

Université de Sherbrooke

**MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE
L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES RAYONS
ULTRAVIOLETS**

présenté par

Annie Lévesque

Département de Médecine Nucléaire et de Radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention

du grade de maître ès sciences

(M. Sc.)

31 mars 1994



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-93064-0

Canada

À Amélie,

La science nous amène à découvrir les
mystères de la vie.

Toi, tu m'as fait redécouvrir la vie.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VI
RÉSUMÉ	VII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1. Les radiations ultraviolettes et leurs effets sur les systèmes biologiques.....	1
1.2. L'immunosuppression induite par les UV	2
1.2.1. Historique	2
1.2.2. Cellules de la peau et UV	4
1.2.2.1. Les cellules de Langerhans	4
1.2.2.2. Le kératinocyte	6
1.2.3. L'interleukine 1	11
1.2.3.1. Propriétés biologiques	11
1.2.3.2. Organisation génomique du gène de l'IL-1	15
1.2.4. Facteurs solubles	19
1.3. Les agents génotoxiques	21
1.4. Réparation des dommages à l'ADN	23
1.5. Réponse à un agent génotoxique	26
1.6. Transmission du signal	28
1.7. But de l'étude: Mécanismes moléculaires de l'immunosuppression induite par les UV.....	32
1.7.1. Modèle d'étude	34

1.7.2. Hypothèse de travail	34
1.7.3. Stratégie expérimentale	35
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
2.1. Culture Cellulaire	36
2.1.1. Préparation des cellules pour l'irradiation	36
2.2. Stimulation des kératinocytes en culture	37
2.2.1. Contrôles positifs et négatifs	37
2.2.2. Irradiation des cellules	37
2.2.3. Stimulation des cellules en présence d'inhibiteurs de la réparation.....	41
2.3. Extraction de l'ARN total	41
2.4. Gel électrophorèse dénaturant	43
2.5. Buvardage de type Northern	45
2.5.1. Transfert	45
2.5.2. Pré-hybridation et hybridation du filtre de nylon	46
2.6. Préparation d'une sonde radioactive	47
2.6.1. Isolement préparatif du fragment d'ADN	47
2.6.2. Marquage au $^{32}\alpha\text{P}$ dCTP de la sonde (cDNA)	50
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	51
3.1. Détermination des contrôles négatifs et positifs	51
3.2. Effet des radiations ultraviolettes sur le messenger du gène IL-1β chez les kératinocytes en culture.....	57
3.2.1. Cinétique de l'induction du gène IL-1 β	57
3.2.2. Cinétique de réparation	67
3.2.3. Inhibiteurs de la réparation	71
CHAPITRE 4 DISCUSSION	77
4.1. Cinétique de l'induction du messenger de l'IL-1β	80
4.2. Rôle du dommage à l'ADN et de la réparation par excision	80
4.2.1. Cinétique de réparation	80
4.2.2. Inhibiteurs de la réparation.....	83
4.3. L'hypothèse	85
4.4. Complexe protéique de réparation: modèle pour la signalisation.....	86

4.5. Spécificité du dommage	88
4.6. Facteurs de transcription	89
4.7. La contre hypothèse	90
4.8. Spécificité des inhibiteurs	92
4.9. Transcription ou stabilisation	93
4.10. Contrôle interne	94
CHAPITRE 5 CONCLUSION	96
REMERCIEMENTS	100
BIBLIOGRAPHIE	102

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1:	Organisation génomique du promoteur du gène pro IL-1 β	16
FIGURE 2:	Principaux dommages à l'ADN induits par les agents génétoxiques	22
FIGURE 3:	Structure chimique des deux lésions majeures induites par les rayons UV au niveau de deux pyrimidines adjacentes (ici deux thymines) sur le même brin d'ADN	24
FIGURE 4:	Mécanisme de réparation par excision-resynthèse	25
FIGURE 5:	Spectre d'émission des lampes UV (a) et de transmission du filtre (b) fourni par la compagnie (Spectronique Corp.)	38
FIGURE 6:	Spectre d'absorption (en transmittance) du couvercle de pétri	40
FIGURE 7:	Carte du vecteur de sécrétion YEpsec1 montrant les sites de restrictions uniques	49
FIGURE 8:	Contenu en ARNm de l'IL-1 β suivant le temps en culture de la lignée des kératinocytes A 431	52
FIGURE 9:	Stimulation des kératinocytes en culture avec le PMA et l'ionomycine	54
FIGURE 10:	Cinétique d'augmentation du niveau d'ARNm de l'IL-1 β après une stimulation au PMA	56
FIGURE 11:	Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 1 heure	59
FIGURE 12:	Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 3 heures	60
FIGURE 13:	Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARN _m de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 6 heures	61

FIGURE 14: Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 12 heures	62
FIGURE 15: Expression de l'ARNm de l'IL-1 β en fonction de la dose d'UV	65
FIGURE 16: Dose d'UVB capable d'inhiber l'effet stimulant du PMA	68
FIGURE 17: Cinétique de réparation du gène IL-1 β	70
FIGURE 18: Effet des inhibiteurs de la réparation sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β pour un temps après irradiation de 3 heures	72
FIGURE 19: Effet des inhibiteurs de la réparation sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β pour un temps après irradiation de 6 heures	74
FIGURE 20: Schéma représentatif de l'immunosuppression induite par les UV.	97
TABLEAU 1: Cytokines produites par les kératinocytes et leurs principaux effets biologiques	7
TABLEAU 2: Effets biologiques de l'IL-1	12
TABLEAU 3: Sources cellulaires d'IL-1 et différents stimuli	14
TABLEAU 4: Pourcentage des cellules adhérentes et vivantes après des irradiations à des doses d'UV différentes	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATPase	Adénosine triphosphatase
Ci	Curie
CSF	Facteur stimulant les colonies
EDTA	Disodium éthylène diamine tétracétate
ESS	Site sensible à l'endonucléase V de T4
GAPDH	Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
HFR	Haute fréquence de recombinaison
IFN- γ	Interféron gamma
J	Joule
Kb	Kilobase
KD	Kilodalton
LC	Cellule de Langerhans
LPS	Lipopolysaccharide
MDP	Muramyl dipeptide
μ W	microwatt
ng	nanogramme
NK	Cellule "Natural killer"
nm	nanomètre
pb	paire de bases
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol myristate acétate
SDS	Sodium dodécylsulfate
TCA	Trichloroacétate
u.i.	unité internationale
UV	Ultraviolet
XP	Xeroderma pigmentosum

Université de Sherbrooke

**MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE
L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES RAYONS
ULTRAVIOLETS**

présenté par

Annie Lévesque

Département de Médecine Nucléaire et de Radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention

du grade de maître ès sciences

(M. Sc.)

21 décembre 1993

Les effets cancérigènes des radiations ultraviolettes (UV) sont bien connus et elles sont aussi potentiellement impliquées dans la suppression du système immunitaire. Les kératinocytes exposés aux rayons ultraviolets produisent une variété de cytokines, dont l'interleukine 1 (IL-1 β) qui semble jouer un rôle dans l'immunosuppression induite par les rayons UV. Nous avons vérifié si l'exposition aux UV (302 nm) induit l'expression du gène IL-1 β chez une lignée de kératinocytes humains (A431) en culture. Ces derniers produisent une quantité détectable d'ARNm de IL-1 β sans stimulation. Le niveau de l'ARNm de IL-1 β

est significativement augmenté par le phorbol myristyl acetate (PMA) plus l'ionomycine et par de hautes doses (1000 J/m^2) de radiations UV. Cette augmentation, observée après un temps de post-stimulation de 6 heures, est dose dépendante et atteint un maximum à 1000 J/m^2 pour ensuite revenir à une expression de base à 2500 J/m^2 . Après un temps de post-irradiation de 3 heures, une légère augmentation de l'expression est observée à 1000 J/m^2 , alors qu'à 12 heures aucune des doses de radiations UV examinées (125 à 1000 J/m^2) augmente l'expression de l'ARNm de IL-1 β . Suite à ces résultats, nous nous sommes attardés à l'implication de la réparation de l'ADN par excision dans l'induction de l'expression de IL-1 β en utilisant des inhibiteurs de la réparation. Une dose d'UV de 1000 J/m^2 combinée à ces inhibiteurs bloquent l'induction de l'expression de l'IL-1 β observée avec une irradiation de 1000 J/m^2 seule, chez les kératinocytes. A des doses de 250 et 500 J/m^2 où on observe peu ou pas d'augmentation de l'expression, l'effet des inhibiteurs est de provoquer une augmentation de l'expression de l'ARNm de IL-1 β . Alors nous proposons qu'à faible dose d'UV, l'accumulation de zones de réparation incomplètes due à la présence d'inhibiteurs de la réparation provoquent l'augmentation de l'expression d'IL-1. Par contre, à haute dose d'UV, la présence de dommages dans le gène IL-1 bloque son expression jusqu'à ce que la réparation soit complétée, processus qui est empêché par la présence des inhibiteurs de la réparation.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 LES RADIATIONS ULTRAVIOLETTES ET LEURS EFFETS SUR LES SYSTÈMES BIOLOGIQUES

Le soleil est responsable du développement et du maintien de la vie sur terre. Cependant, la lumière solaire a des effets nuisibles sur les systèmes biologiques et ils sont dus presque entièrement aux radiations situées dans le spectre des ultraviolets. Ceux-ci sont sous-divisés en trois bandes nommées UVA, UVB et UVC auxquelles sont associées les longueurs d'ondes suivantes: 400-320 nm pour les UVA, 320-290 nm pour les UVB, 290-200 nm pour les UVC. Les radiations à des longueurs d'onde plus petites que 320 nm ont une plus grande photoactivité sur les systèmes biologiques que les longueurs d'onde plus élevées. Puisque les longueurs d'onde situées dans les UVC (290-200) sont complètement bloquées par la couche d'ozone, les UVB sont, d'un point de vue biologique, les radiations les plus importantes du spectre d'ultraviolet terrestre. Les radiations ultraviolettes provenant du soleil sont les premières responsables de l'induction des cancers de la peau (Engel et *al.*, 1988). Le plus commun des

cancers de la peau est le carcinome des cellules basales avec une incidence de 500 000 nouveaux cas par année aux Etats-Unis (Silberberg et Lubera, 1988). Bien qu'il existe plusieurs mécanismes nous protégeant des effets nocifs des radiations ultraviolettes tels la production de mélanine, la réparation enzymatique des dommages à l'ADN et la destruction des cellules malignes par le système immunitaire, il est clair que cette protection n'est pas complète. Alors sachant que la quantité de radiation atteignant la surface de la terre est grandement contrôlée par la couche d'ozone qui est fortement touchée par les effets néfastes de la civilisation moderne, il y a de bonnes raisons de croire que notre exposition à ce dangereux carcinogène ne cessera d'augmenter.

