilité accrue pourrait être due au

manque d'induction de la protéine mdm2 et donc à la persistance de p53 (238). Cependant, bien que la lignée E6 soit déficiente en TCREN, elle n'est pas plus susceptible d'entrer en apoptose et l'est même moins que la lignée contrôle, ce qui est probablement dû au fait que E6 augmente la dégradation de p53.

## **4.4 La lignée E7 est hypermutable aux UVB**

Lorsque les études de fréquence de mutation ont été entreprises, l'hypothèse avancée était qu'elle serait très élevée dans la lignée E6 et moyennement élevée dans la lignée E7 par rapport au contrôle. Cette hypothèse reflétait la déficience en REN qui est plus accentuée dans la lignée E6. Cependant, le résultat s'est avéré être contraire à nos attentes : seule la lignée E7 est hypermutable aux UVB.

### **4.4.1 La lignée E7 est déficiente en réparation des 6-4 PP ou des dommages oxydatifs?**

Tel que mentionné précédemment, les rayons UVB produisent principalement 2 types de lésions : les CPD et les 6-4 PP. La méthode de LMPCR que nous utilisons évalue le taux de réparation des CPD seulement. Bien qu'ils soient de 5 à 10 fois moins abondants et réparés plus rapidement que les CPD, il n'en reste pas moins que les 6-4 PP sont très mutagéniques chez la bactérie (239, 240). Il a été démontré que XPE, une protéine impliquée dans l'étape de reconnaissance du GREN, a une affinité plus grande pour les 6-4 PP que pour les CPD (241) et que le niveau d'ARNm de XPE augmente de façon dépendante de p53 suite à une exposition aux UV (39). Bien qu'il y ait une augmentation de la quantité de p53 dans la lignée E7 (voir figure 5), son activité transcriptionnelle est inhibée par E7 (242). Nous pouvons donc spéculer que la lignée E7 est déficiente pour la réparation des 6-4 PP dû à l'inhibition de la transcription de XPE par p53, ce qui entraînerait une persistance de ce type de dommages dans l'ADN et probablement une augmentation de la fréquence de mutation après irradiation aux UVB : cette hypothèse reste à être confirmée. Étant donné que les UVB produisent aussi des dommages oxydatifs dans l'ADN, il se peut que la fréquence de mutation élevée dans la lignée E7 soit due à une hypersensibilité à ce type de dommage. Quelques indices nous ont mené à cette hypothèse (*i*) tout d'abord, la lignée E7 est sensible aux radiations ionisantes tel que démontré par la

courbe de survie clonogénique (figure 9) (ii) les niveaux d' ARNm de l'anti-oxydant glutathione S-transférase (catalyse la liaison du glutathion a un grand nombre de substances hydrophobiques) sont 5-7 fois plus bas dans la lignée E7 que dans la lignée contrôle (243) (iii) les radiations ionisantes favorisent l'augmentation de l' ARNm E6/E7 (comprend le cadre de lecture ouvert de E6 et E7) sans toutefois préciser s'il y a augmentation de la protéine E7 (244).

#### 4.4.2 Hprt versus c-jun et p53

Il faut aussi tenir compte du fait que la fréquence de mutation au locus *hprt* ne reflète peut-être pas les données sur le taux de réparation de l' ADN dans les gènes p53 et c-jun. En effet, bien que dans la lignée E7 il y ait déficience de la réparation du BNT de p53 et/ou c-jun, cela ne veut pas nécessairement dire que c'est le cas dans tous les autres gènes du génome. Étant donné que nous pensons que le niveau de transcription d'un gène affecte la réparation par le TCREN, il se peut que la transcription de *hprt* soit différente de p53 ou c-jun suite à une irradiation aux UVB dans les différentes lignées. Par exemple, dans la lignée E6, nous pensons que la diminution de TCREN dans p53 et c-jun est due à une diminution de la transcription de ces gènes. Cependant, la transcription de *hprt* peut ne pas être affectée dans cette lignée, expliquant en partie la faible fréquence de mutation.

#### 4.4.3 Le « bypass » des lésions est-il en cause?

Tel que mentionné précédemment, certaines polymérases sont capables d'effectuer le « bypass » des lésions induites par les UV, que l'on appelle aussi synthèse translésionnelle (STL). Ces polymérases sont soit très fidèles, c'est à dire qu'elles incorporent le bon nucléotide vis à vis la lésion, soit très peu fidèles et favorisent la fixation de mutations dans l' ADN.

Le produit du gène XPV, la polymérase  $\eta$  (pol  $\eta$ ), est une polymérase fidèle. Les patients atteints de XP (XPA à XPG et XPV) sont anormalement sensibles au rayonnement solaire et sont prédisposés au développement des CPNM. Les cellules des patients XPA à XPG possèdent une déficience partielle ou totale du mécanisme de REN alors que celles des patients XPV sont aptes à effectuer le REN, mais sont

incapables de répliquer l'ADN endommagé (STL) par les UV (245). On sait maintenant que les gènes XPA à XPG codent pour des protéines impliquées directement dans le REN (voir figure 3). Par contre, ce n'est que beaucoup plus tard qu'il a été découvert que la pol  $\eta$  recombinante humaine pouvait corriger l'incapacité des cellules XPV à effectuer la STL des CPD et que la majorité des cellules de patients XPV possédaient une mutation dans ce gène (246-248). Pol  $\eta$  humaine est capable d'incorporer des nucléotides avec fidélité vis à vis un 6-4 PP aux sites CC et TC (249) ainsi qu'un CPD aux sites TT (250). Étant donné que pol  $\eta$  est une polymérase fidèle, son inactivation par une mutation cause une augmentation de la fréquence de mutation au locus *hprt* suite à une irradiation aux UV (251, 252). Les polymérases  $\iota$  (pol  $\iota$ ) et  $\zeta$  (pol  $\zeta$  ou les 3 sous-unités Rev1, Rev3 et Rev7) sont des polymérases peu fidèles qui semblent fonctionner en synergie pour effectuer, entre autre, la STL des lésions induites par les UV (voir 1.1.3.2) (112).

Une autre hypothèse apportée pour expliquer l'hypermutabilité de la lignée E7 serait une dérégulation du fonctionnement des polymérases impliquées dans la STL. En effet, l'une ou l'autre des situations suivantes pourrait se produire: E7 inhibe l'activité de pol  $\eta$  (fidèle) ou favorise l'activité synergique de pol  $\iota$  et  $\zeta$  (peu fidèle). Dans les deux cas, l'utilisation des polymérases peu fidèles est favorisée, de même que la formation de mutations dans l'ADN. De façon similaire, bien qu'étant déficientes en GREN et en TCREN, la réplication des dommages dans la lignée E6 se fait sans erreur, peut-être en favorisant l'utilisation de pol  $\eta$  au détriment de pol  $\iota$  et pol  $\zeta$ . Il n'existe aucune étude publiée pouvant appuyer cette hypothèse qui est donc purement spéculative.

#### 4.4.4 Expériences futures

Afin d'élucider la divergence des résultats de réparation de l'ADN et de fréquence de mutation, des études de LMPCR au locus *hprt* devront être entreprises afin de pouvoir les comparer aux résultats obtenus dans les gènes p53 et c-jun. Il existe aussi des enzymes, l'endonucléase III de *E. coli* et Fapy ADN glycosylase (253), qui clive spécifiquement les dommages oxydatifs en laissant une extrémité 5' liable. De plus, les 6-4 PP peuvent être clivés par un traitement chimique à la pipéridine chaude et les



fragments ainsi obtenus amplifiés par LMPCR. Il serait donc possible de déterminer s'il y a déficience dans la réparation de dommages oxydatifs ou 6-4 PP dans la lignée E7 suite à une irradiation aux UVB. Enfin, la technique d'évaluation de la transcription de type run-on, que nous mettons présentement au point, pourra être utilisée pour évaluer si le taux de transcription de *hprt* est différent au sein des différentes lignées après irradiation aux UVB.

Il existe différentes méthodes *in vitro* pour évaluer l'efficacité de la STL en présence des protéines E6 et E7. Le groupe de Johnson *et al.*, utilise une méthode de réplication *in vitro* qui consiste en l'incubation d'un oligonucléotide contenant un 6-4 PP ou un CPD à un site TT avec une amorce radioactive, les 4 dNTP ainsi que les polymérases (pol  $\eta$  ou pol  $\iota$  et  $\zeta$ ) à l'étude et le produit est migré en condition dénaturante (112). L'addition des protéines E6 ou E7 purifiées dans la réaction pourrait nous donner des indices sur leur rôle dans la STL, seulement s'il y a une interaction directe avec les polymérases. Le groupe de Masutani *et al.* utilise une autre méthode de réplication *in vitro* qui consiste en l'incubation d'un plasmide contenant une origine de réplication de SV40 et un CPD à un site TT avec du [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP, les trois autres dNTP, l'antigène grand T de SV40 et les extraits cellulaires voulant être étudiés. Le plasmide (répliqué ou non) est ensuite digéré par la T4 endonucléase et migré sur gel d'agarose (248). Cette méthode semble plus appropriée pour étudier le rôle de E6 ou E7 dans la STL, puisqu'elle utilise des extraits cellulaires et permet donc l'évaluation d'un rôle indirect (ex : transcription de gènes) de ces protéines dans la STL. Cependant, elle ne permet pas de distinguer si la STL est effectuée par pol  $\eta$  ou pol  $\iota$  et  $\zeta$ , ce qui nous intéresse particulièrement. La technique devra être modifiée, par exemple en immunoprécipitant pol  $\eta$  ou pol  $\iota$  avant d'effectuer l'essai de réplication. De plus, il serait aussi possible d'utiliser des extraits cellulaires de lignées qui sont déficientes pour ces protéines (ex : les cellules XPV sont déficientes pour pol  $\eta$ ) et qui expriment aussi la protéine E6 ou E7 de VPH16 pour réaliser l'essai de réplication.

Le spectre de mutation au locus *hprt* des cellules XPV après irradiation aux UV est différent de celui des cellules normales. En effet, alors que les UV induisent principalement des transitions C à T ou CC à TT dans des cellules normales, il y a

majoritairement des transversions C à A dans les cellules XPV sur un des deux brins du gène; l'autre brin possédant, la plupart du temps, la signature moléculaire des UV (252). Il s'est avéré par la suite que les transversions C à A étaient induites sur le brin avancé de la fourche de réplication (251). Une autre façon de voir si la lignée E7 inhibe l'activité de pol  $\eta$  serait de produire un spectre de mutation au locus *hprt* suite à une irradiation aux UVB. Si notre hypothèse est juste, nous devrions retrouver presque exclusivement des transversions C à A sur l'un des 2 brins.

## 5 Conclusion

L'objectif de cette étude est de démontrer que, suite à une irradiation aux UVB, les oncoprotéines E6 et E7 de VPH16 potentialisent la tumorigénèse en inhibant le REN des CPD et en altérant les voies de signalisation intracellulaires menant à l'apoptose, à l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et à la formation de mutations au locus *hprt*. Nous avons confirmé que des fibroblastes primaires exprimant la protéine E6 ainsi que des fibroblastes de Li-Fraumeni sont déficients en GREN et en TCREN, alors que ceux produisant la protéine E7 sont déficients en GREN seulement. Nous en concluons qu'une déficience fonctionnelle ou génétique en p53 mène à une défaillance du GREN et TCREN même si plusieurs études stipulent que p53 est impliqué dans GREN seulement (59-61). De plus, étant donné que E7 augmente la dégradation protéasomale de pRb, le résultat de cette étude suggère un rôle pour pRb dans le GREN. Les résultats démontrent que l'index apoptotique de la lignée E6 est 2 fois plus bas alors que la survie clonogénique est plus faible que la lignée contrôle suite à une irradiation aux UVB. La faible survie ne s'explique donc pas par une augmentation de la mort cellulaire (nécrose ou apoptose) par rapport au contrôle, mais probablement par un arrêt permanent de la croissance cellulaire qui est plus importante dans la lignée E6. Des études de cycle cellulaire ont permis de démontrer que les lignées E6, E7 et contrôle subissent un arrêt en G1 suite à une irradiation aux UVB et cet arrêt est plus prononcé dans les cellules produisant E6 : la déficience en REN ne peut donc pas être attribué à une inhibition de l'arrêt en G1. Enfin, la fréquence de mutation au locus *hprt* suite à une irradiation aux UVB est plus grande dans lignée E7 puisqu'elle comporte 5 fois plus de mutants induits, alors que l'induction est seulement de 2 dans les lignées LXSJ et E6. Il apparaît donc qu'une déficience en REN dans des cellules primaires ne résulte pas nécessairement en une augmentation de la fréquence de mutations et que la réplication des dommages (STL) entre aussi en ligne de compte. Il est probable que les oncoprotéines E6 et E7 coopèrent pour la survie du virus dans les cellules épithéliales infectées en diminuant l'apoptose et en dérégulant la machinerie cellulaire par la formation de mutations dans des gènes suite à une irradiation aux UVB. Des études sur des cellules positives pour VPH16 ou exprimant E6 et E7 sauraient répondre à cette question.