1.2 L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES UV

Les rayonnements ultraviolets, surtout les UVB, ont des effets perturbateurs sur les systèmes biologiques et sont aussi un suppresseur de la réponse immunitaire normale. Ce phénomène de suppression immunitaire peut alors jouer un rôle dans le développement de cancers cutanés, de maladies infectieuses et de réactions autoimmunes (ex. Lupus érythémateux).

1.2.1 HISTORIQUE

De prime abord l'idée que les radiations ultraviolettes aient la capacité de moduler la réponse immunitaire semble surprenante puisque les UV sont presque entièrement absorbés par la peau et très peu pénètrent plus en

profondeur. Cette possible relation entre UV et immunosuppression a pris naissance par les études de Kripke sur les effets des UV sur les cancers de la peau (Kripke,1974). Ces travaux ont permis tout d'abord de démontrer que la greffe d'une tumeur induite par les UV entre souris syngénique (i.e. génétiquement identiques) entraînait une réaction immunologique de la part de la receveuse et aboutissait à un rejet du greffon; les causes du rejet étant principalement dues aux caractères extrêmement antigéniques de la tumeur. De plus, il a été démontré qu'une irradiation répétée, à de faibles doses d'UVB (par ex. sur une période de quatre semaines) de la souris receveuse empêchait le rejet du greffon tumoral et ce même lorsque la greffe de la tumeur avait lieu dans une zone non irradiée (Kripke et Fisher,1976). Dès lors, l'hypothèse retenue fut que les UV induisaient un effet immunosuppresseur systémique qui était à l'origine du non rejet de la tumeur. Par la suite, il a été montré que l'incapacité de rejeter le greffon tumoral est en corrélation avec l'apparition de lymphocytes suppresseurs (Fisher et Kripke,1978; Spellman et Daynes,1978). Ces cellules suppressives ont été identifiées comme étant des lymphocytes T et ils sont présents au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques des animaux irradiés aux UVB (Fisher et Kripke,1982). Ainsi, les radiations UV appliquées au niveau cutané semblent avoir plusieurs effets tels que la transformation tumorale des cellules normales, l'induction de changements antigéniques au niveau cutané et l'apparition de lymphocytes T suppresseurs dirigés contre ces antigènes.

Parallèlement, il a été également démontré qu'une inhibition de la réaction d'hypersensibilité de contact vis-à-vis un allergène est induite suite à une irradiation aux UV d'une surface cutanée chez la souris. Cette inhibition a lieu tout autant avec l'allergène appliqué à la zone irradiée (Toews *et al.*,1980) ou à la zone non irradiée (Jessup *et al.*,1978). On parle alors respectivement de suppression locale entraînée par de faibles doses d'UV et de suppression systémique où de fortes doses d'UV sont impliquées (Bergstresser,1986; Kripke et Morison, 1985).

1.2.2 CELLULES DE LA PEAU ET UV

Suite à ces expériences sur les souris où l'irradiation s'effectuait directement sur la peau, on peut se demander quelles cellules de la peau sont impliquées dans ce phénomène d'immunosuppression. Puisque très peu de rayons ultraviolets pénètrent plus en profondeur que la couche épidermique (Everett *et al.*,1966) les cellules de Langerhans et les kératinocytes sont les cellules cibles les plus probables.

1.2.2.1 Les cellules de Langerhans

Du côté des cellules de Langerhans précisons d'abord qu'elles sont les principales cellules responsables de la prise en charge, du traitement et de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T lors de l'initiation d'une réponse immune.

La suppression locale de l'hypersensibilité de contact par de faibles doses d'UV est associée à des modifications morphologiques (perte des dendrites) et biochimiques (perte de l'activité ATPase de surface et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classes II) chez les cellules de Langerhans (LC) situées au site d'irradiation (Toews *et al.*,1980)) ainsi qu'au développement dans les organes lymphoïdes de cellules T suppressives spécifiques de l'haptène (Elmets *et al.*,1983). De plus, les radiations UV causent une diminution significative dans la densité des LC au site irradié. Cette diminution dans la densité des LC est aussi en relation avec une inhibition de l'hypersensibilité de contact démontré tant chez la souris (Toews *et al.*,1980) que chez des volontaires humains (Slot *et al.*, 1987).

Malgré le fait que les radiations UV ont des effets directs sur les cellules de Langerhans, il semble que ces effets ne sont pas reliés avec une immunosuppression systémique. En effet, il a été montré que la suppression systémique (maximale) de l'hypersensibilité de contact induite par les UV est observée pour des longueurs d'ondes différentes de celles qui affectent directement les cellules de Langerhans. (Noonan *et al.*, 1984). D'autres études supportent cette idée par la mise en évidence que la déplétion des cellules de Langerhans de la peau n'altère pas la capacité des UV de provoquer une suppression systémique de l'hypersensibilité de contact (Morison *et al.*,1984).

1.2.2.2 Le kératinocyte

Le kératinocyte est une cellule avec un programme de différenciation très complexe impliqué dans la régénération continue de l'épiderme. Le kératinocyte, cellule principale de l'épiderme et des annexes épidermiques, se caractérise par la production de diverses protéines de structure dont les kératines qui sont en partie responsables des propriétés physiques du revêtement cutané (kératines "molles" de l'épithélium interfolliculaire) et des phanères (kératines dures des poils et des ongles) (Taïeb,1992).

La culture des kératinocytes est actuellement relativement aisée et est un outil dans tous les domaines de la recherche fondamentale et appliquée. Les kératinocytes cultivés ont la capacité de produire un nombre considérable de médiateurs solubles. Ceux-ci comprennent une série de polypeptides régulateurs groupés sous le terme de cytokine, incluant des facteurs de croissances, des interleukines, des facteurs chimiotactiques et des facteurs stimulant les progénitures hématopoïétiques (colony stimulating factors) (Taïeb,1992; Roberts *et al.*, 1988). Le tableau 1: en donne une liste et indique également les principaux effets biologiques pour chacune des cytokines. Ces facteurs produits par les kératinocytes ont été démontrés dans les surnageants, les fractions cytosoliques ou membranaires, sous forme traduite et/ou transcrite (ARN messenger) (Coffey *et al.*, 1987).

Tableau 1: Cytokines produites par les kératinocytes et leurs principaux effets biologiques

Cytokines	Effets biologiques	Références
bFGF	Facteur de croissance des fibroblastes; Stimule la croissance des mélanocytes.	Taïeb, 1992
TGF α et β	Facteur de croissance et de différenciation de nombreux types cellulaires (plaquette); Stimule (α) ou inhibe (β) la croissance des kératinocytes.	Taïeb, 1992; Kane <i>et al.</i> , 1990
PDGFAA et B	Facteur de croissance dérivé des plaquettes; Stimule la croissance des kératinocytes.	Taïeb, 1992
TNF α	Facteur nécrosant les tumeurs; Inhibe la croissance des kératinocytes; Activateur de cellules inflammatoires et immunitaires (macrophages, granulocytes, cellules cytotoxiques).	Taïeb, 1992
IL-1 α et β	Activateur des lymphocytes; Stimule la relâche de PG; Stimule la croissance des kératinocytes.	Taïeb, 1992
IL-3	Facteur stimulant les colonies de lignées multiples (mastocytes, thymocytes etc.).	Taïeb, 1992
IL-6	Facteur de différenciation et de croissance pour les cellules B de la réponse aiguë; Stimule la croissance des kératinocytes.	Taïeb, 1992
IL-8	Stimule le recrutement des cellules inflammatoires; Facteur activateur et chimiotactique.	Taïeb, 1992
GM-CSF	Stimulation de la division et de la différenciation; activation des cellules inflammatoires.	Taïeb, 1992
IL-10	Inhibe la production d'IFN- γ ; stimule la prolifération des mastocytes.	Miyajima <i>et al.</i> , 1992; Rivas et Ullrich, 1992
NGF	Développement du système nerveux.	Roberts <i>et al.</i> , 1988; Tron <i>et al.</i> , 1990
ELDIF	Inhibe la réponse des lymphocytes aux mitogènes.	Roberts <i>et al.</i> , 1988
ELCF	Facteur chimiotactique des lymphocytes.	Roberts <i>et al.</i> , 1988
MNCF	Facteur chimiotactique des monocytes.	Roberts <i>et al.</i> , 1988
Contra-IL-1	Inhibe l'activité de l'IL-1; Supprime l'activation des thymocytes induits par l'IL-1 et la capacité des cellules présentatrices de l'antigène.	Schwarz <i>et al.</i> , 1987; Krutmann <i>et al.</i> , 1990

Quel est l'intérêt pour les kératinocytes de produire une variété de cytokines. McKenzie et Sauder (1990) ont proposé une cascade d'événements causés par la relâche de diverses cytokines lors d'une lésion au niveau de la peau suivie d'une invasion microbienne. Par exemple, étant donné que l'IL-1 est produit de façon constitutive par les kératinocytes et retenu dans la cellule, l'épiderme est un vaste réservoir d'IL-1 séquestré (Kupper, 1988). L'IL-1 relâché des kératinocytes au niveau de la blessure constitue le premier événement de défense de la peau. Cette réponse est amplifiée par le simple fait que l'IL-1 lui-même stimule la relâche de l'IL-1 des kératinocytes voisins. De plus l'IL-1 stimule la production et la libération de l'IL-8 (Larsen *et al.*, 1989), IL-6 (Kupper *et al.*, 1989) et GM-CSF (Kupper *et al.*, 1987). Ces cytokines sont des activateurs pour les cellules pro-inflammatoires, comme les macrophages et les cellules de Langerhans qui sont responsables de la présentation de l'antigène aux cellules T. Ces cellules T activées produisent de l'IL-2, de l'IL-4 et de l'IL-5 qui stimulent la prolifération des cellules B et la production d'anticorps (Feldmann *et al.*, 1989, Callard, 1989). Et ainsi de suite, chaque cytokine en agissant localement ou de façon systémique est capable de régulariser les activités d'une variété de types cellulaires. Alors la peau n'est pas qu'une barrière physique mais aussi un tissu immuno-régulateur. Les cytokines présentes au niveau de l'épiderme permettent une mobilisation rapide des armes cellulaires du système immunitaire au site d'infection.

Les effets des radiations UV sur la production de cytokines par les kératinocytes est un sujet d'étude important entre autres pour la compréhension du phénomène d'immunosuppression induite par les UV. Les kératinocytes exposés aux ultraviolets répondent par une augmentation de l'expression des gènes de l'IL-1 murin (Ansel *et al.*, 1988) et humain (Kupper *et al.*, 1987), de l'IL-3 (Gallo *et al.*, 1989), de l'IL-6 (Kirnbauer *et al.*, 1989), de FGFb (Halaban *et al.*, 1988), de TNF α (Köck *et al.*, 1989), de GM-CSF (Nosaki *et al.*, 1990) et de l'IL-10 (Rivas et Ullrich, 1992). Ces cytokines pourraient jouer un rôle important dans la génération des oedèmes et des érythèmes associés à une exposition au UV, néanmoins une quelconque activité suppressive ne peut être présentée comme étant le seul fait d'aucune cytokine connue à ce jour.

La cible cellulaire d'une irradiation aux UV n'est pas encore identifiée. Mais le candidat le plus probable pour générer une immunosuppression systémique semble être le kératinocyte de par sa capacité de produire une variété de cytokines impliquées dans les réactions inflammatoires et immunitaires, de même que par la relâche de médiateurs solubles immunosuppresseurs après une irradiation UV.

Il n'y a pas que les cytokines qui sont affectées par les UV chez les kératinocytes. En effet, par exemple les UV peuvent soit supprimer ou induire l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) à la surface des kératinocytes humains en culture (Norris *et al.*, 1990). Aussi, il y a un changement dans la concentration de calcium interne des kératinocytes après

une irradiation UV (Nakagaki *et al.*, 1990). D'autres gènes tels des gènes reliés au stress, des gènes associés avec un arrêt de croissance et au dommage à l'ADN (ex. *gadd 153*), des proto-oncogènes associés avec la croissance cellulaire et la différenciation (*c-myc* et *c-fos*) et un gène impliqué dans le métabolisme cellulaire (GAPDH) ont été étudiées chez les kératinocytes humains (Garmyn *et al.*, 1991). Pour un temps court après irradiation, le niveau d'ARNm de *gadd 153* et de *c-fos* augmente alors que l'ARNm de *c-myc* diminue. Pour un temps plus long (48 heures), l'expression de GAPDH diminue alors que l'expression de la protéine "heat shock"70 et k1 ubiquinine augmente. De même, il a été démontré qu'une irradiation UV provoque chez les kératinocytes murins une relâche d'un inhibiteur spécifique, à l'IL-1 dérivé des cellules épidermiques (EC-contr-IL-1) (Schwarz *et al.*, 1987; Krutmann *et al.*, 1990). Un dernier exemple est que les UV induisent des changements dans le métabolisme membranaire des kératinocytes humains en culture (Pentland et Mahoney, 1990). La synthèse des prostaglandines, en particulier PGE₂, des kératinocytes est augmentée par les UVB. Sachant que les UV stimulent la synthèse des prostaglandines dans plusieurs types cellulaires, Pentland et Mahoney ont suggéré que l'IL-1 serait en partie responsable de l'induction de la synthèse des PGE₂ après une irradiation aux UVB des kératinocytes.

1.2.3 L'INTERLEUKINE 1

1.2.3.1 Propriétés biologiques

Parmi toutes les cytokines produites par les kératinocytes, la cytokine la plus caractérisée est l'interleukine 1. Beaucoup de changements physiologiques associés au coup de soleil induit par les UV sont attribués aux effets systémiques de l'IL-1, e.x. la fièvre, l'érythème et l'oedème.

L'interleukine-1 est classé comme une hormone polypeptidique possédant un large spectre de propriétés inflammatoires métaboliques, physiologiques, hématopoïétiques et immunologiques. L'interleukine-1 avant d'être nommée ainsi a été d'abord connue comme une molécule capable de produire de la fièvre appelée pyrogène endogène (Atkins, 1960). Puis d'autres activités biologiques de cette molécule ont été découvertes d'où les termes de médiateur endogène des leucocytes, de facteur activant les lymphocytes, de facteur cellulaire des mononucléaires, de catoboline, de facteur activant les ostéoclastes et d'hémopoïétin-1, de facteur des neutrophiles favorisant la prolifération lymphocytaire, de facteur d'inhibition de la croissance des mélanomes et de facteur-2 inhibiteur des tumeurs (revu dans Dinarello, 1991). Tous ces termes sont maintenant associés à l'interleukine-1. Deux formes distinctes d'IL-1 nommées IL-1 α (Lomedico *et al.*, 1984) et IL-1 β (Auron *et al.*, 1984) ont été clonées. Bien que les deux protéines codées par ces deux gènes portent seulement une homologie en acide aminé de 26% (pour l'humain), elles sont

capables de se lier au même récepteur avec une affinité comparable et les deux vont causer des effets biologiques similaires, *in vivo* et *in vitro* (Dower *et al.*, 1986). Le tableau 2 met en évidence les effets biologiques de l'IL-1 (Dinarello, 1991).

Tableau 2: Effets biologiques de l'IL-1

PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

Activation des cellules T
 Augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-2
 Activation des cellules B et augmentation de la production d'anticorps
 Augmentation de l'activité des cellules NK (natural killer)
 Expression des gènes de plusieurs lymphokines

PROPRIETES PRO-INFLAMMATOIRES

Induction de la fièvre, de somnolence, d'anorexie, de la relâche de neuropeptides
 Augmentation de l'expression des gènes du complément
 Activation des cellules endothéliales
 Neutrophilie
 Augmentation de l'expression de molécules d'adhésion
 Amorçage des neutrophiles, dégranulation des éosinophiles
 Induction d'une hypotension, suppression des fonctions du myocarde
 Infiltration des tissus par les neutrophiles (via IL-8)
 Cytotoxicité des cellules des îlots bêta du pancréas
 Augmentation de la synthèse de protéines et d'acides gras
 Induction de la synthèse des PGE₂, des PGI₂, des phospholipases A₂
 Augmentation de la synthèse de la collagénase et du collagène;
 activation des ostéoblastes

EFFETS PROTECTEURS

Malaria
 Infections bactériennes
 Radiation à des doses mortelles
 Cellules-souches primitives

L'IL-1 est synthétisé par une grande variété de cellules. Les sources d'IL-1 incluent les monocytes sanguins, les macrophages, les neutrophiles sanguins, les microglies du système nerveux central, les astrocytes, les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses, les fibroblastes, les cellules synoviales, les cellules dendritiques du derme, les kératinocytes, l'épithélium cervical, gingival et intestinal, les lymphocytes T sanguins, les lymphocytes B sanguins normaux et transformés, les cellules des ganglions lymphatiques, les cellules NK (natural killer), les cellules du placenta et les cellules leucémiques (Dinarello, 1991). Au tableau 3, les sources cellulaires d'IL-1 sont montrées, ainsi que les stimuli capables d'induire une synthèse de l'IL-1 (Oppenheim *et al.*, 1986). Avant 1986, les chercheurs croyaient que seulement les cellules B transformées et les cellules leucémiques produisaient de l'IL-1 sans stimuli. C'est l'équipe de Kupper qui a démontré que les kératinocytes humains sont aussi capables de produire l'ARNm et la protéine de l'IL-1 en absence de stimulation (Kupper *et al.*, 1987). Mais la détection de l'ARNm pour une espèce d'IL-1 n'indique pas nécessairement qu'une protéine biologiquement active a été produite. Un bon exemple a été rapporté avec les kératinocytes humains (Mizutani *et al.*, 1991). Les kératinocytes contiennent les ARNm d'IL-1 α et d'IL-1 β et une accumulation de ces ARNm peut être induite par un stimulus (ex. UV, PMA). Par contre, alors qu'une activité biologique de la protéine IL-1 α est détectée aucune protéine biologiquement active d'IL-1 β a été démontrée. De plus, toute l'activité d'IL-1 trouvée dans l'épiderme normal est due exclusivement

à IL-1 α . L'équipe de Kupper a finalement démontré que les kératinocytes traduisent un ARNm pro-IL-1 β en une protéine précurseur, de 31-KD IL-1 β . La protéine active de 17-KD pourra être générée seulement par une convertase exogène, car aucune activité enzymatique n'a été détectée dans le kératinocyte.