## 6 Bibliographie

1. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A. Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 15038-43, 1999.
2. Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. DNA repair and mutagenesis, ASM press, Washington, D.C., 1995.
3. Griffiths, H. R., Mistry, P., Herbert, K. E., and Lunec, J. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity, *Crit Rev Clin Lab Sci.* 35: 189-237, 1998.
4. Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., and Ronai, Z. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination, *Oncogene.* 17: 2543-7, 1998.
5. Wadgaonkar, R. and Collins, T. Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression, *J Biol Chem.* 274: 13760-7, 1999.
6. Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S., and Halazonetis, T. D. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13777-82, 1999.
7. Blattner, C., Tobiasch, E., Litfen, M., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation, *Oncogene.* 18: 1723-32, 1999.
8. Shieh, S. Y., Taya, Y., and Prives, C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization, *Embo J.* 18: 1815-23, 1999.
9. Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., and Haupt, Y. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2, *Embo J.* 18: 1805-14, 1999.
10. Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA

- damage-inducible sites [published erratum appears in *Genes Dev* 2000 Mar 15;14(6):750], *Genes Dev.* 14: 289-300, 2000.
11. Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S. X., and Dunphy, W. G. Requirement for atr in phosphorylation of chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in xenopus egg extracts [In Process Citation], *Genes Dev.* 14: 2745-56, 2000.
  12. Perry, M. E., Piette, J., Zawadzki, J. A., Harvey, D., and Levine, A. J. The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 11623-7, 1993.
  13. Saucedo, L. J., Carstens, B. P., Seavey, S. E., Albee, L. D., 2nd, and Perry, M. E. Regulation of transcriptional activation of mdm2 gene by p53 in response to UV radiation, *Cell Growth Differ.* 9: 119-30, 1998.
  14. Bulavin, D. V., Saito, S., Hollander, M. C., Sakaguchi, K., Anderson, C. W., Appella, E., and Fornace, A. J., Jr. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation, *Embo J.* 18: 6845-54, 1999.
  15. Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., and Paules, R. S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress, *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 1: 5-24, 1999.
  16. Little, J. B. Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells, *Nature.* 218: 1064-5, 1968.
  17. Petrocelli, T. and Slingerland, J. UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35 [In Process Citation], *Oncogene.* 19: 4480-90, 2000.
  18. Wu, L. and Levine, A. J. Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene, *Mol Med.* 3: 441-51, 1997.
  19. Liu, M. and Pelling, J. C. UV-B/A irradiation of mouse keratinocytes results in p53-mediated WAF1/CIP1 expression, *Oncogene.* 10: 1955-60, 1995.
  20. Poon, R. Y. C., Jiang, W., Toyoshima, H., and Hunter, T. Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage, *J Biol Chem.* 271: 13283-91, 1996.

21. Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., and Nevins, J. R. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein, *Cell*. *65*: 1053-61, 1991.
22. Kaelin, W. G., Jr. Functions of the retinoblastoma protein, *Bioessays*. *21*: 950-958, 1999.
23. Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B. O., Dyson, N. J., Harlow, E., and Jacks, T. Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice, *Nat Genet*. *18*: 360-4, 1998.
24. Medrano, E. E., Im, S., Yang, F., and Abdel-Malek, Z. A. Ultraviolet B light induces G1 arrest in human melanocytes by prolonged inhibition of retinoblastoma protein phosphorylation associated with long-term expression of the p21Waf-1/SDI-1/Cip-1 protein, *Cancer Res*. *55*: 4047-52, 1995.
25. Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription [see comments], *Nature*. *391*: 597-601, 1998.
26. Luo, R. X., Postigo, A. A., and Dean, D. C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription, *Cell*. *92*: 463-73, 1998.
27. Harrington, E. A., Bruce, J. L., Harlow, E., and Dyson, N. pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *95*: 11945-50, 1998.
28. Chang, D., Chen, F., Zhang, F., McKay, B. C., and Ljungman, M. Dose-dependent effects of DNA-damaging agents on p53-mediated cell cycle arrest, *Cell Growth Differ*. *10*: 155-62, 1999.
29. Geyer, R. K., Nagasawa, H., Little, J. B., and Maki, C. G. Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest, *Cell Growth Differ*. *11*: 149-56, 2000.
30. Meyer, K. M., Hess, S. M., Tlsty, T. D., and Leadon, S. A. Human mammary epithelial cells exhibit a differential p53-mediated response following exposure to ionizing radiation or UV light, *Oncogene*. *18*: 5795-805, 1999.
31. Haapajarvi, T., Kivinen, L., Heiskanen, A., des Bordes, C., Datto, M. B., Wang, X. F., and Laiho, M. UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin-kinase inhibitor in a p53-independent manner, *Exp Cell Res*. *248*: 272-9, 1999.

32. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. A p53-independent pathway for induction of p21<sup>waf1/cip1</sup> and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts, *Cancer Res.* *57*: 3390-4, 1997.
33. Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R. G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage, *Science.* *288*: 1425-9, 2000.
34. Voorhoeve, P. M., Watson, R. J., Farlie, P. G., Bernards, R., and Lam, E. W. Rapid dephosphorylation of p107 following UV irradiation, *Oncogene.* *18*: 679-88, 1999.
35. van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts, *Embo J.* *14*: 360-7, 1995.
36. Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P. C. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene, *Cell.* *51*: 241-9, 1987.
37. Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair, *Mol Cell.* *2*: 223-32, 1998.
38. Tang, J. Y., Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis, *Mol Cell.* *5*: 737-44, 2000.
39. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *96*: 424-8, 1999.
40. Payne, A. and Chu, G. Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage, *Mutat Res.* *310*: 89-102, 1994.
41. Reardon, J. T., Nichols, A. F., Keeney, S., Smith, C. A., Taylor, J. S., Linn, S., and Sancar, A. Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and Escherichia coli damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T, *J Biol Chem.* *268*: 21301-8, 1993.

42. Tornaletti, S. and Hanawalt, P. C. Effect of DNA lesions on transcription elongation, *Biochimie*. *81*: 139-46, 1999.
43. Bregman, D. B., Halaban, R., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C., and Warren, S. L. UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *93*: 11586-90, 1996.
44. Ratner, J. N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S. L., and Bregman, D. B. Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair, *J Biol Chem*. *273*: 5184-9, 1998.
45. Tornaletti, S., Reines, D., and Hanawalt, P. C. Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA, *J Biol Chem*. *274*: 24124-30, 1999.
46. Robins, P., Jones, C. J., Biggerstaff, M., Lindahl, T., and Wood, R. D. Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA, *Embo J*. *10*: 3913-21, 1991.
47. de Boer, J. and Hoeijmakers, J. H. Nucleotide excision repair and human syndromes, *Carcinogenesis*. *21*: 453-60, 2000.
48. Conaway, R. C. and Conaway, J. W. An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *86*: 7356-60, 1989.
49. Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J. C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II, *Nature*. *368*: 769-72, 1994.
50. Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Chambon, P., and Egly, J. M. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor [see comments], *Science*. *260*: 58-63, 1993.
51. Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M., and Wood, R. D. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors, *Embo J*. *16*: 6559-73, 1997.



52. de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugasawa, K., Weterings, E., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair, *Genes Dev.* 12: 2598-609, 1998.
53. O'Donovan, A., Davies, A. A., Moggs, J. G., West, S. C., and Wood, R. D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair [see comments], *Nature.* 371: 432-5, 1994.
54. Sijbers, A. M., de Laat, W. L., Ariza, R. R., Biggerstaff, M., Wei, Y. F., Moggs, J. G., Carter, K. C., Shell, B. K., Evans, E., de Jong, M. C., Rademakers, S., de Rooij, J., Jaspers, N. G., Hoeijmakers, J. H., and Wood, R. D. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease, *Cell.* 86: 811-22, 1996.
55. Mu, D., Hsu, D. S., and Sancar, A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease, *J Biol Chem.* 271: 8285-94, 1996.
56. Moggs, J. G., Yarema, K. J., Essigmann, J. M., and Wood, R. D. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct, *J Biol Chem.* 271: 7177-86, 1996.
57. de Laat, W. L., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair, *Genes Dev.* 13: 768-85, 1999.
58. Kraemer, K. H. Sunlight and skin cancer: another link revealed [comment], *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 11-4, 1997.
59. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8876-80, 1995.
60. Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts, *J Biol Chem.* 272: 28073-80, 1997.
61. Ford, J. M., Baron, E. L., and Hanawalt, P. C. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation, *Cancer Res.* 58: 599-603, 1998.
62. El-Mahdy, M. A., Hamada, F. M., Wani, M. A., Zhu, Q., and Wani, A. A. p53-degradation by HPV-16 E6 preferentially affects the removal of cyclobutane

- pyrimidine dimers from non-transcribed strand and sensitizes mammary epithelial cells to UV-irradiation, *Mutat Res.* 459: 135-45, 2000.
63. Rey, O., Lee, S., and Park, N. H. Impaired nucleotide excision repair in UV-irradiated human oral keratinocytes immortalized with type 16 human papillomavirus genome, *Oncogene.* 18: 6997-7001, 1999.
64. Zhu, Q., Wani, M. A., El-Mahdy, M., and Wani, A. A. Decreased DNA repair efficiency by loss or disruption of p53 function preferentially affects removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and slow repair sites in transcribed strand, *J Biol Chem.* 275: 11492-7, 2000.
65. Chin, P. L., Momand, J., and Pfeifer, G. P. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation, *Oncogene.* 15: 87-99, 1997.
66. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen [see comments], *Science.* 266: 1376-80, 1994.
67. Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair, *Nature.* 371: 534-7, 1994.
68. Carrier, F., Georgel, P. T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H. U., Antinore, M. J., Gariboldi, M., Myers, T. G., Weinstein, J. N., Pommier, Y., and Fornace, A. J., Jr. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin, *Mol Cell Biol.* 19: 1673-85, 1999.
69. Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., and Vousden, K. H. A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73, *Oncogene.* 19: 4283-9, 2000.
70. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage [see comments], *Nature.* 404: 42-9, 2000.
71. Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. Inhibition of DNA replication factor RPA by p53 [see comments], *Nature.* 365: 79-82, 1993.

72. Abramova, N. A., Russell, J., Botchan, M., and Li, R. Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *94*: 7186-91, 1997.
73. Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M., and Wasylyk, B. Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations, *Embo J*. *15*: 1615-24, 1996.
74. Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., and et al. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity, *Nat Genet*. *10*: 188-95, 1995.
75. Yu, A., Fan, H. Y., Liao, D., Bailey, A. D., and Weiner, A. M. Activation of p53 or loss of the Cockayne syndrome group B repair protein causes metaphase fragility of human U1, U2, and 5S genes, *Mol Cell*. *5*: 801-10, 2000.
76. Allen, R. T., Hunter, W. J., 3rd, and Agrawal, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis, *J Pharmacol Toxicol Methods*. *37*: 215-28, 1997.
77. Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis, *J Pathol*. *142*: 67-77, 1984.
78. Godar, D. E. and Lucas, A. D. Spectral dependence of UV-induced immediate and delayed apoptosis: the role of membrane and DNA damage, *Photochem Photobiol*. *62*: 108-13, 1995.
79. Godar, D. E. Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis, *Photochem Photobiol*. *63*: 825-30, 1996.
80. Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., and Imai, K. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation [In Process Citation], *Embo J*. *19*: 6517-26, 2000.
81. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo, *Oncogene*. *9*: 1799-805, 1994.

82. Bernerd, F., Sarasin, A., and Magnaldo, T. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *96*: 11329-34, 1999.
83. Webster, G. A. and Perkins, N. D. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53, *Mol Cell Biol*. *19*: 3485-95, 1999.
84. Wadgaonkar, R., Phelps, K. M., Haque, Z., Williams, A. J., Silverman, E. S., and Collins, T. CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling, *J Biol Chem*. *274*: 1879-82, 1999.
85. Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C., and Luger, T. A. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light, *J Exp Med*. *172*: 1609-14, 1990.
86. Zhuang, L., Wang, B., Shinder, G. A., Shivji, G. M., Mak, T. W., and Sauder, D. N. TNF receptor p55 plays a pivotal role in murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation, *J Immunol*. *162*: 1440-7, 1999.
87. Ouhtit, A., Gorny, A., Muller, H. K., Hill, L. L., Owen-Schaub, L., and Ananthaswamy, H. N. Loss of fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV carcinogenesis [In Process Citation], *Am J Pathol*. *157*: 1975-81, 2000.
88. Sheikh, M. S., Antinore, M. J., Huang, Y., and Fornace, A. J., Jr. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1, *Oncogene*. *17*: 2555-63, 1998.
89. Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., and Schwarz, T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L, *J Cell Biol*. *140*: 171-82, 1998.
90. Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W., and Mak, T. W. Essential contribution of caspase 3/ CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes, *Genes Dev*. *12*: 806-19, 1998.
91. Kamarajan, P. and Chao, C. C. UV-induced apoptosis in resistant HeLa cells [In Process Citation], *Biosci Rep*. *20*: 99-108, 2000.
92. Frutos, S., Moscat, J., and Diaz-Meco, M. T. Cleavage of zetaPKC but not lambda/iotaPKC by caspase-3 during UV-induced apoptosis, *J Biol Chem*. *274*: 10765-70, 1999.

93. Denning, M. F., Wang, Y., Nickoloff, B. J., and Wrone-Smith, T. Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes, *J Biol Chem.* 273: 29995-30002, 1998.
94. Slee, E. A., Keogh, S. A., and Martin, S. J. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release, *Cell Death Differ.* 7: 556-65, 2000.
95. Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Barsagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., and Davis, R. J. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway, *Science.* 288: 870-4, 2000.
96. Butterfield, L., Storey, B., Maas, L., and Heasley, L. E. c-Jun NH2-terminal kinase regulation of the apoptotic response of small cell lung cancer cells to ultraviolet radiation, *J Biol Chem.* 272: 10110-6, 1997.
97. Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J., and Tan, T. H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation, *J Biol Chem.* 271: 31929-36, 1996.
98. Zanke, B. W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L. A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F. F., and Woodgett, J. R. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat, *Curr Biol.* 6: 606-13, 1996.
99. Brash, D. E. Sunlight and the onset of skin cancer, *Trends Genet.* 13: 410-4, 1997.
100. Williams, J. I. and Cleaver, J. E. Perturbations in simian virus 40 DNA synthesis by ultraviolet light, *Mutat Res.* 52: 301-11, 1978.
101. Edenberg, H. J. Inhibition of simian virus 40 DNA replication by ultraviolet light, *Virology.* 128: 298-309, 1983.
102. Carty, M. P., Hauser, J., Levine, A. S., and Dixon, K. Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts, *Mol Cell Biol.* 13: 533-42, 1993.

103. Thomas, D. C. and Kunkel, T. A. Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts: evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *90*: 7744-8, 1993.
104. Meyn, R. E., Hewitt, R. R., Thomas, L. F., and Humphrey, R. M. Effects of ultraviolet irradiation on the rate and sequence of DNA replication in synchronized Chinese hamster cells, *Biophys J.* *16*: 517-25, 1976.
105. Sagher, D. and Strauss, B. Insertion of nucleotides opposite apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis: uniqueness of adenine nucleotides, *Biochemistry.* *22*: 4518-26, 1983.
106. Tu, Y., Dammann, R., and Pfeifer, G. P. Sequence and time-dependent deamination of cytosine bases in UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in vivo, *J Mol Biol.* *284*: 297-311, 1998.
107. Peng, W. and Shaw, B. R. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions, *Biochemistry.* *35*: 10172-81, 1996.
108. Barak, Y., Cohen-Fix, O., and Livneh, Z. Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis, *J Biol Chem.* *270*: 24174-9, 1995.
109. Tessman, I., Kennedy, M. A., and Liu, S. K. Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers, *J Mol Biol.* *235*: 807-12, 1994.
110. Tessman, I. and Kennedy, M. A. The two-step model of UV mutagenesis reassessed: deamination of cytosine in cyclobutane dimers as the likely source of the mutations associated with photoreactivation, *Mol Gen Genet.* *227*: 144-8, 1991.
111. Goodman, M. F. and Tippin, B. Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair, *Curr Opin Genet Dev.* *10*: 162-8, 2000.
112. Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S., and Prakash, L. Eukaryotic polymerases iota and zeta act sequentially to bypass DNA lesions, *Nature.* *406*: 1015-9, 2000.
113. Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Iwai, S., Hanaoka, F., and Woodgate, R. Misinsertion and bypass of thymine-thymine dimers by human DNA polymerase iota [In Process Citation], *Embo J.* *19*: 5259-66, 2000.

114. Gibbs, P. E., McGregor, W. G., Maher, V. M., Nisson, P., and Lawrence, C. W. 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*: 6876-80, 1998.
115. Gibbs, P. E., Wang, X. D., Li, Z., McManus, T. P., McGregor, W. G., Lawrence, C. W., and Maher, V. M. The function of the human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* REV1 is required for mutagenesis induced by UV light, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *97*: 4186-91, 2000.
116. Minamoto, T., Mai, M., and Ronai, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis, *Carcinogenesis.* *20*: 519-27, 1999.
117. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J., and Ponten, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *88*: 10124-8, 1991.
118. Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E., and et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *90*: 4216-20, 1993.
119. Campbell, C., Quinn, A. G., Ro, Y. S., Angus, B., and Rees, J. L. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin, *J Invest Dermatol.* *100*: 746-8, 1993.
120. Jonason, A. S., Kunala, S., Price, G. J., Restifo, R. J., Spinelli, H. M., Persing, J. A., Leffell, D. J., Tarone, R. E., and Brash, D. E. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin [see comments], *Proc Natl Acad Sci U S A.* *93*: 14025-9, 1996.
121. Ren, Z. P., Hedrum, A., Ponten, F., Nister, M., Ahmadian, A., Lundeberg, J., Uhlen, M., and Ponten, J. Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded non-neoplastic keratinocytes, *Oncogene.* *12*: 765-73, 1996.
122. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., and Brash, D. E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer [see comments], *Nature.* *372*: 773-6, 1994.

123. Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S., and Leffell, D. J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion, *J Invest Dermatol Symp Proc. 1*: 136-42, 1996.
124. Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome, *Science. 272*: 1668-71, 1996.
125. Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Unden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., and Bale, A. E. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome, *Cell. 85*: 841-51, 1996.
126. Soufir, N., Mol#s, J. P., Vilmer, C., Moch, C., Verola, O., Rivet, J., Tesniere, A., Dubertret, L., and Basset-Seguin, N. P16 UV mutations in human skin epithelial tumors, *Oncogene. 18*: 5477-5481, 1999.
127. Pierceall, W. E., Goldberg, L. H., Tainsky, M. A., Mukhopadhyay, T., and Ananthaswamy, H. N. Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers, *Mol Carcinog. 4*: 196-202, 1991.
128. van der Schroeff, J. G., Evers, L. M., Boot, A. J., and Bos, J. L. Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin, *J Invest Dermatol. 94*: 423-5, 1990.
129. (IARC), I. A. f. R. o. C. Papillomaviruses. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, . *Vol 64*: , 1995.
130. Syrjanen, S. M. and Syrjanen, K. J. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation, *Ann Med. 31*: 175-87, 1999.
131. Munoz, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence, *J Clin Virol. 19*: 1-5, 2000.
132. Harwood, C. A., McGregor, J. M., Proby, C. M., and Breuer, J. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer, *J Clin Pathol. 52*: 249-53, 1999.



133. Cooper, K. D., Androphy, E. J., Lowy, D., and Katz, S. I. Antigen presentation and T-cell activation in epidermodysplasia verruciformis, *J Invest Dermatol.* *94*: 769-76, 1990.
134. Birkeland, S. A., Storm, H. H., Lamm, L. U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L., and et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986, *Int J Cancer.* *60*: 183-9, 1995.
135. Krutmann, J. and Morita, A. Mechanisms of ultraviolet (UV) B and UVA phototherapy, *J Investig Dermatol Symp Proc.* *4*: 70-2, 1999.
136. Studniberg, H. M. and Weller, P. PUVA, UVB, psoriasis, and nonmelanoma skin cancer, *J Am Acad Dermatol.* *29*: 1013-22, 1993.
137. Harwood, C. A., Spink, P. J., Suretheran, T., Leigh, I. M., Hawke, J. L., Proby, C. M., Breuer, J., and McGregor, J. M. Detection of human papillomavirus DNA in PUVA-associated non-melanoma skin cancers, *J Invest Dermatol.* *111*: 123-7, 1998.
138. Maurer, T. A., Christian, K. V., Kerschmann, R. L., Berzin, B., Palefsky, J. M., Payne, D., Tyring, S. K., and Berger, T. G. Cutaneous squamous cell carcinoma in human immunodeficiency virus-infected patients. A study of epidemiologic risk factors, human papillomavirus, and p53 expression, *Arch Dermatol.* *133*: 577-83, 1997.
139. Wieland, U., Ritzkowsky, A., Stoltidis, M., Weissenborn, S., Stark, S., Ploner, M., Majewski, S., Jablonska, S., Pfister, H. J., and Fuchs, P. G. Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol.* *115*: 124-8, 2000.
140. Harwood, C. A., Suretheran, T., McGregor, J. M., Spink, P. J., Leigh, I. M., Breuer, J., and Proby, C. M. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals, *J Med Virol.* *61*: 289-97, 2000.
141. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell.* *63*: 1129-36, 1990.
142. Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53, *Science.* *248*: 76-9, 1990.

143. Liu, X., Han, S., Baluda, M. A., and Park, N. H. HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes, *Oncogene*. *14*: 2347-53, 1997.
144. Havre, P. A., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K. R., and Glazer, P. M. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells, *Cancer Res*. *55*: 4420-4, 1995.
145. White, A. E., Livanos, E. M., and Tlsty, T. D. Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins, *Genes Dev*. *8*: 666-77, 1994.
146. Thompson, D. A., Belinsky, G., Chang, T. H., Jones, D. L., Schlegel, R., and Munger, K. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints, *Oncogene*. *15*: 3025-35, 1997.
147. Thomas, J. T. and Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint, *J Virol*. *72*: 1131-7, 1998.
148. Schwartz, J. L. and Russell, K. J. The effect of functional inactivation of TP53 by HPV-E6 transformation on the induction of chromosome aberrations by gamma rays in human tumor cells, *Radiat Res*. *151*: 385-90, 1999.
149. Song, S., Gulliver, G. A., and Lambert, P. F. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes abrogate radiation- induced DNA damage responses in vivo through p53-dependent and p53- independent pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *95*: 2290-5, 1998.
150. Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination, *Oncogene*. *14*: 1847-57, 1997.
151. Jackson, S. and Storey, A. E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage, *Oncogene*. *19*: 592-8, 2000.
152. Yu, Y., Li, C. Y., and Little, J. B. Abrogation of p53 function by HPV16 E6 gene delays apoptosis and enhances mutagenesis but does not alter radiosensitivity in TK6 human lymphoblast cells, *Oncogene*. *14*: 1661-7, 1997.
153. Magal, S. S., Jackman, A., Pei, X. F., Schlegel, R., and Sherman, L. Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins, *Int J Cancer*. *75*: 96-104, 1998.