Tableau 3: Sources cellulaires d'IL-1 et différents stimuli

TYPES CELLULAIRES	STIMULANTS
Monocytes et Macrophages	LPS, particules, PMA, MDP, Lésion cellulaire, CSF, IFN- γ , Cellules T activées, Irradiation UV, A23187, Hydroxyurea
Cellules dendritiques	LPS
Cellules de Langerhans	LPS, <i>Staphilococcus albus</i>
Cellules NK	LPS
Lignées de cellules B	Aucun (production constitutive)
Lymphoblastes B	LPS, Anti-IgM
Cellules endothéliales	LPS
Lignées de cellules de mélanome	?
Cellules mésengiales	Dépendent du cycle cellulaire
Astrocytes	LPS
Lignées de cellules de gliome	Dépendent du cycle cellulaire
Cellules microgliales	LPS, <i>Staph. albus</i> , lésion
Neutrophiles	Hydroxide d'aluminium
Fibroblastes	MDP
Cellules épithéliales	Production constitutive, PMA, LPS, irradiation UV
Cellules T leucémiques adultes	Aucun (production constitutive)

À ce jour, il est donc clairement établi que les kératinocytes produisent de façon constitutive l'ARNm d'IL-1 β et d'IL-1 α ainsi que la protéine IL-1 α et la protéine pro-IL-1 β de 31-KD. L'accumulation de ces deux ARNm est observée après une stimulation aux UVB, au LPS ou au phorbol ester (Oppenheim *et al.*, 1986). Une bioactivité de la protéine IL-1 (due exclusivement à l'IL-1 α) est augmenté après un traitement aux UV ou au PMA (Mizutani *et al.*, 1991). Selon Kupper (Kupper *et al.*, 1987) ces observations suggèrent que plusieurs réponses biologiques immédiates après une exposition excessive au soleil peuvent être causées par l'IL-1 des kératinocytes. Ces réponses peuvent être locales telles que l'augmentation de la synthèse des prostaglandines par les cellules épidermiques, l'activation des fibroblastes, le recrutement des neutrophiles et des cellules T du sang périphérique. Tandis que des effets systémiques comme la fièvre, la leucocytose et les réponses de phase aiguë peuvent être aussi initiés par l'IL-1.

1.2.3.2 Organisation génomique du gène de l'IL-1

Nous avons déjà élaboré sur les propriétés biologiques et physiologiques de l'IL-1. Alors que ces propriétés sont bien caractérisées, la régulation de la production de l'IL-1 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel reste très peu comprise.

Les séquences génomiques pour l'IL-1 α humain (Furutani *et al.*, 1986) l'IL-1 β humain (Clark *et al.*, 1986) et l'IL-1 β murin (Telford *et al.*, 1986) ont été rapportées. Le gène d'IL-1 β humain est de 7.8kb et celui de l'IL-1 α humain est de 10.5Kb. Chaque gène contient sept exons codant pour l'ARNm d'IL-1 épissé. Les deux formes d'IL-1 sont codées par des gènes séparés et sont localisés sur le chromosome 2.

De plus en plus ces dernières années les chercheurs ont identifié des séquences dans le gène IL-1 responsable de l'induction et du maintient de la transcription. Nous nous attarderons sur le gène IL-1 β puisqu'il fait parti du sujet d'étude. À la figure 1, nous montrons les séquences régulatrices de la transcription du gène pro-IL-1 β (Hunninghake *et al.*, 1992; Shirakawa *et al.*, 1993).

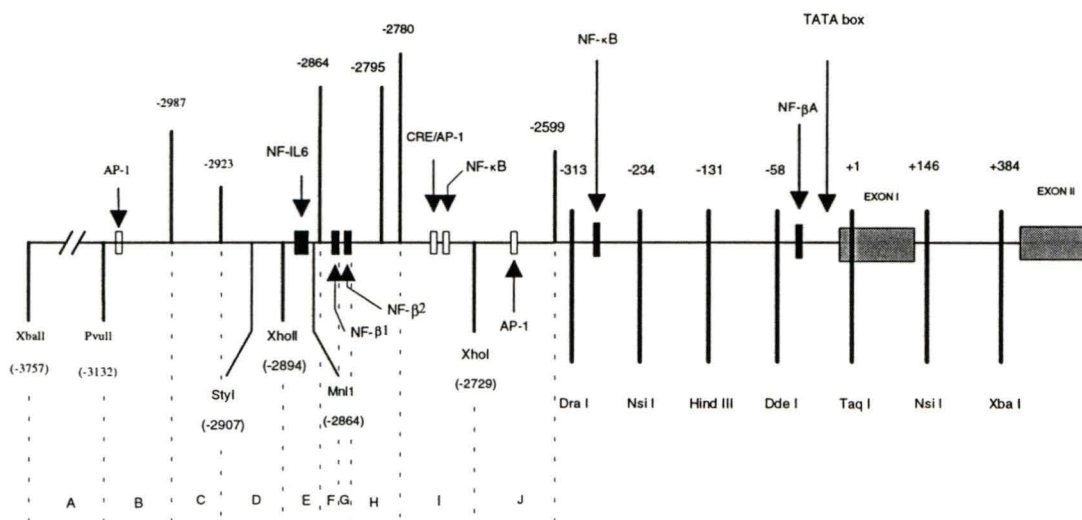


FIGURE 1: Organisation génomique du promoteur du gène pro IL-1 β (Hunninghake, 1992 et Shirakawa, 1993)

Les séquences génomiques qui régularisent la transcription du gène de l'IL-1 β incluent des éléments régulateurs inductifs localisés en amont de 2700pb du site d'initiation de la transcription (cap site). Les travaux de Bensi *et al.* (1990) ont permis d'identifier un élément du enhancer qui est induit par le PMA localisé entre les positions -2982 et -2795. Les travaux de Shirakawa *et al.* (1993) ont défini une autre région localisée entre -3757 et -2729, qui serait une cible pour l'activation de la transcription par le LPS ainsi que par le PMA puisque ce fragment englobe l'élément enhancer qui est induit par le PMA. Ils ont séparé cette région en 10 parties (A-J) où les sections C et E sont essentielles pour enregistrer une activité, mesurée par le gène rapporteur CAT, dans les cellules de souris transfectées. Ces deux sous régions coopèrent avec les séquences en amont (région A-B) et les séquences en aval (région F a I) pour une réponse maximale.

Des mutations de délétions et de substitutions de bases et ainsi qu'une étude par EMSA (electrophoretic mobility shift assay) des sites de liaison des protéines dans le fragment P₂Xho (B,C) démontrent qu'un minimum de trois facteurs nucléaires distincts se lient aux régions essentiels de cet enhancer dont deux de ces facteurs semblent importants pour l'induction de l'expression du gène. Une des protéines essentielles qui se lient à la séquence du enhancer (région E) est similaire aux facteurs de transcription NF-IL6 humain. Les facteurs NF-IL6 seraient requis pour l'induction du gène IL-6 par IL-1, IL-6, TNF et LPS. Les deux autres facteurs qui se lient au fragment P₂Xho sont NF- β 1, qui

se lie à une séquence ressemblant au site de liaison du facteur IRF-1 et NF- β 2. Comme montré sur le schéma, d'après la séquence d'acide nucléique du gène pro-IL-1 β il y aurait des séquences qui pourraient servir comme site de liaison des facteurs de transcription AP-1, CREB et NF κ B situés en amont du site d'initiation de la transcription.

Ce ne sont pas que des séquences génomiques localisés à plus de 2700pb du site d'initiation de la transcription qui interviennent pour la régulation de la transcription mais aussi des séquences localisées près du TATA box du gène pro-IL-1 β . La région du promoteur du gène pro-IL-1 β entre -131 et +12 a été décrite comme une séquence hautement conservée chez l'humain et la souris. (Clark *et al.*, 1988) Dans cette région promotrice une protéine se lie à une séquence d'ADN de 12pb (-49 à -39) localisé en amont du TATA box. Cette protéine nommée NF- β A est exprimée de façon constitutive dans les cellules compétentes pour la transcription du gène pro-IL-1 β , mais n'est pas exprimée dans les cellules réfractaires telles les cellules T et les cellules Hela (Hunninghake *et al.*, 1992). Le gène de l'IL-1 α lequel ne possède pas de TATA box, n'a pas la séquence où se lie la protéine NF- β A (Telford *et al.*, 1986), suggérant que NF- β A ne participe pas à la régulation de l'expression du gène IL-1 α et fournit un mécanisme possible par lequel le gène IL-1 β pourrait être régularisé indépendamment du gène IL-1 α dans le même type cellulaire (Hunninghake *et al.*, 1992).

Au niveau des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels impliqués dans l'expression de l'ARNm d'IL-1, l'équipe de Zuckerman a étudié l'effet d'un traitement à la cycloheximide des macrophages murins stimulés avec l'endotoxine (LPS) sur l'expression d'IL-1 β (Zuckerman *et al.*, 1991). La cycloheximide étant un inhibiteur de la synthèse protéique, les études par "run-on" démontrent qu'elle ne provoque pas une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de l'IL-1 β ni n'affecte la stabilité de l'ARNm, en présence de LPS. Mais si la cycloheximide est ajoutée 1 à 2 heures après le LPS une augmentation du niveau basal de l'ARNm d'IL-1 β est observée, suggérant que l'augmentation du taux de transcription de l'IL-1 β est dépendant de la synthèse protéique.

1.2.4 FACTEURS SOLUBLES

Comment une exposition de la peau à une irradiation aux UV résulte en une suppression systémique de la réponse immunitaire par un mécanisme impliquant des cellules T suppressives provenant de la rate. Il est certain que les UV ne pénètrent pas jusqu'à la rate, donc une irradiation directe des cellules T spléniques n'est probablement pas impliquée. Jusqu'à maintenant d'après les évidences expérimentales le concept le plus répandu est que des facteurs supprimeurs solubles induits par les UV et sécrétés par les cellules seraient impliqués. Cependant l'identité et le mode d'action de ces facteurs solubles responsables de l'induction de la suppression par les UV ne sont pas clairs. Des

candidats comme l'acide cis-urocanique (DeFabo et Noonan, 1983), l'IL-1 (Robertson *et al.*, 1987), contra IL-1 (Schwarz *et al.*, 1987), des facteurs provenant du sérum (Swartz, 1984), des facteurs isolés à partir des kératinocytes irradiés aux UV (Ullrich *et al.*, 1990) et les prostaglandines E₂ (Chung *et al.*, 1986) ont été mentionnés pour leur implication dans le processus d'induction de l'immunosuppression induite par les rayons UV.