154. Alfandari, J., Shnitman Magal, S., Jackman, A., Schlegel, R., Gonen, P., and Sherman, L. HPV16 E6 oncoprotein inhibits apoptosis induced during serum-calcium differentiation of foreskin human keratinocytes, *Virology*. 257: 383-96, 1999.
155. Thomas, M. and Banks, L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types, *J Gen Virol*. 80: 1513-7, 1999.
156. Thomas, M. and Banks, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6, *Oncogene*. 17: 2943-54, 1998.
157. Duerksen-Hughes, P. J., Yang, J., and Schwartz, S. B. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells, *Virology*. 264: 55-65, 1999.
158. Kiyono, T., Hiraiwa, A., Fujita, M., Hayashi, Y., Akiyama, T., and Ishibashi, M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94: 11612-6, 1997.
159. Gao, Q., Srinivasan, S., Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation, *Mol Cell Biol*. 19: 733-44, 1999.
160. Glaunsinger, B. A., Lee, S. S., Thomas, M., Banks, L., and Javier, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins [In Process Citation], *Oncogene*. 19: 5270-80, 2000.
161. Fanning, A. S. and Anderson, J. M. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane, *J Clin Invest*. 103: 767-72, 1999.
162. Gross-Mesilaty, S., Reinstein, E., Bercovich, B., Tobias, K. E., Schwartz, A. L., Kahana, C., and Ciechanover, A. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 8058-63, 1998.
163. Pietenpol, J. A., Holt, J. T., Stein, R. W., and Moses, H. L. Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 3758-62, 1990.
164. Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V., and Androphy, E. J. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein, *Science*. 269: 529-31, 1995.

165. Tong, X., Salgia, R., Li, J. L., Griffin, J. D., and Howley, P. M. The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase, *J Biol Chem.* 272: 33373-6, 1997.
166. Shiga, T., Shirasawa, H., Shimizu, K., Dezawa, M., Masuda, Y., and Simizu, B. Normal human fibroblasts immortalized by introduction of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6-E7 genes, *Microbiol Immunol.* 41: 313-9, 1997.
167. Choo, C. K., Ling, M. T., Chan, K. W., Tsao, S. W., Zheng, Z., Zhang, D., Chan, L. C., and Wong, Y. C. Immortalization of human prostate epithelial cells by HPV 16 E6/E7 open reading frames, *Prostate.* 40: 150-8, 1999.
168. Steenbergen, R. D., Walboomers, J. M., Meijer, C. J., van der Raaij-Helmer, E. M., Parker, J. N., Chow, L. T., Broker, T. R., and Snijders, P. J. Transition of human papillomavirus type 16 and 18 transfected human foreskin keratinocytes towards immortality: activation of telomerase and allele losses at 3p, 10p, 11q and/or 18q, *Oncogene.* 13: 1249-57, 1996.
169. Lochmuller, H., Johns, T., and Shoubridge, E. A. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts, *Exp Cell Res.* 248: 186-93, 1999.
170. Stoppler, H., Hartmann, D. P., Sherman, L., and Schlegel, R. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length, *J Biol Chem.* 272: 13332-7, 1997.
171. Klingelhutz, A. J., Foster, S. A., and McDougall, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16, *Nature.* 380: 79-82, 1996.
172. Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway, *Cancer Res.* 56: 4620-4, 1996.
173. Berezutskaya, E. and Bagchi, S. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome, *J Biol Chem.* 272: 30135-40, 1997.
174. Phelps, W. C., Bagchi, S., Barnes, J. A., Raychaudhuri, P., Kraus, V., Munger, K., Howley, P. M., and Nevins, J. R. Analysis of trans activation by human papillomavirus type 16 E7 and adenovirus 12S E1A suggests a common mechanism, *J Virol.* 65: 6922-30, 1991.

175. Berezutskaya, E., Yu, B., Morozov, A., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein, *Cell Growth Differ.* *8*: 1277-86, 1997.
176. Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D. A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein, *Genes Dev.* *11*: 2090-100, 1997.
177. Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., and Jansen-Durr, P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Oncogene.* *13*: 2323-30, 1996.
178. Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L., and McCance, D. J. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors, *Embo J.* *15*: 1950-60, 1996.
179. Kyo, S., Klumpp, D. J., Inoue, M., Kanaya, T., and Laimins, L. A. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells, *J Gen Virol.* *78*: 401-11, 1997.
180. Massimi, P., Pim, D., and Banks, L. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity, *J Gen Virol.* *78*: 2607-13, 1997.
181. Phillips, A. C. and Vousden, K. H. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP, *J Gen Virol.* *78*: 905-9, 1997.
182. Rey, O., Lee, S., Baluda, M. A., Swee, J., Ackerson, B., Chiu, R., and Park, N. H. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 interacts with F-actin in vitro and in vivo, *Virology.* *268*: 372-81, 2000.
183. Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., and Stanley, M. Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *88*: 11217-21, 1991.
184. Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth, *Embo J.* *18*: 2449-58, 1999.

185. Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., and Jansen-Durr, P. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1291-6, 1999.
186. Mazurek, S., Boschek, C. B., and Eigenbrodt, E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy, *J Bioenerg Biomembr.* 29: 315-30, 1997.
187. Park, J. S., Boyer, S., Mitchell, K., Gilfor, D., Birrer, M., Darlington, G., El Deiry, W., Firestone, G. L., Munger, K., Band, V., Fisher, P. B., and Dent, P. Expression of human papilloma virus E7 protein causes apoptosis and inhibits DNA synthesis in primary hepatocytes via increased expression of p21(Cip-1/WAF1/MDA6), *J Biol Chem.* 275: 18-28, 2000.
188. Liu, Y., McKalip, A., and Herman, B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation, *J Cell Biochem.* 78: 334-49, 2000.
189. Stoppler, H., Stoppler, M. C., Johnson, E., Simbulan-Rosenthal, C. M., Smulson, M. E., Iyer, S., Rosenthal, D. S., and Schlegel, R. The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis, *Oncogene.* 17: 1207-14, 1998.
190. Iglesias, M., Yen, K., Gaiotti, D., Hildesheim, A., Stoler, M. H., and Woodworth, C. D. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha, *Oncogene.* 17: 1195-205, 1998.
191. Jones, D. L., Thompson, D. A., and Munger, K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis, *Virology.* 239: 97-107, 1997.
192. Park, J. S., Kim, E. J., Kwon, H. J., Hwang, E. S., Namkoong, S. E., and Um, S. J. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis, *J Biol Chem.* 275: 6764-9, 2000.
193. Perea, S. E., Massimi, P., and Banks, L. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1, *Int J Mol Med.* 5: 661-6, 2000.

194. Barnard, P. and McMillan, N. A. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha, *Virology*. 259: 305-13, 1999.
195. Chien, W. M., Parker, J. N., Schmidt-Grimminger, D. C., Broker, T. R., and Chow, L. T. Casein kinase II phosphorylation of the human papillomavirus-18 E7 protein is critical for promoting S-phase entry [In Process Citation], *Cell Growth Differ.* 11: 425-35, 2000.
196. Gao, Q., Kumar, A., Srinivasan, S., Singh, L., Mukai, H., Ono, Y., Wazer, D. E., and Band, V. PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein, *J Biol Chem.* 275: 14824-30, 2000.
197. Halbert, C. L., Demers, G. W., and Galloway, D. A. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells, *J Virol.* 66: 2125-34, 1992.
198. Drouin, R., Therrien, J.-P., Angers, M., and Ouellet, S. *Methods in molecular biology, DNA-protein interaction protocols*, Tom Moss, Humana Press, 2e édition, 2000.
199. Rozek, D. and Pfeifer, G. P. In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response, *Mol Cell Biol.* 13: 5490-9, 1993.
200. Tornaletti, S., Rozek, D., and Pfeifer, G. P. The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer [published erratum appears in *Oncogene* 1993 Dec;8(12):3469], *Oncogene.* 8: 2051-7, 1993.
201. Brown, J. P., Wei, W., and Sedivy, J. M. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts, *Science.* 277: 831-4, 1997.
202. Seavey, S. E., Holubar, M., Saucedo, L. J., and Perry, M. E. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF), *J Virol.* 73: 7590-8, 1999.
203. Jones, D. L., Thompson, D. A., Suh-Burgmann, E., Grace, M., and Munger, K. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53- dependent cellular DNA damage response pathway, *Virology.* 258: 406-14, 1999.
204. Pfeifer, G. P. and Tornaletti, S. Footprinting with UV irradiation and LMPCR, *Methods.* 11: 189-96, 1997.

205. Gordon, L. K. and Haseltine, W. A. Quantitation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in double- and single-stranded DNA fragments of defined sequence, *Radiat Res.* 89: 99-112, 1982.
206. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts, *Cancer Res.* 57: 3390-4, 1997.
207. Vreeswijk, M. P., Westland, B. E., Hess, M. T., Naegeli, H., Vrieling, H., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. Impairment of nucleotide excision repair by apoptosis in UV-irradiated mouse cells, *Cancer Res.* 58: 1978-85, 1998.
208. Robles, S. J., Buehler, P. W., Negrusz, A., and Adami, G. R. Permanent cell cycle arrest in asynchronously proliferating normal human fibroblasts treated with doxorubicin or etoposide but not camptothecin, *Biochem Pharmacol.* 58: 675-85, 1999.
209. Robles, S. J. and Adami, G. R. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts, *Oncogene.* 16: 1113-23, 1998.
210. DeSimone, J. N., Dolezalova, H., Redpath, J. L., and Stanbridge, E. J. Prolonged cell cycle arrest in irradiated human diploid skin fibroblasts: the role of nutrient deprivation, *Radiat Res.* 153: 131-43, 2000.
211. Sands, A. T., Suraokar, M. B., Sanchez, A., Marth, J. E., Donehower, L. A., and Bradley, A. p53 deficiency does not affect the accumulation of point mutations in a transgene target, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 8517-21, 1995.
212. Ishizaki, K., Nishizawa, K., Mimaki, S., and Aizawa, S. 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: 43-9, 1996.
213. Courtemanche, C. and Anderson, A. 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 [In Process Citation], *Oncogene.* 18: 4672-80, 1999.
214. Yuan, J., Yeasky, T. M., Havre, P. A., and Glazer, P. M. Induction of p53 in mouse cells decreases mutagenesis by UV radiation, *Carcinogenesis.* 16: 2295-300, 1995.



215. Lambert, B., Andersson, B., He, S. M., Marcus, S., and Steen, A. M. Molecular analysis of mutation in the human gene for hypoxanthine phosphoribosyltransferase, *Mol Genet Med.* 2: 161-88, 1992.
216. Ljungman, M. and Zhang, F. Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis, *Oncogene.* 13: 823-31, 1996.
217. Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A. J., and McKay, B. C. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response, *Oncogene.* 18: 583-92, 1999.
218. McKay, B. C. and Ljungman, M. Role for p53 in the recovery of transcription and protection against apoptosis induced by ultraviolet light, *Neoplasia.* 1: 276-84, 1999.
219. Huang, J., Logsdon, N., Schmieg, F. I., and Simmons, D. T. p53-mediated transcription induces resistance of DNA to UV inactivation, *Oncogene.* 17: 401-11, 1998.
220. Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Waldman, T., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. p53 tagged sites from human genomic DNA, *Hum Mol Genet.* 3: 1537-42, 1994.
221. Scherer, S. J., Maier, S. M., Seifert, M., Hanselmann, R. G., Zang, K. D., Muller-Hermelink, H. K., Angel, P., Welter, C., and Scharl, M. p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene hMSH2 in response to UV [In Process Citation], *J Biol Chem.* 275: 37469-73, 2000.
222. Buschmann, T., Adler, V., Matusevich, E., Fuchs, S. Y., and Ronai, Z. p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation, *Cancer Res.* 60: 896-900, 2000.
223. Wadgaonkar, R., Phelps, K. M., Haque, Z., Williams, A. J., Silverman, E. S., and Collins, T. CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling, *J Biol Chem.* 274: 1879-82, 1999.
224. Budhram-Mahadeo, V., Morris, P. J., Smith, M. D., Midgley, C. A., Boxer, L. M., and Latchman, D. S. p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor, *J Biol Chem.* 274: 15237-44, 1999.

225. Yun, J., Chae, H. D., Choy, H. E., Chung, J., Yoo, H. S., Han, M. H., and Shin, D. Y. p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor, *J Biol Chem.* 274: 29677-82, 1999.
226. Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L., and Oren, M. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene, *Oncogene.* 8: 3411-6, 1993.
227. Deffie, A., Wu, H., Reinke, V., and Lozano, G. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription, *Mol Cell Biol.* 13: 3415-23, 1993.
228. Brehm, A. and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein meets chromatin, *Trends Biochem Sci.* 24: 142-5, 1999.
229. Herrera, R. E., Chen, F., and Weinberg, R. A. Increased histone H1 phosphorylation and relaxed chromatin structure in Rb-deficient fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 11510-5, 1996.
230. Luo, R. X., Postigo, A. A., and Dean, D. C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription, *Cell.* 92: 463-73, 1998.
231. Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase [see comments], *Nature.* 391: 601-5, 1998.
232. Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription [see comments], *Nature.* 391: 597-601, 1998.
233. Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, and Goff, S. P. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins, *Mol Cell Biol.* 16: 1576-83, 1996.
234. Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., and Goff, S. P. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest, *Cell.* 79: 119-30, 1994.
235. Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins, *Genes Dev.* 14: 3065-3073, 2000.
236. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H. p53

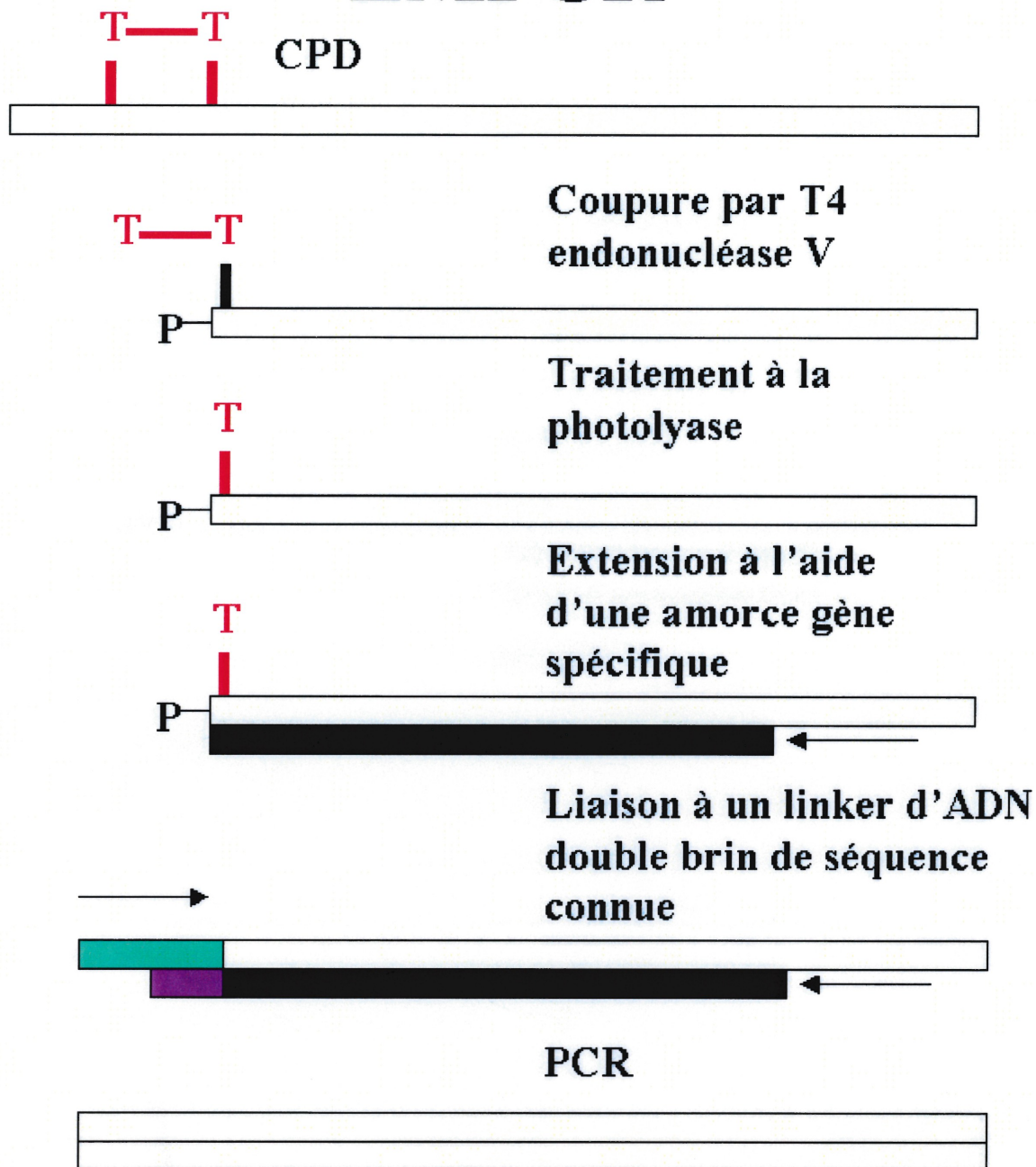
- activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs, *J Exp Med.* 188: 2033-45, 1998.
237. van Oosten, M., Rebel, H., Friedberg, E. C., van Steeg, H., van Der Horst, G. T., van Kranen, H. J., Westerman, A., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H., and de Gruijl, F. R. Differential role of transcription-coupled repair in UVB-induced G2 arrest and apoptosis in mouse epidermis [In Process Citation], *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 11268-73, 2000.
238. Conforti, G., Nardo, T., D'Incalci, M., and Stefanini, M. Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation, *Oncogene.* 19: 2714-20, 2000.
239. Glickman, B. W., Schaaper, R. M., Haseltine, W. A., Dunn, R. L., and Brash, D. E. The C-C (6-4) UV photoproduct is mutagenic in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 6945-9, 1986.
240. LeClerc, J. E., Borden, A., and Lawrence, C. W. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 9685-9, 1991.
241. Treiber, D. K., Chen, Z., and Essigmann, J. M. An ultraviolet light-damaged DNA recognition protein absent in xeroderma pigmentosum group E cells binds selectively to pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, *Nucleic Acids Res.* 20: 5805-10, 1992.
242. Massimi, P. and Banks, L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins, *Virology.* 227: 255-9, 1997.
243. Chen, C. and Nirunskiri, W. Decreased expression of glutathione S-transferase M1 in HPV16-transfected human cervical keratinocytes in culture, *Carcinogenesis.* 20: 699-703, 1999.
244. Santin, A. D., Hermonat, P. L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Pecorelli, S., and Parham, G. P. Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma, *Cancer.* 83: 2346-52, 1998.
245. Lehman, A. R., Kirk-Bell, S., Arlett, C. F., Paterson, M. C., Lohman, P. H., de Weerd-Kastelein, E. A., and Bootsma, D. Xeroderma pigmentosum cells with normal

- levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72: 219-23, 1975.
246. Johnson, R. E., Kondratyck, C. M., Prakash, S., and Prakash, L. hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum [see comments], *Science.* 285: 263-5, 1999.
247. Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., and Hanaoka, F. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta [see comments], *Nature.* 399: 700-4, 1999.
248. Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S., and Hanaoka, F. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity, *Embo J.* 18: 3491-501, 1999.
249. Yu, S. L., Johnson, R. E., Prakash, S., and Prakash, L. Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts [In Process Citation], *Mol Cell Biol.* 21: 185-8, 2001.
250. Johnson, R. E., Washington, M. T., Prakash, S., and Prakash, L. Fidelity of human DNA polymerase eta, *J Biol Chem.* 275: 7447-50, 2000.
251. McGregor, W. G., Wei, D., Maher, V. M., and McCormick, J. J. Abnormal, error-prone bypass of photoproducts by xeroderma pigmentosum variant cell extracts results in extreme strand bias for the kinds of mutations induced by UV light, *Mol Cell Biol.* 19: 147-54, 1999.
252. Wang, Y. C., Maher, V. M., Mitchell, D. L., and McCormick, J. J. Evidence from mutation spectra that the UV hypermutability of xeroderma pigmentosum variant cells reflects abnormal, error-prone replication on a template containing photoproducts, *Mol Cell Biol.* 13: 4276-83, 1993.
253. Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., and Tang, M. S. PCR-based approaches to adduct analysis, *Toxicol Lett.* 102-103: 447-51, 1998.
254. Zhuang, J. C., Wright, T. L., deRojas-Walker, T., Tannenbaum, S. R., and Wogan, G. N. Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lymphoblastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*, *Environ Mol Mutagen.* 35: 39-47., 2000.

255. Miyake, H., Suzuki, T., Hirai, H., and Yoshida, M. Trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 enhances mutation frequency of the cellular genome, *Virology*. 253: 155-61., 1999.
256. Kimura, H., Takada, T., Shingu, Y., Kato, Y., Iyehara-Ogawa, H., and Terado, T. Neocarzinostatin-induced mutations at the hprt locus in exponentially growing CHO cells, compared with spontaneous mutations, *Carcinogenesis*. 19: 791-6., 1998.
257. Brisebois, J. J. and DuBow, M. S. Selection for spontaneous null mutations in a chromosomally-integrated HSV-1 thymidine kinase gene yields deletions and a mutation caused by intragenic illegitimate recombination, *Mutat Res*. 287: 191-205., 1993.

**Annexe I :**  
**Schéma du LMPCR**

# LMPCR



**Faire migrer sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante, électrotransférer sur une membrane de nylon, hybridation, visualisation.**

**Annexe II :**  
**Article**



# 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

Jean-Philippe Therrien\*, Régen Drouin\*, Caroline Baril<sup>†</sup>, and Elliot A. Drobetsky<sup>1\*†</sup>

\*Division of Pathology, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Laval University and Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire, Research Centre, Pavillon St-François d'Assise, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, PQ, Canada G1L 3L5; and <sup>†</sup>Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, PQ, Canada H1T 2M4

Edited by Richard B. Setlow, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY, and approved October 13, 1999 (received for review August 18, 1999)

**After exposure to DNA-damaging agents, the p53 tumor suppressor protects against neoplastic transformation by inducing growth arrest and apoptosis. A series of investigations has also demonstrated that, in UV-exposed cells, p53 regulates the removal of DNA photoproducts from the genome overall (global nucleotide excision repair), but does not participate in an overlapping pathway that removes damage specifically from the transcribed strand of active genes (transcription-coupled nucleotide excision repair). Here, the highly sensitive ligation-mediated PCR was employed to quantify, at nucleotide resolution, the repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in genetically p53-deficient Li-Fraumeni skin fibroblasts, as well as in human lung fibroblasts expressing the human papillomavirus (HPV) E6 oncoprotein that functionally inactivates p53. Lung fibroblasts expressing the HPV E7 gene product, which similarly inactivates the retinoblastoma tumor-suppressor protein (pRb), were also investigated. pRb acts downstream of p53 to mediate G<sub>1</sub> arrest, but has no demonstrated role in DNA repair. Relative to normal cells, HPV E6-expressing lung fibroblasts and Li-Fraumeni skin fibroblasts each manifested defective CPD repair along both the transcribed and nontranscribed strands of the p53 and/or *c-jun* loci. HPV E7-expressing lung fibroblasts also exhibited reduced CPD removal, but only along the nontranscribed strand. Our results provide striking evidence that transcription-coupled repair, in addition to global repair, are p53-dependent in UV-exposed human fibroblasts. Moreover, the observed DNA-repair defect in HPV E7-expressing cells reveals a function for this oncoprotein in HPV-mediated carcinogenesis, and may suggest a role for pRb in global nucleotide excision repair.**

Inactivation of the p53 tumor-suppressor protein is a key event in carcinogenesis, since more than 50% of all human malignancies manifest p53 gene mutations (1), and individuals afflicted with Li-Fraumeni syndrome (LFS; a disease characterized by germ-line p53 alterations) are strongly predisposed to various cancers (2). In addition, the neoplastic potential of certain oncogenic viruses can be attributed, at least in part, to interactions of their associated viral gene products with p53. For example, the capacity of human papillomavirus (HPV) to promote epithelial malignancies is exerted largely through intracellular expression of the HPV E6 oncoprotein, which engenders functional inactivation of p53 by means of binding and accelerated proteasomal degradation (3, 4).