Dernièrement, Ullrich et Rivas, ont trouvé que l'IL-10 jouerait un rôle prééminent dans l'induction de la suppression systémique après une exposition aux UV (Rivas et Ullrich, 1992). Cette affirmation est basée sur les faits expérimentaux suivants: l'expression d'ARNm de l'IL-10 est augmentée chez les kératinocytes irradiés aux UV; une protéine relâchée par ces kératinocytes réagit avec un anticorps anti IL-10; les surnageants ont une activité biologique pareille à celle d'IL-10 et finalement ces surnageants des kératinocytes irradiés lorsque neutralisés avec un anti-IL-10 enlèvent toute activité immunosuppressive. *In vivo*, les anticorps anti-IL-10 ne bloquent que partiellement l'immunosuppression. Sans toutefois diminuer le rôle des facteurs suppresseurs relâchés par les cellules épidermiques après une irradiation aux UV, ils proposent que la production de l'IL-10 par les kératinocytes serait la première étape dans la cascade d'événements menant à la suppression systémique.

1.3 LES AGENTS GÉNOTOXIQUES

Comme agents qui endommagent l'ADN, il y a les radiations ionisantes, les radiations ultraviolettes et les agents chimiques. Les dommages que ces agents peuvent induire à l'ADN sont multiples (Figure 2). Les rayons UV, essentiellement les UV-C et UV-B, entraînent l'apparition de deux lésions majeures entre deux pyrimidines adjacentes (les dimères de pyrimidines cyclobutyliques et les pyrimidines (6.4) pyrimidones) et de nombreuses lésions mineures (Beukers et Berends, 1960; voir pour revue; Setlow, 1989). Les radiations ionisantes (rayon-X, rayon- γ et neutrons) entraînent des cassures simples et doubles brins de la chaîne phosphodiester d'ADN, ainsi que des dégradations de bases et des ouvertures de cycles nucléotidiques. Les agents chimiques (cancérogènes chimiques, mycotoxines, médicaments antitumoraux, produits alkylants) sont les plus souvent responsables de l'augmentation du phénomène de dépurination qui résulte en des sites abasiques (voir pour revue; Sarasin et al., 1991)

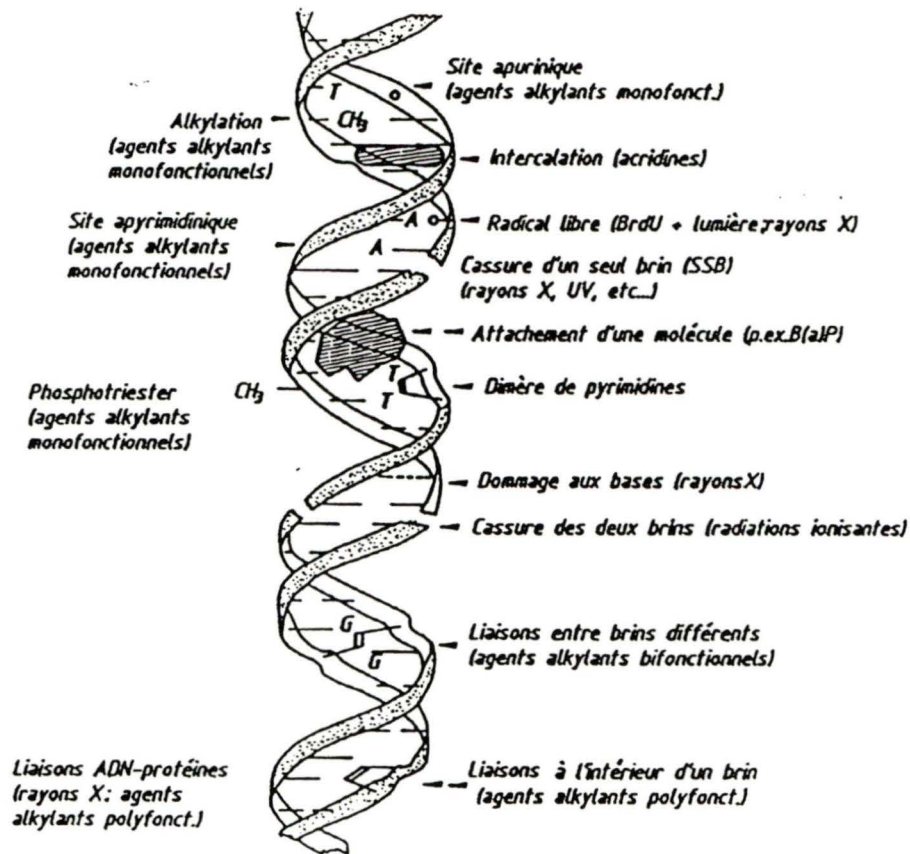


FIGURE 2: Principaux dommages à l'ADN induits par les agents génotoxiques

1.4 RÉPARATION DES DOMMAGES À L'ADN

La réparation de l'ADN est un processus enzymatique complexe permettant à toute cellule vivante de résister aux effets délétères mutagènes des agents génotoxiques. Le type de dommage à la molécule d'ADN peut prendre plusieurs formes selon le type d'agent (dommage aux bases, brisure simple et double brin etc.). De même, les mécanismes de réparation agissent selon le type de dommage induit. Pour simplement les nommer, les mécanismes de réparation incluent la photoréactivation (non prouvée chez les humains (Feng Li *et al.*, 1993)), la réparation par excision, la réparation post-répllicative (Bohr *et al.*, 1987; Sancar et Sancar, 1988) et la réparation par les alkyltransférases.

Les deux lésions majeures induites par les rayons ultraviolets (Figure 3) sont réparées, avec une efficacité d'environ 80% par la voie d'excision-resynthèse (Bohr *et al.*, 1987) (Figure 4). Ce processus, qui fonctionne dans toute cellule vivante, se compose d'une étape de reconnaissance de la lésion, probablement du fait de la déformation locale de la structure de l'ADN, suivie d'une étape de séparation des deux brins d'ADN (Ciarrocchi *et al.*, 1982). Une étape d'incision du brin endommagé, près de la lésion, a lieu, suivie de l'excision d'un petit fragment d'ADN (entre 10 et 30 bases) contenant la lésion. Ces étapes d'incision et d'excision font appel à des enzymes spécifiques avec des activités endonucléase ou exonucléase. Ces enzymes seraient associés à une ou plusieurs hélicases qui induisent le déroulement des deux brins d'ADN pour y favoriser l'accès. Après excision du

fragment d'ADN, la discontinuité ainsi formée est comblée par une ADN-polymérase delta (Hunting *et al.*, 1991) utilisant le brin opposé comme matrice. Puis une ADN-ligase permet de lier l'ADN nouvellement synthétisé à l'ADN parental. La molécule ainsi réparée a recouvré son intégrité, sans modification de l'information génétique. (Sarasin *et al.*, 1991)

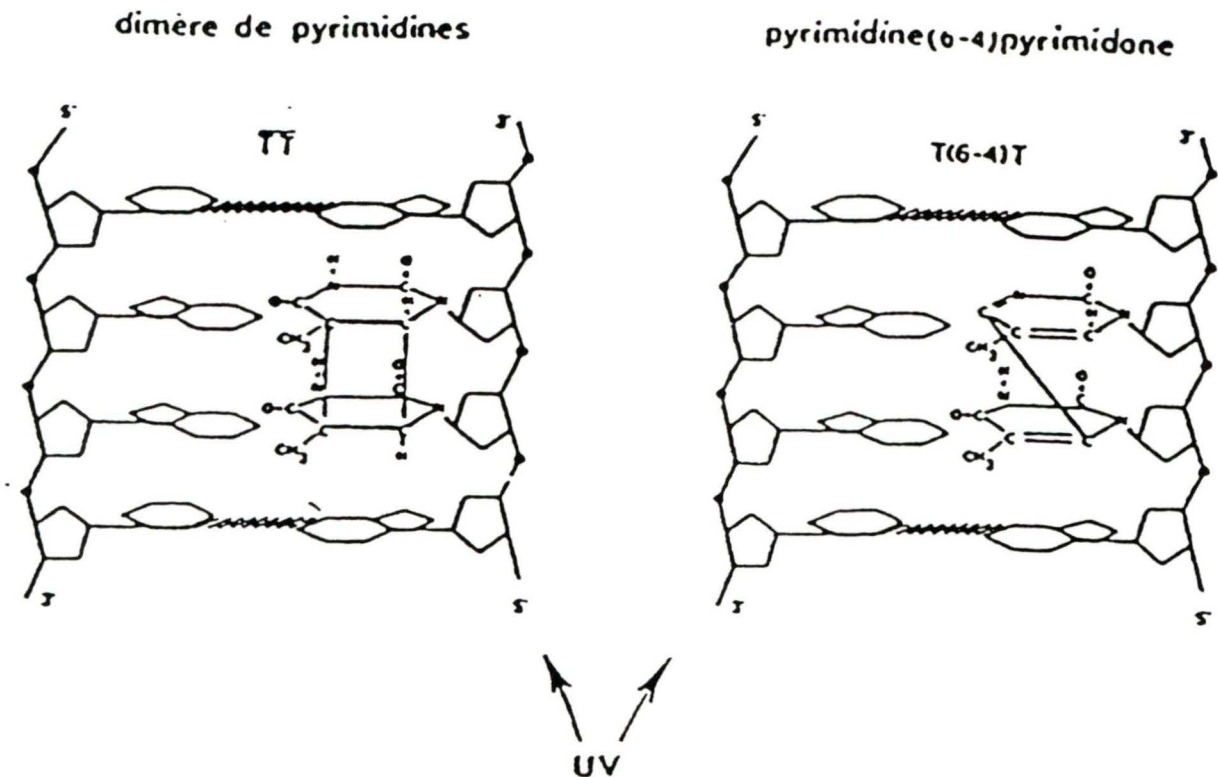


FIGURE 3: Structure chimique des deux lésions majeures induites par les rayons UV au niveau de deux pyrimidines adjacentes (ici deux thymines) sur le même brin d'ADN.

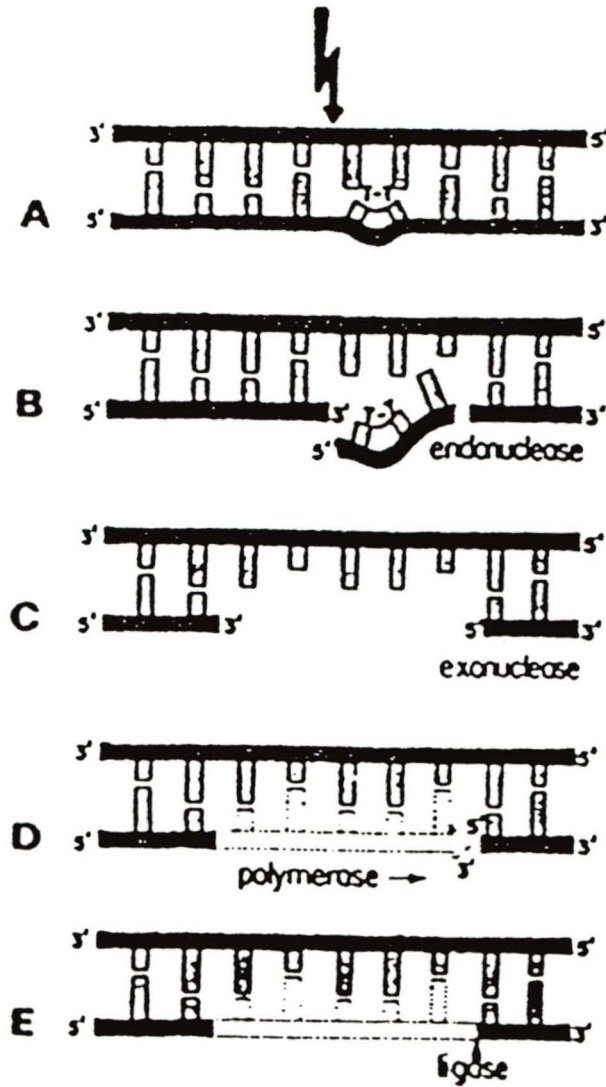


FIGURE 4: Mécanisme de réparation par excision-resynthèse

1.5 RÉPONSE À UN AGENT GÉNOTOXIQUE

La réponse au niveau moléculaire induite par le dommage à l'ADN a été amplement étudiée chez les procaryotes. Chez *Escherichia coli*, un grand nombre de changements physiologiques sont induits par les agents génotoxiques incluant l'activation transcriptionnelle d'une vingtaine de gènes et une augmentation du rendement de la réparation de l'ADN (réponse SOS) (Little et Mount, 1982). Par comparaison, on en connaît beaucoup moins sur la réponse aux lésions de l'ADN chez les eucaryotes.

La réponse à un agent génotoxique chez les cellules de mammifères est complexe. Elle implique une cascade d'événements menant à l'induction de l'expression de plusieurs gènes. Basé sur un bon nombre d'observations, (révisé dans Herrlich *et al.*, 1992 et dans Fornace, 1992) il a été suggéré que le dommage à l'ADN serait la cible initiale pour le déclenchement du processus de la transmission des signaux qui résultent en une activation de gènes. Ces observations sont obtenues par des expériences où des cellules de patients atteints de la maladie Xeroderma pigmentosum sont utilisées. Ces cellules sont déficientes dans les étapes précoces de la réparation par excision resynthèse. Luethy et Holbrook (1992) étudient en particulier le gène *gadd 153* (growth arrest and DNA damage) qui jouerait un rôle dans l'induction et le maintien d'un arrêt de croissance associé avec un dommage à l'ADN. Sachant que l'ARNm de *gadd 153* est augmenté par plusieurs types d'agents endommageant l'ADN, ils ont voulu définir la spécificité de cette réponse induite par un stress génotoxique.

Ils ont construit un gène chimérique contenant un fragment du promoteur de *gadd 153* lié au gène rapporteur CAT et l'on intégré au génome des cellules HeLa. Dans ce cas, les agents qui endommagent l'ADN provoquent une forte activité du promoteur. Mais lorsque le gène chimérique est inséré dans les cellules de Xeroderma pigmentosum, son expression est induite à des doses d'UV d'environ six fois plus basses que celles requises pour une induction similaire dans les cellules HeLa. D'autres études ont aussi montré l'induction de gènes dans les cellules XPA à des doses d'UV plus faibles que celles requises pour obtenir une induction similaire dans les cellules compétentes pour la réparation. Entre autres, de ces gènes appelés les "gènes induits par le dommage à l'ADN" il y a HIV-1 LTR, collagenase, métallothionéine, *gadd 153* (Stein *et al.*, 1989a; révisé dans Herrlich *et al.*, 1992).

Ces gènes induits par le dommage à l'ADN sont associés à différents processus cellulaires incluant la transmission du signal (e.x. facteurs de transcription, certains oncogènes), la transmission de signaux intercellulaires (e.x. cytokines), le contrôle de la croissance (e.x. oncogènes), les réponses aux lésions des tissus (e.x. collagenase), l'inflammation (IL-1, TNF) et la réparation de l'ADN (e.x. RAD2) (Fornace, 1992). Les voies d'induction varient pour les différents gènes. Il y a des gènes qui répondent à un petit spectre d'agents correspondant à une voie de réparation de l'ADN en particulier. Par exemple, le cas HIV LTR qui est activé transcriptionnellement par les rayons UV et les agents qui ont un effet mimant les UV, mais non par les traitements qui imitent

les rayons-X ou les agents alkylants (Valerie *et al.*, 1988). D'autres gènes sont induits par une grande variété d'agents qui endommagent l'ADN et dans plusieurs cas par d'autres types de stress. Un exemple est l'expression de *c-fos* qui est augmentée par des mitogènes, par un choc thermique, par des facteurs de croissance, des ions métalliques, par l'AMP cyclique et par de nombreux agents endommageant l'ADN (Hollander et Fornace, 1989). Un fait commun pour la plupart des gènes induits par le dommage à l'ADN est qu'ils sont aussi hautement induits par les esters de phorbol. Ceci a amené l'hypothèse qu'une protéine kinase C pourrait intervenir dans l'induction de gènes causée par le dommage à l'ADN (Büscher *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1990).

1.6 TRANSMISSION DU SIGNAL

L'existence d'une transmission de signaux à partir du stimulus initial jusqu'à l'effet final a été reconnue pour la première fois par des expériences de fusion cellulaire. Lors d'une fusion entre une cellule traitée et une non traitée, le noyau de la cellule traitée (e.x.. irradiée) envoie des signaux à l'autre noyau (e.x.. non-irradiée) détectés par un gène indicateur (Nomura et Oishi, 1984; Lücke-Huhle and Herrlich, 1987). Ce type d'expérience a apporté l'idée que la transmission des signaux implique le cytoplasme et probablement la cellule entière. L'étude du phénomène de la transmission de signaux est encore très rudimentaire. Essentiellement, on connaît seulement le signal qui génère une cascade d'événements et la réponse finale suivant ces événements.

Pour connaître les protéines régulatrices impliquées dans le processus de la transmission de signaux on doit se rappeler que la régulation des gènes chez les eucaryotes se trouve principalement au niveau des séquences promotrices. En effet, pour les gènes sensibles au dommage à l'ADN pour lesquels une analyse moléculaire a été effectuée, il est établi que ces gènes sont régulés par une modulation de l'activité promotrice (Herrlich *et al.*, 1992). De plus en plus, l'hypothèse est que l'étape finale de la transmission des signaux implique l'activation de facteurs de transcription. Pour définir l'implication des facteurs de transcription dans la transmission des signaux la démarche consiste à délimiter des séquences agissant en cis requis pour la régulation du gène suite au dommage à l'ADN et d'étudier quelles protéines se lient à ces séquences.

L'équipe de Stein a cherché à identifier des séquences agissant en cis requis pour la réponse aux UV (Stein *et al.*, 1989a). Ils utilisent des cellules de patients atteints de Xeroderma pigmentosum du groupe A (XPA). Les cellules provenant de malades XPA sont déficientes dans les étapes précoces de la réparation par excision resynthèse. Ces cellules ont une grande sensibilité aux agents qui endommagent l'ADN et cette hypersensibilité est traduite chez le malade par une apparition de cancers cutanés, de troubles oculaires et même neurologiques (Sarasin *et al.*, 1991). Ils ont d'abord montré que l'expression de gènes induite par les UV est précédée par l'absorption de la radiation UV par l'ADN et de la formation de dommage à l'ADN. Trois gènes dont l'expression est induite par les UV ont été étudiés: le gène HIV-1, le gène de la collagenase et du

proto-oncogène *fos*. Ils trouvent, par des études de délétion du promoteur, que l'activation de ces trois gènes induite par les UV est causée par des éléments du enhancer. Ces éléments lient des protéines agissant en trans: un membre de la famille NF- κ B se lie à l'enhancer du gène de la collagenase; facteurs du sérum p67 et p62 se lient aux séquences promotrices du gène *fos*. De plus, l'activité de liaison des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 est augmentée dans les cellules irradiées aux UV. Cette augmentation dans leurs activités de liaison à l'ADN est due à des modifications post-traductionnelles. En plus, une nouvelle synthèse du facteur AP-1 est induite par une irradiation aux UV.

Donc, ils ont défini des séquences du promoteur qui répondent au stress UV et ont montré que les facteurs de transcription qui se lient à ces séquences sont modulés par les UV.