After exposure of cells to DNA-damaging agents, p53 triggers multiple protective pathways, i.e., through transactivation of genes and through protein-protein interactions, that regulate growth arrest and apoptosis (5, 6). Moreover, different lines of evidence (see below) demonstrate that p53 participates directly in nucleotide excision repair (NER), a major pathway for the removal of carcinogenic DNA damage inflicted by diverse mutagenic agents. The physiological importance of NER is

exemplified by the autosomal recessive disease xeroderma pigmentosum (XP), in which affected individuals manifest defective removal of UV-induced DNA photoproducts and a concomitant 2000-fold increase in the frequency of sunlight-induced skin cancers (7). Two distinct, but overlapping, NER pathways have been identified: one for the removal of damage from the genome overall [global NER (GNER)], and another, which is mechanistically linked to transcription, that brings about rapid, preferential repair of adducts specifically on the transcribed strand (TS) of active genes [transcription-coupled NER (TCNER)] (8).

Early indications that p53-deficient cells might be defective in NER (9) led to studies revealing a potential role in this process for the p53 downstream effectors gadd45 (10) and p21waf1 (11), which sequester the DNA polymerase processivity factor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) that is essential for NER (12). It was also shown that p53 binds RP-A (replication protein-A) (13), which participates in the initiation of the NER process (14). Moreover, Wang *et al.* (15) demonstrated that p53 interacts (*i*) with the XP-B and XP-D gene products, i.e., components of the TFIIH basal transcription/repair factor that participates in GNER as well as TCNER, and (*ii*) with the CS-B gene product (transcription-repair coupling factor) that is necessary for TCNER only. While a role for p53 in both GNER and TCNER was therefore indicated, this latter study could demonstrate an overall NER defect in p53-deficient cells only by employing a gene-specific DNA-repair assay that does not differentiate between GNER and TCNER. A series of succeeding investigations employing a strand-specific DNA-repair assay at the active dihydrofolate reductase locus in p53-deficient human skin fibroblasts, i.e., either HPV E6-expressing (16) or derived from LFS patients (17, 18) revealed strong evidence that p53 plays an essential role in GNER after treatment with UV, but does not modulate TCNER. In support of this conclusion, it was subsequently demonstrated that up-regulation of the p48 (XP complementation group E) gene product is p53-dependent and that human XP-E fibroblasts mutated at the p48 locus are deficient in GNER, but not in TCNER (19).

In a manner analogous to HPV E6, intracellular expression of the HPV E7 oncogene product plays a major role in the molecular development of HPV-positive malignancies by bind-

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: LFS, Li-Fraumeni syndrome; HPV, human papillomavirus; NER, nucleotide excision repair; XP, xeroderma pigmentosum; GNER, global NER; TS, transcribed strand; TCNER, transcription-coupled NER; pRb, retinoblastoma protein; LMP/PCR, ligation-mediated PCR; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; NTS, nontranscribed strand.

\*To whom reprint requests should be addressed. E-mail: [REDACTED]

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

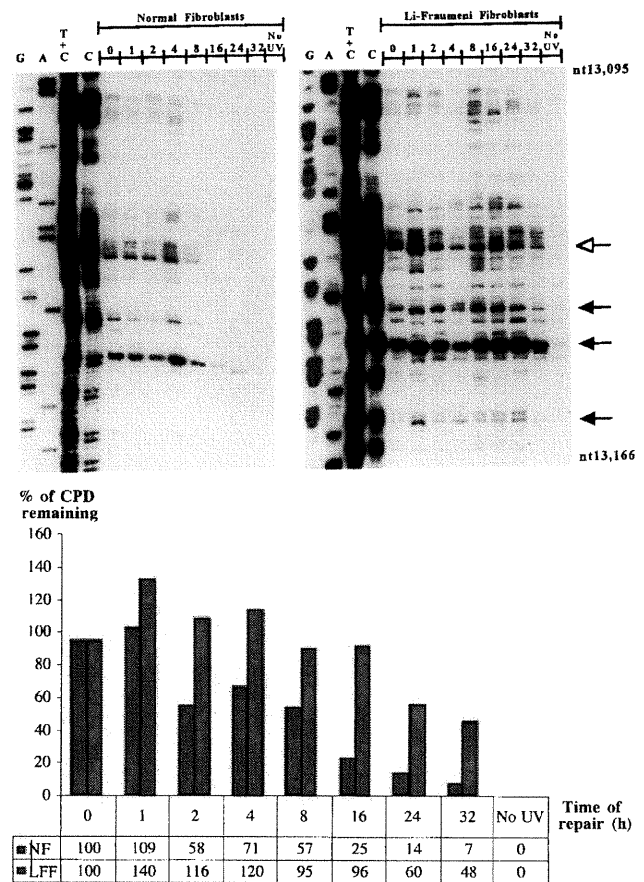
ing and functionally inactivating (also through accelerated proteasomal degradation) the retinoblastoma tumor suppressor (pRb) (20). This latter protein, which is frequently altered in a wide variety of sporadic tumor types (21), acts downstream of p53, as well as through p53-independent pathways, to regulate G<sub>1</sub> arrest in cells exposed to DNA-damaging agents (22). Preliminary investigations suggesting a role for pRb in DNA repair (e.g., ref. 23) have not been adequately substantiated or refuted to date. However, it should be noted that HPV E7 interacts with a considerable number of proteins aside from pRb, some of which may conceivably be involved in DNA repair (see *Discussion*).

Here, we have employed the ligation-mediated PCR (LMPCR) to investigate, at nucleotide resolution, the repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in genetically p53-deficient LFS human skin fibroblasts, as well as in primary human lung fibroblasts expressing either the HPV E6 or HPV E7 oncoprotein. Introduction of these oncoproteins into cultured cells has been widely used as a model to dissect the phenotypic consequences of p53 or pRb inactivation, respectively. Our primary goal was to reassess the function of p53 in NER because, notwithstanding the investigations cited above showing p53 dependence for GNER but not TCNER, other studies have reported data consistent with a role for this protein in both NER pathways (reviewed in ref. 24). We were also interested in addressing the possibility that the HPV E7 oncoprotein modulates DNA repair in human cells. Our data provide compelling evidence that p53 participates in TCNER as well as GNER, in disagreement with the prevailing notion that this protein regulates only GNER. In addition, we show that HPV E7-expressing fibroblasts are deficient in GNER, but not TCNER, revealing a role for this oncoprotein in the pathogenesis of HPV-positive tumors.

## Materials and Methods

**Cell Strains.** Normal human foreskin fibroblasts, and the spontaneously immortalized (i.e., post-crisis; approximately 200 population doublings) LFS skin fibroblast strain LF041 (a gift of M. Tainsky, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS plus antibiotics. LF041 cells have lost one p53 allele and carry a frameshift mutation at codon 184 in the remaining copy. The normal primary diploid lung fibroblast strain LF-1 (no relation with Li-Fraumeni; kindly provided by John Sedivy, Brown University, Providence, RI) and its derivatives were grown in Ham's F-10 medium containing 15% FBS plus antibiotics. Low-passage LF-1 cells were infected as previously described (25) with a replication-defective retrovirus (LXSN) expressing G418 resistance, and the HPV E6, HPV E7, or both oncoproteins derived from the high-risk HPV type 16. Briefly, culture medium was harvested from a confluent LXSN murine producer cell line (obtained from American Type Culture Collection), and passed through a 0.22- $\mu$ m filter. Fibroblasts at 50–70% confluence on 60-mm dishes were incubated for 2 hr with 1 ml of this viral supernatant containing 8  $\mu$ g/ml Polybrene, followed by aspiration of the viral supernatant and addition of normal growth medium. After a 2-day phenotypic expression period, fibroblasts expressing the empty vector, or ones expressing HPV E6 and/or HPV E7, were selected in growth medium containing 200 mg/ml G418 (GIBCO/BRL).

**UV Irradiation.** Cells were grown to confluence on 150-mm Petri dishes and irradiated with UVB (290–320 nm) at room temperature after replacing the medium with 0.9% NaCl. The UVB source consisted of two tubes (FS20T12/UVB/BP, Phillips) delivering a fluence of 7.45 J/m<sup>2</sup>-s that was filtered through a screen of cellulose acetate (Kodacel TA-407, clear 0.015-inch; Eastman Kodak). All cells were irradiated with 1 kJ/m<sup>2</sup> of UVB and allowed to repair for various times in freshly prepared



**Fig. 1.** Repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along the NTS of the human p53 tumor-suppressor gene (exon 5, nucleotides 13,095–13,166) in normal human skin fibroblasts (*Left*) and LF041 skin fibroblasts (*Right*). The first four lanes from the left on each autoradiogram show LMPCR of DNA treated in standard Maxam–Gilbert cleavage reactions. The following eight lanes show LMPCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells that have undergone repair for the indicated times (hr). The far right lane shows LMPCR of unirradiated DNA followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. The shaded arrows indicate dipyrimidine sites quantified with a Fuji BAS 1000 phosphorimager, equipped with the MacBAS v2.5 program. The open arrow indicates a representative dipyrimidine site (i.e., CC site indicated in bold, located within 5'-CCCCG-3', codon 151–152) for which the relative repair rate has been graphically illustrated below the autoradiograms. NF, normal fibroblasts; LFF, LF fibroblasts.

culture medium. Cells were harvested, nuclear DNA was extracted and quantified, and the global CPD frequency was determined in T4-endonuclease V-digested total genomic DNA by alkaline gel electrophoresis (26, 27).