Une approche, proposée par Herrlich pour identifier les intermédiaires dans le processus de la transmission du signal entre le dommage à l'ADN et l'activation d'un facteur de transcription met en évidence la possibilité d'une relâche de facteurs de croissance préformés qui iraient agir sur leurs récepteurs spécifiques (Herrlich, 1992). Cette interaction induirait le mécanisme de la transmission du signal jusqu'au noyau. Ils ont d'abord remarqué que le milieu de culture des cellules HeLa et des fibroblastes humains irradiés aux UV contenait un facteur (ou un groupe de facteurs). Lorsque ce facteur (ou groupe de facteurs) est mis en présence de cellules non-irradiées, il cause les effets qui évoquent ceux induits par une irradiation directs aux UV. Comme les UV, le

facteur induit la transcription de gènes (collagenase, HIV-1, métallothionéine IIA) et il induit des mutations (Stein *et al.*, 1989b). Ils avaient nommé ce facteur EPIF (extracellular protein synthesis inducing factor). Récemment l'équipe de Krämer (Krämer *et al.*, 1993) a identifié ce facteur (EPIF) sécrété par les cellules HeLa irradiés aux UV: EPIF est un mélange de deux facteurs de croissance, l'interleukine 1 α (IL-1 α) et le facteur de croissance du fibroblaste (bFGF). L'irradiation aux UV augmente aussi la synthèse de ces deux protéines. De plus, des expériences utilisant la suramine (inhibe l'interaction entre le récepteur et le facteur de croissance) et des anticorps dirigés contre IL-1 α et bFGF suggèrent que ces facteurs de croissance sont impliqués non seulement dans la transmission du signal induite par les UV aux cellules non-irradiées, mais qu'ils sont aussi impliqués dans la transcription des gènes induite par les UV dans les cellules irradiées.

Ces découvertes rendent la cascade de signaux induite par les UV très complexe: un signal initié par le dommage à l'ADN qui aboutit par l'activation de facteurs de transcription nucléaires passe par le cytoplasme et la membrane plasmique. Que le processus de transmission des signaux passe par le cytoplasme avait aussi été suggéré par l'équipe de Stein (Stein *et al.*, 1989a) : l'activation d'HIV-1 induite par les UV implique le facteur cytoplasmique NF κ B, qui après une irradiation des cellules est relâché de son inhibiteur I κ B et dirigé jusqu'au noyau.

1.7 BUT DE L'ÉTUDE: MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE L'IMMUNOSUPPRESSION INDUITE PAR LES UV

Le rayonnement ultraviolet provenant du soleil est un carcinogène puissant de par son double pouvoir d'initiateur et de promoteur de tumeur (Baadsgaard, 1991). Son rôle d'initiateur est relié à l'absorption des UV par la molécule d'ADN (Ley *et al.*, 1983), où des modifications à l'ADN peuvent causer la mort cellulaire (Ananthaswamy, 1984), des mutations (Hall et Mount, 1981) ou des transformations chez une variété de cellules, incluant les cellules épidermiques (Ananthaswamy et Kripke, 1981). Le rôle de promoteur est en relation avec la capacité des UV d'altérer la surveillance immunitaire par exemple par l'induction de cellules T suppressives spécifiques à l'antigène des tumeurs induites par les UV (Fisher et Kripke, 1982) (aussi remarquée pour la suppression de l'hypersensibilité de contact (Elmets *et al.*, 1983)). Donc, des études centralisées au niveau moléculaire du processus de suppression de la réponse immunitaire par les UV semblent pertinentes. Certaines suggestions tant d'un point de vue cellulaire que moléculaire ont été envisagées. Par exemple du côté cellulaire, il y aurait une activation de facteurs solubles (e.x. IL-1) après une irradiation aux UV qui seraient impliqués dans la cascade d'effets menant à l'apparition de cellules T suppressives dans la rate (Robertson *et al.*, 1987; Ullrich *et al.*, 1990). Du côté des mécanismes moléculaires, des études sur les opossum (*Monodelphis domestica*) démontrent que le dommage à l'ADN serait impliqué comme événement initiateur du processus menant à la suppression de l'hypersensibilité de contact. Les cellules de ces marsupiaux sont capables de réparer les dimères

cyclobutyliques de pyrimidine induits par les UV par le phénomène de la photoréactivation. Ce mécanisme de réparation implique des enzymes qui se lient à l'ADN et forment un complexe qui absorbe l'énergie des radiations dans le spectre du visible. L'énergie absorbée permet de séparer les dimères et ainsi la lésion est réparée. Une exposition des cellules d'opossum à la lumière visible immédiatement après l'irradiation aux UV empêche l'apparition d'une suppression de l'hypersensibilité de contact induite par les UV (Applegate *et al.*, 1989). Des études récentes de l'équipe de Kripke (Kripke *et al.*, 1992) ont aussi mené à des conclusions semblables. Leur approche expérimentale est d'utiliser des liposomes contenant une enzyme de la réparation par excision spécifique aux dimères pour leur étude *in vivo* du mécanisme moléculaire de l'immunosuppression induite par les UV. Les liposomes appliqués sur la peau irradiées des souris pénètrent dans l'épiderme et à bas pH l'endonucléase est délivrée dans les cellules. Les résultats démontrent une diminution du nombre de dimères de pyrimidine et une absence de suppression immunitaire (hypersensibilité de contact et retardée) après un traitement avec les liposomes. Ils en concluent que la présence de dimères de pyrimidine induits par les UV est l'événement moléculaire primaire menant à la suppression systémique de l'hypersensibilité de contact chez la souris.

1.7.1 MODÈLE D'ÉTUDE

Au niveau de l'épiderme, le kératinocyte est la cellule cible la plus susceptible de provoquer une immunosuppression systémique induite par les UV. Le kératinocyte sécrète une variété de cytokines immunorégulatoires dont l'IL-1. L'interleukine-1 est un des facteurs solubles qui pourrait être impliqué dans l'immunosuppression systémique induite par les UV. L'expression du gène codant pour IL-1 β est augmentée suite à une irradiation aux UV, chez les kératinocytes humains (Kupper *et al.*, 1987). Notre approche consiste à utiliser l'interleukine-1 β comme gène modèle pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de gène induite par les UV.

1.7.2 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

Notre projet a pour but de comprendre les mécanismes moléculaires de l'immunosuppression induite par les UV. De façon plus spécifique notre intérêt se situe au niveau du phénomène d'induction du gène IL-1 β par les UV. Et de façon encore plus spécifique notre étude porte sur le rôle des dommages à l'ADN induits par les UV et du processus de la réparation par excision. Notre hypothèse de travail est que la présence de dommage est le signal initiateur menant à l'activation du gène IL-1 β et que la réparation est un prérequis dans cette induction.

1.7.3 STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE

Notre premier objectif est de déterminer la cinétique pour l'induction du gène de l'interleukine-1. En même temps, nous évaluerons plusieurs doses d'UV et leurs effets sur l'ARNm de l'IL-1 β . Ainsi nous découvrirons la dose la plus susceptible de provoquer une augmentation du contenu en ARNm IL-1 chez le kératinocyte humain en culture. Puis, nous évaluerons la cinétique de réparation pour le gène IL-1 β afin de déterminer l'implication de la réparation par excision dans l'expression du gène IL-1 après une irradiation aux UV. Finalement pour définir le rôle du dommage à l'ADN dans la surexpression du gène de l'IL-1 β induit par les UV nous utiliserons des inhibiteurs de la réparation, soit l'aphidicoline et l'hydroxyurée. L'aphidicoline est un inhibiteur des polymérases α , δ et ϵ alors que l'hydroxyurée est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase. La ribonucléotide réductase est impliqué dans la formation de déoxyribonucléotides dérivés de leurs ribonucléotides correspondants. L'inhibition de la polymérase alpha et delta est renforcée par la présence de l'hydroxyurée puisqu'il n'y a plus de déoxyribonucléotides disponibles pour les polymérases. La présence des inhibiteurs a pour effet de créer des zones de réparation incomplètes de 10 à 30 nucléotides puisque c'est l'étape de polymérisation du brin excisé qui est inhibée.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules utilisées pour cette étude sont des kératinocytes provenant de carcinome épidermoïde humain (A-431) achetées de la compagnie ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont cultivées en monocouche à 37°C avec 5% CO₂ dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Flow Laboratories, Inc.) auquel nous ajoutons 10% (v/v) de FBS (Fetal Bovine Serum, Intergen) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Lors de la préparation du milieu DMEM, nous ajoutons deux antibiotiques, la pénicilline (100 u.i./ ml Glaxo Canada) et la streptomycine (0.1 mg/ml, Allen et Hanburys). La procédure pour le passage des cellules est celle suggérée par ATCC (voir section 2.1.1).

2.1.1 PRÉPARATION DES CELLULES POUR L'IRRADIATION

Les cellules cultivées dans des flacons (250ml) sont décollées suite à un traitement à la trypsine (0.2% v/v, GIBCO) et elles sont recueillies dans des

tubes de polystyrène. Après une centrifugation à 250g un décompte cellulaire est effectué sur le culot obtenu. Les cellules sont distribuées dans des pétris (100 X 20 mm) à une concentration de 1×10^6 cellules/pétri. L'incubation est d'une durée de quatre jours (environ 108 heures). Le jour 0 (zéro) étant le jour du passage de cellules dans les pétris. Au jour quatre, jour de l'irradiation, un pétri est conservé pour un décompte cellulaire.