**LMPCR.** The LMPCR protocol has been described previously in detail (26, 28). Briefly, after irradiation and incubation of cells, genomic DNA was isolated and digested with T4 endonuclease V to efficiently incise the DNA at CPD sites. The resulting 5'-pyrimidine overhangs were then removed by photoreactivation, using *Escherichia coli* photolyase to generate ligatable ends. A gene-specific oligonucleotide was annealed downstream of the break site, and the set of genomic cleavage products was extended using Sequenase (United States Biochemical). An asymmetric double-stranded linker was ligated to the phosphate groups at the fragment termini, providing a common sequence on the 5' end of all fragments. The longer oligonucleotide of this same linker, in conjunction with another gene-specific primer,

**Table 1. Relative delay in nucleotide excision repair for LF041 skin fibroblasts, and for lung fibroblasts expressing the HPV E6, HPV E7, or both oncoproteins**

Fibroblast type	Strand	Average 50% repair time, hr*	Fold delay in repair	No. and location of sites analyzed
Normal skin	TS	3 (1, 8)	1	16 (exon 1 <i>c-jun</i> ); 5 (exon 7 p53)
	NTS	10 (4, 16)	1	10 (exon 5 p53)
LF041 skin	TS	14 (4, 28)	6.1 ± 2.8	16 (exon 1 <i>c-jun</i> ); 5 (exon 7 p53)
	NTS	28 (16, 32)	3.1 ± 1.1	10 (exon 5 p53)
LXSN lung	TS	3.5 (1, 8)	1	9 ( <i>c-jun</i> promoter); 4 (exon 7 p53)
	NTS	6 (2, 16)	1	7 (exon 5 p53); 9 (exon 8 p53)
E6 lung	TS	12 (6, 24)	3.8 ± 1.4	9 ( <i>c-jun</i> promoter); 4 (exon 7 p53)
	NTS	18 (8, 24)	4.1 ± 1.3	7 (exon 5 p53); 9 (exon 8 p53)
E7 lung	TS	4 (1, 8)	1.5 ± 0.8	9 ( <i>c-jun</i> promoter); 4 (exon 7 p53)
	NTS	16 (4, 32)	3.6 ± 1.9	5 (exon 5 p53); 5 (exon 8 p53)
E6E7 lung	TS	13 (4, 28)	4.1 ± 0.9	9 ( <i>c-jun</i> promoter); 4 (exon 7 p53)
	NTS	17 (6, 32)	4.1 ± 1.3	5 (exon 5 p53); 5 (exon 8 p53)

\*Each value reflects the average time required to achieve 50% repair, and was extrapolated from repair-rate determinations for at least 10 different dipyrimidine sites pooled from different gels. For example (as indicated by the first entry in the column at the far right), the average 50% repair time for the TS strand of normal skin fibroblasts was calculated by pooling repair-rate calculations from 21 sites, i.e., 16 from exon 1 of *c-jun* and 5 from exon 7 of p53. The values in parentheses represent the slowest and fastest 50% repair times, to indicate the site-to-site variation in repair rates.

was used in a PCR to amplify the 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 <sup>32</sup>P-labeled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. Each experimental condition was assayed in duplicate. A screening sequencing gel was run using a portion of the DNA to ensure that there was no significant variation between samples. The two samples were then pooled on a combined gel, and the resulting autoradiogram was analyzed with a Fuji BAS 1000 phosphorimager (Fuji Medical Systems, Stamford, CT). Each band represents a nucleotide position where a break was induced by CPD cleavage, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position. To assess proficiency in GNER and TCNER for the various strains investigated in this study, relative repair rates (reflected in Table 1) were determined along (i) the TS of the p53 gene (exon 7; nucleotides 14,030–14,080), (ii) the TS of the *c-jun* gene (exon 1; nucleotides +30 to +117), (iii) the TS of the *c-jun* promoter (immediately downstream of the transcription start site; nucleotides –40 to –10), and/or (iv) the nontranscribed strand (NTS) of the p53 gene (exons 5 and 8; nucleotides 13,095–13,166 and 14,510–14,575, respectively). The LMPCR primer sets used in each case have been presented previously (29, 30).

## Results and Discussion

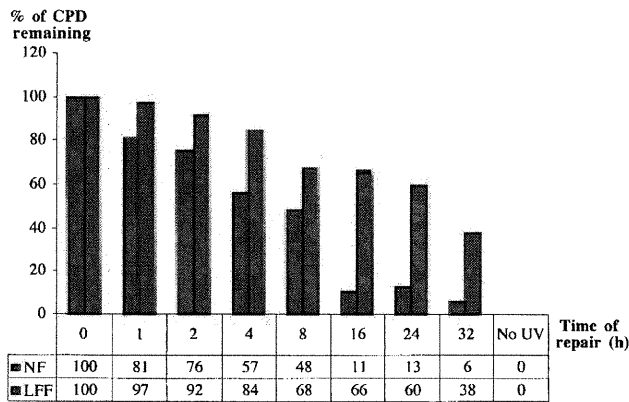
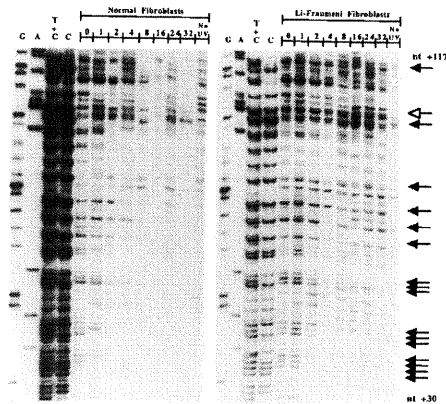
LMPCR is an extremely sensitive genomic-sequencing method because it utilizes a single-sided exponential PCR amplification step. LMPCR can be employed to assess DNA-repair rates in living cells, and allows quantification, at nucleotide resolution in single-copy genes, of any DNA adduct that can be revealed as a ligatable strand break. UV-induced CPDs are easily amenable to LMPCR analysis, as these photoproducts can be efficiently cleaved with extremely high specificity by the enzyme T4-endonuclease V (31), followed by digestion with DNA photolyase to create ligatable 5' ends at the termini of incised strands (28). We therefore utilized LMPCR to investigate the repair of UVB-induced CPDs in human fibroblasts differing in p53 status.

Fig. 1 shows a representative autoradiogram and accompanying histogram that reflect CPD removal along the NTS of the p53 tumor-suppressor gene at different time points up to 32 hr postirradiation in LF041- vs. normal-skin fibroblasts. It should be emphasized that the LF041 strain employed here is the same

as that used in previous investigations to demonstrate p53 dependence for GNER, but not for TCNER (18). As expected, our data revealed that most of the CPDs were removed from the NTS strand of the p53 gene in wild-type skin fibroblasts by 24 hr postirradiation, whereas LF041 cells manifested a significant impairment in this respect, i.e., quantification by phosphorimager and averaging of repair rates for 10 different dipyrimidine sites revealed that there was a delay, relative to normal cells, of approximately 3-fold in the time needed to achieve 50% repair (Table 1).

Exon 1 of the *c-jun* oncogene as well as exon 7 of the p53 gene were then employed as targets to assess CPD removal along the TS of active sequences in LF041 vs. normal fibroblasts. Along the portion of the *c-jun* gene chosen for analysis (nucleotides +30 to +117), both the TS and NTS strands are repaired at a relatively high rate (32). Visual inspection of the representative autoradiogram in Fig. 2, and the accompanying histogram, show that in wild-type cells most of the CPDs were rapidly removed from the TS of *c-jun*, i.e., the average time required to achieve 50% repair was approximately 3 hr (Table 1). Strikingly, however, LF041 fibroblasts were profoundly impaired in CPD removal along the TS of *c-jun*, manifesting an average 50% repair time of 14 hr, i.e., a delay of up to 6-fold compared with wild-type cells (Table 1).

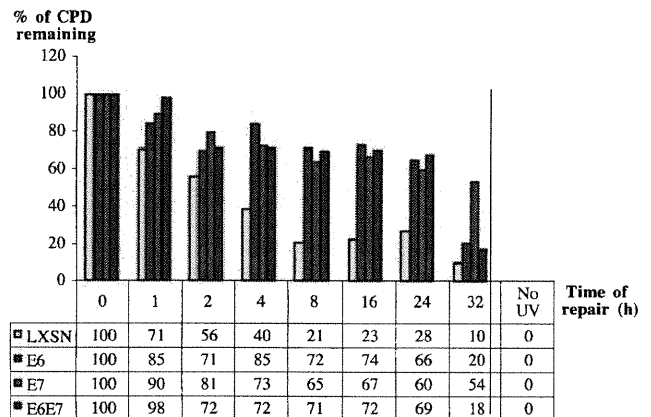
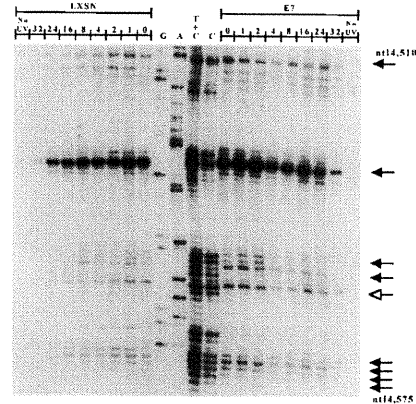
Because the immortalized LF041 and normal primary skin fibroblasts were not isogenic, and to elucidate the role of HPV in tumorigenesis, we investigated repair at different sites along the TS vs. the NTS of the p53 gene in HPV E6-expressing primary lung fibroblasts (which are functionally compromised for p53 protein, but which retain a normal p53 genotype). We also studied repair rates along the TS of the *c-jun* promoter region (located downstream of the transcription start site; nucleotides –40 to –10), which is very rapidly repaired by TCNER (32). HPV E6-expressing cells manifested extremely low basal levels of p53 protein on Western blots, which did not increase after treatment with ionizing radiation or UVB, unlike the wild-type strain, where p53 protein was strongly up-regulated after DNA damage (data not shown). In agreement with results for genetically p53-deficient LF041 fibroblasts, HPV E6-expressing lung fibroblasts presented, relative to the normal isogenic counterpart, (i) an approximately 4-fold slower rate of repair along the NTS of the p53 gene, and (ii) a similar 4-fold delay in repair along the TS of p53 and of the *c-jun* promoter



**Fig. 2.** Repair of UVB-induced CPDs at individual nucleotide positions along the TS of the human *c-jun* protooncogene (exon 1; nucleotides +30 to +117). The lane designations, arrow indications, and the histogram below the autoradiograms are as for Fig. 1. The representative dipyrimidine site depicted in the histogram is located within 5'-TACTGC-3' (nucleotides +92 to +97).

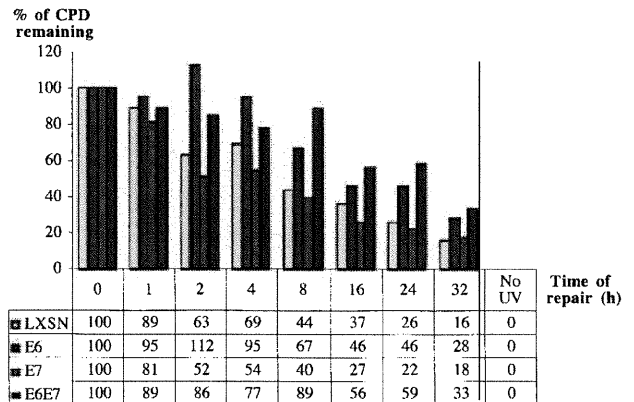
region (autoradiograms not shown, Table 1; compare histograms in Figs. 3 and 4).

Taken together, these data demonstrate that p53 deficiency, whether genetically or functionally imposed, engenders a profound defect in TCNER as well as in GNER, as measured along two different target genes (p53 and *c-jun*), and in cells derived from different tissues (skin and lung). This result is consistent with studies supporting a role for p53 in TCNER, based on, e.g., host-cell reactivation of a reporter gene carried on an adenovirus vector in p53-proficient vs. -deficient cell lines (33, 34). Remarkably, however, our results are in complete disagreement with the persuasive studies cited earlier showing that p53 modulates only GNER, which used a strand-specific DNA-repair assay. While this Southern blot-based assay is certainly capable of detecting differences in TCNER vs. GNER, we emphasize that the LMPCR technique employed here is PCR-based, and, therefore, much more sensitive. In addition, LMPCR measures repair at nucleotide resolution, i.e., at many different sites simultaneously, compared with only one overall measurement at the gene level in the previous studies. Formal explanations for the discrepancy could also be related to the different genetic targets employed (dihydrofolate reductase gene vs. p53 and *c-jun*) or to the different UV wavelengths used to irradiate cells, i.e., 254-nm UV in the previous studies vs. polychromatic UVB here, as these wavelengths exhibit dissimilar properties with respect to both genotoxicity and patterns of gene activation (35). However, it should be noted that the doses of 254-nm UV and UVB employed in the respective studies, i.e., 10 J/m<sup>2</sup> of 254-nm UV compared with 1 kJ/m<sup>2</sup> of UVB, would be expected, according



**Fig. 3.** Repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along the NTS of the human p53 gene (exon 8, nucleotides 14,510–14,575). The lane and arrow designations are as for Figs. 1 and 2, except note that the autoradiograms are presented in an inverse orientation. The accompanying histogram shows repair rates at one representative CC dipyrimidine site quantified by phosphorimager (5'-CACCAC-3', codon 296–297) for each of LXSN-, HPV E6-, HPV E7-, and HPV E6/E7-expressing lung fibroblasts.

to predictions based on UV action spectra in human fibroblasts (36), to induce similar yields of total CPD in the genome. Finally, in complete contrast with our own findings, Wani *et al.* (37) have recently presented LMPCR data that indicate defective GNER,



**Fig. 4.** Graphical representation of UVB-induced CPD-repair rates at a representative CC dipyrimidine site (5'-CCTCCG-3', exon 7, codon 248) on the TS of the human p53 gene for LXSN-, HPV E6-, HPV E7-, and HPV E6/E7-expressing lung fibroblasts.

but normal TCNER, in the same LFS skin fibroblast strain, and using one of the the same target genes (i.e., p53), employed here. Aside from emphasizing that we have presented a much more extensive set of LMPCR results relative to the latter study, we are unable to provide an explanation for this discrepancy.

To explore the possibility that HPV E7 contributes to carcinogenesis by interfering with DNA repair, primary lung fibroblasts expressing this oncoprotein were investigated for rates of CPD removal along the NTS strand of the p53 gene, and along the TS strands of p53 and the *c-jun* promoter. Levels of pRb were barely detectable by Western blotting in HPV E7-expressing lung fibroblasts, and were at drastically reduced levels relative to wild-type lung fibroblasts (data not shown). An autoradiogram reflecting CPD-repair rates along the NTS of the p53 gene in HPV E7-expressing- vs. wild type-lung fibroblasts is presented in Fig. 3. The accompanying histogram reflects quantification of one representative dipyrimidine site (TT, exon 8 of p53, codon 286) for LXS<sup>N</sup>-, HPV E6-, E7-, and E6/E7-expressing cells. Averaging of repair rates for at least 10 different sites in each case revealed that HPV E7-expressing cells exhibit an approximate 3.6-fold delay, relative to cells expressing an empty LXS<sup>N</sup> vector, in the time required to achieve 50% repair along the NTS of p53 (Table 1). However, HPV E7 expression did not significantly affect CPD repair along the TS of either the p53 gene or the *c-jun* promoter (Fig. 4, and Table 1). Cells coexpressing HPV E6 and HPV E7 exhibited a very similar NER deficiency compared with cells expressing HPV E6 alone (Table 1), suggesting that these oncoproteins interfere in the same pathway leading to the global removal of UV-induced CPDs.

While exogenous expression of HPV E6 and HPV E7 has been widely used in cultured cells to inactivate p53 and pRb, respectively, such experiments must be interpreted with caution. Indeed, these viral oncoproteins each interact with a variety of gene products that may contribute to carcinogenesis in a p53/pRb-independent manner (38), e.g., HPV E6-mediated degradation of *c-myc* (39), activation of telomerase by HPV E6 and HPV E7 (40), and activation of cyclins A and E by HPV E7 (41). Nonetheless, we have presented evidence that HPV E6-mediated functional inactivation of p53 in lung fibroblasts might fully account for the impairment in GNER and TCNER observed in these cells, because essentially the same repair-deficient phenotype was also revealed in genetically p53-deficient LF041 skin fibroblasts.

On the other hand, the precise molecular basis for the observed GNER defect in HPV E7-expressing cells remains to be determined. Because HPV E7 binds and inactivates pRb, as well as the functionally related "pocket proteins" p107 and p130 (42, 43), it is tempting to speculate that pRb (and/or pRb family members) plays a role in GNER. This might occur in a number of ways. For example, both pRb and HPV E7 are known to interact with histone deacetylases (44, 45), and, furthermore, HPV E7 has been shown to associate with the nuclear matrix (46). This raises the interesting speculation that HPV E7-

mediated modification of chromatin structure, possibly by means of pRb binding, leads to transcriptional repression of DNA-repair genes, and/or to alterations in repair-protein accessibility to damaged DNA, which may significantly compromise GNER (47). In addition, pRb is known to bind and possibly modulate the activity of topoisomerase II  $\alpha$  protein (48), which is clearly involved in DNA replication and recombination (49), and evidently in DNA repair (50, 51). Finally, pRb binds and stimulates the ubiquitous transcription factor AP-1, and HPV E7 abolishes this interaction (52). This abolition may certainly have important consequences with respect to the current findings, because cellular signaling mediated by AP-1 has a major impact on the DNA damage response, i.e., by modulating apoptosis, cell cycle arrest, and possibly DNA repair (53).

The situation is further complicated because HPV E7 influences proteins, other than pRb, that could affect DNA-repair rates. HPV E7 expression leads to elevated basal p53 protein expression (54), as well as up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1 independently of p53 (55, 56). This may have consequences for CPD removal because p21waf1 may negatively regulate NER (57), although this protein has also been shown to stimulate NER in cultured cells (11). Finally, HPV E7 also interacts with TATA box-binding protein (58, 59), thereby suggesting that various genes involved in GNER might be transcriptionally modulated in HPV E7-expressing cells.

We have presented strong evidence that human cells, either genotypically or functionally compromised for p53 function, manifest defective GNER and TCNER, whereas cells functionally compromised for pRb function are defective only in GNER. Taken together, these findings have clear implications for the mechanism of p53-regulated tumor suppression and also shed light on the molecular pathogenesis of HPV-mediated carcinogenesis. The high-risk HPV<sup>s</sup> play a major role in the etiology of anogenital carcinomas, especially cervical cancer, and to a lesser (but significant) extent, of other epithelial malignancies, including solar UV-associated nonmelanoma skin cancer (60, 61). Given the critical importance of NER in the prevention of carcinogenesis, our results provide impetus for further investigations (e.g., LMPCR studies on cells derived from pRb family knock-out mice) to identify the precise mechanism underlying the observed GNER defect in UV-exposed, HPV E7-expressing human fibroblasts.

We thank Mrs. Nathalie Bastien and Isabelle Paradis for technical assistance, and Drs. R. Stephen Lloyd and Aziz Sancar for kindly supplying T4 endonuclease V and UV photolyase, respectively. This work was supported by grants (held separately by E.A.D. and R.D.) from the National Cancer Institute of Canada (with funds from the Canadian Cancer Society), and from the Medical Research Council of Canada. E.A.D. is a scholar of the Medical Research Council of Canada, and R.D. is a scholar of the Cancer Research Society Inc./Medical Research Council of Canada. C.B. is supported by a graduate student fellowship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Quebec).

- Harris, C. C. (1996) *Environ. Health Perspect.* **104**, 435–439.
- Malkin, D. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 197–213.
- Kessis, T. D., Slebos, R. J., Nelson, W. G., Kastan, M. B., Plunkett, B. S., Han, S. M., Lorincz, A. T., Hedrick, L. & Cho, K. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3988–3992.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H. U. & O'Connor, M. J. (1999) *J. Virol.* **73**, 6209–6219.
- Prives, C. & Hall, P. A. (1999) *J. Pathol.* **187**, 112–126.
- Giaccia, A. J. & Kastan, M. B. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2973–2983.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. (1984) *Carcinogenesis* **5**, 511–514.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. (1999) *Genes Dev.* **13**, 768–785.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1995) *Oncogene* **10**, 1053–1059.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bac, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1994) *Science* **266**, 1376–1380.
- Sheikh, M. S., Chen, Y. Q., Smith, M. L. & Fornace, A. J., Jr. (1997) *Oncogene* **14**, 1875–1882.
- Shivji, K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. (1992) *Cell* **69**, 367–374.
- Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C. & Winchester, E. (1993) *Nature (London)* **365**, 79–82.
- Coverley, D., Kenny, M. K., Munn, M., Rupp, W. D., Lane, D. P. & Wood, R. D. (1991) *Nature (London)* **349**, 538–541.
- 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) *Nat. Genet.* **10**, 188–195.
- Ford, J. M., Baron, E. L. & Hanawalt, P. C. (1998) *Cancer Res.* **58**, 599–603.
- Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28073–28080.
- Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8876–8880.

19. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 424–428.
20. Boyer, S. N., Wazer, D. E. & Band, V. (1996) *Cancer Res.* **56**, 4620–4624.
21. Bookstein, R. & Lee, W. H. (1991) *Crit. Rev. Oncog.* **2**, 211–227.
22. Sherr, C. J. (1996) *Science* **274**, 1672–1677.
23. Weichselbaum, R. R., Nove, J. & Little, J. B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3962–3964.
24. McKay, B. C., Ljungman, M. & Rainbow, A. J. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 1389–1396.
25. Foster, S. A. & Galloway, D. A. (1996) *Oncogene* **12**, 1773–1779.
26. Drouin, R., Rodriguez, H., Holmquist, G. P. & Akman, S. A. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P. (Plenum, New York), pp. 211–225.
27. Drouin, R., Gao, S. & Holmquist, G. P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P. (Plenum, New York), pp. 37–43.
28. Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P. (Plenum, New York), pp. 199–209.
29. Rozek, D. & Pfeifer, G. P. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5490–5499.
30. Tornaletti, S., Rozek, D. & Pfeifer, G. P. (1993) *Oncogene* **8**, 2051–2057.
31. Gordon, L. K. & Haseltine, W. A. (1982) *Radiat. Res.* **89**, 99–112.
32. Tu, Y., Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996) *EMBO J.* **15**, 675–683.
33. McKay, B. C., Winrow, C. & Rainbow, A. J. (1997) *Photochem. Photobiol.* **66**, 659–664.
34. McKay, B. C., Francis, M. A. & Rainbow, A. J. (1997) *Carcinogenesis* **18**, 245–249.
35. Tyrrell, R. M. (1996) *BioEssays* **18**, 139–148.
36. Rosenstein, B. S. & Mitchell, D. L. (1989) *Photochem. Photobiol.* **45**, 775–780.
37. Wani, M. A., Zhu, Q. Z., El-Mahdy, M. & Wani, A. A. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 765–772.
38. Garbe, J., Wong, M., Wigington, D., Yaswen, P. & Stampfer, M. R. (1999) *Oncogene* **18**, 2169–2180.
39. Gross-Mesilaty, S., Reinstein, E., Bercovich, B., Tobias, K. E., Schwartz, A. L., Kahana, C. & Ciechanover, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8058–8063.
40. Greider, C. W. (1999) *Trends Genet.* **15**, 109–112.
41. McIntyre, M. C., Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. (1996) *Virology* **215**, 73–82.
42. Jones, D. L. & Munger, K. (1997) *J. Virol.* **71**, 2905–2912.
43. Hu, T. S., Ferril, S. C., Snider, A. M. & Barbosa, M. S. (1995) *Int. J. Oncol.* **6**, 167–174.
44. Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1998) *Nature (London)* **391**, 597–601.
45. Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1999) *EMBO J.* **18**, 2449–2458.
46. Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S. & Stanley, M. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11217–11221.
47. Smerdon, M. J. & Conconi, A. (1999) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **62**, 227–255.
48. Bhat, U. G., Raychaudhuri, P. & Beck, W. T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7859–7864.
49. Wang, J. C. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635–692.
50. Dresler, S. L. & Robinson-Hill, R. M. (1987) *Carcinogenesis* **8**, 813–817.
51. Stevnsner, T. & Bohr, V. A. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 1841–1850.
52. Nead, M. A., Baglia, L. A., Antinore, M. J., Ludlow, J. W. & McCance, D. J. (1998) *EMBO J.* **17**, 2342–2352.
53. Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. & Rahmsdorf, H. J. (1997) *J. Photochem. Photobiol. B* **37**, 1–17.
54. Jones, D. L., Thompson, D. A. & Munger, K. (1997) *Virology* **239**, 97–107.
55. Jones, D. L., Thompson, D. A., Suh-Burgmann, E., Grace, M. & Munger, K. (1999) *Virology* **258**, 406–414.
56. Jian, Y., Schmidt-Grimminger, D. C., Chien, W. M., Wu, X., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1998) *Oncogene* **17**, 2027–2038.
57. Cooper, M. P., Balajee, A. S. & Bohr, V. A. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 2119–2129.
58. Massimi, P., Pim, D. & Banks, L. (1997) *J. Gen. Virol.* **78**, 2607–2613.
59. Phillips, A. C. & Vousden, K. H. (1997) *J. Gen. Virol.* **78**, 905–909.
60. zur Hausen, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1288**, F55–F78.
61. Shamanin, V., zur Hausen, H., Lavergne, D., Proby, C. M., Leigh, I. M., Neumann, C., Hamm, H., Goos, M., Hausteiner, U. F., Jung, E. G., et al. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 802–811.