2.2 STIMULATION DES KÉRATINOCYTES EN CULTURE

2.2.1 CONTRÔLES POSITIFS ET NÉGATIFS

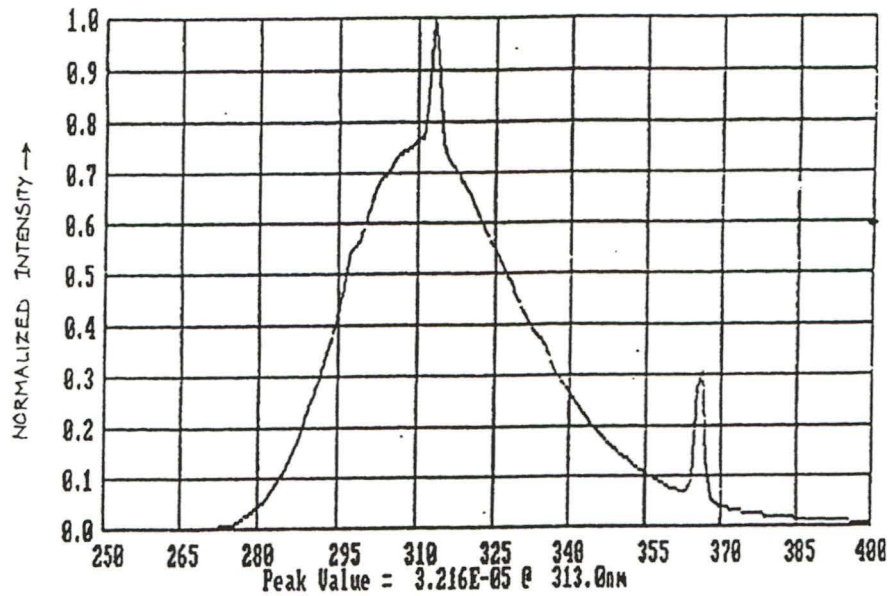
Les cellules servant pour les contrôles sont soumis au même traitement que celles irradiées mis à part l'exposition aux UV. Le milieu est d'abord complètement enlevé, puis 4 ml de ce milieu sont remis dans chaque pétri et finalement les cellules sont incubées. Pour les contrôles positifs, nous ajoutons au volume de 4ml un ionophore, soit l'ionomycine (calcium salt, Calbiochem) à une concentration finale de 10^{-6} M, et un phorbol ester, soit le PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate, Sigma) à une concentration finale de 5ng/ml.

2.2.2 IRRADIATION DES CELLULES

Pour l'irradiation des cellules, un transilluminateur muni de tubes fluorescents (Spectronics Corporation) qui émettent en majorité des radiations dans le spectre des UVB avec une valeur d'intensité maximale à 313 nm est

utilisé. La figure 5 montre le spectre d'émission des lampes UV et le spectre de transmission du filtre ajouté. À l'aide d'un appareil muni d'un détecteur sensible aux UV, nous mesurons, avant chaque expérience, le flux ($\mu\text{W}/0.25 \text{ cm}^2$) émis par les lampes.

a)



b)

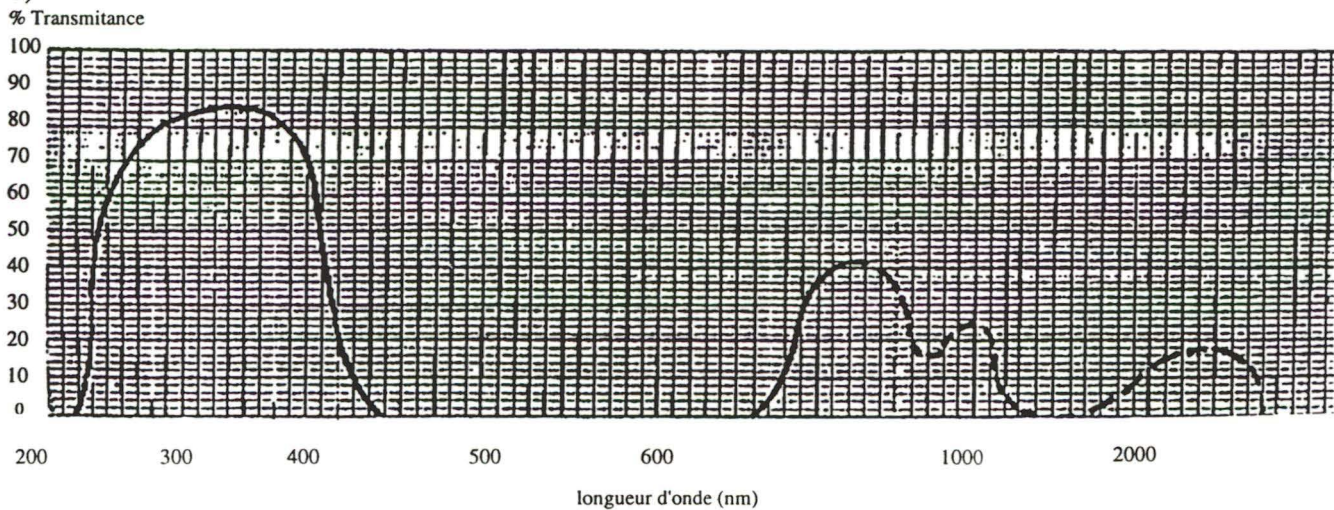


FIGURE 5: Spectre d'émission des lampes UV (a) et de transmission du filtre (b) fourni par la compagnie (Spectronique Corp.).

La valeur d'intensité maximale se situe à 313nm et le filtre absorbe les longueurs d'onde dans le visible.

Les cellules sont exposées aux UVB, en absence de milieu et à travers le couvercle du pétri pour un temps déterminé par la dose totale désirée (J/m^2). Après l'irradiation, seulement 4 ml de milieu DMEM sont remis dans chaque pétri et par la suite une période d'incubation variant selon l'expérience est effectuée à 37°C.

Le fait de garder le couvercle du pétri lors de l'irradiation prévient les cellules à une exposition à des longueurs d'onde inférieures à 290 nm. Un spectre d'absorption du couvercle est montré à la figure 6. Bien que les lampes utilisées n'émettent que très peu de longueurs d'onde inférieures à 290 nm (Figure 5), la filtration totale de ces longueurs d'onde est essentielle puisque des expériences où l'on irradie les kératinocytes sans le couvercle de pétri démontre un très haut taux de mortalité cellulaire. De plus, dans le cadre de nos expériences, les longueurs d'onde dans les UVC ne sont pas désirées. Alors par le spectre du couvercle, nous observons que celui-ci permet d'éliminer toutes les longueurs d'onde inférieures à 290 nm. Finalement, la combinaison filtre et couvercle du pétri permet d'avoir des radiations situées dans les longueurs d'onde allant de $\approx 290\text{nm}$ à $\approx 400\text{nm}$.

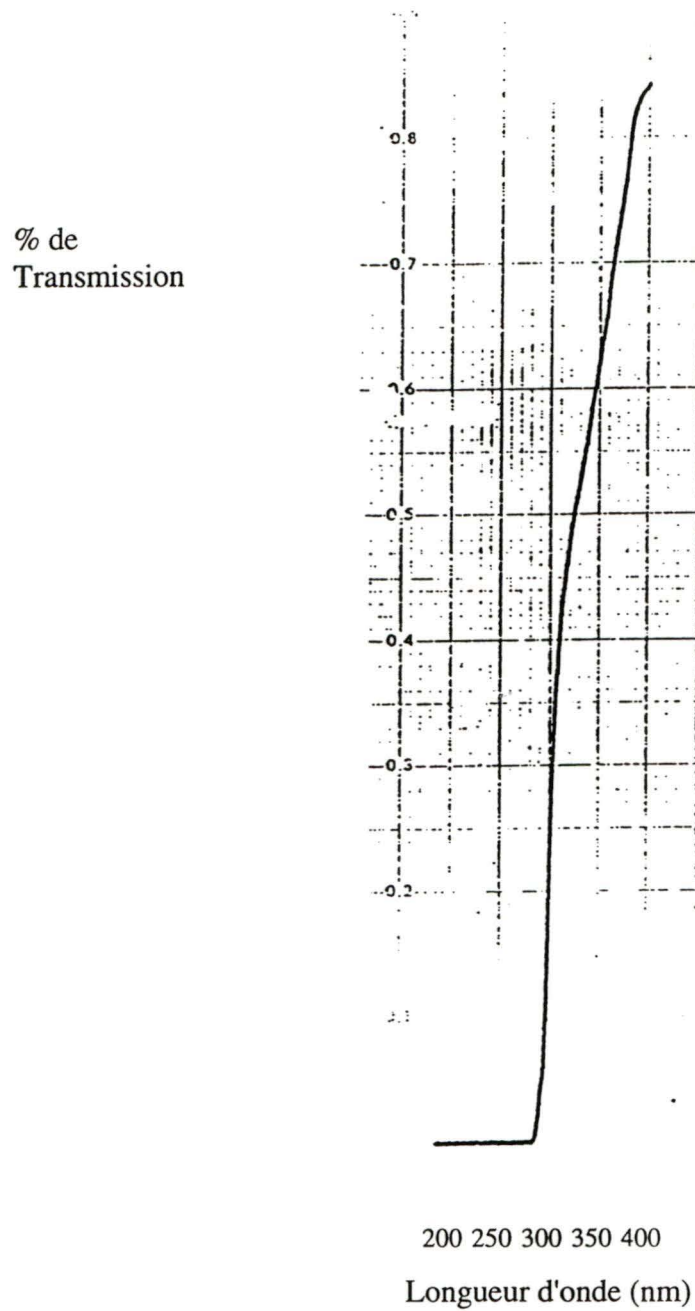


FIGURE 6: Spectre d'absorption (en transmittance) du couvercle de pétri.

2.2.3 STIMULATION DES CELLULES EN PRÉSENCE D'INHIBITEURS DE LA RÉPARATION

Les inhibiteurs de la réparation utilisés sont l'aphidicoline et l'hydroxyurée (Sigma) à une concentration finale de 2.5 ug/ml et 10 mM respectivement. Ils sont ajoutés à 4 ml de milieu DMEM après l'irradiation des cellules. Les cellules sont incubées à 37°C selon le temps désiré. L'action inhibitrice de l'aphidilcholine sur la synthèse réparatrice est efficace à 90%, mais l'étape d'incision se poursuit pendant plusieurs heures même en présence d'inhibiteurs de polymérase (Snyder et al., 1981).

2.3 EXTRACTION DE L'ARN TOTAL

Après la période d'incubation des cellules irradiées et/ou stimulées l'ARN total est extrait selon la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987).

Le milieu est enlevé et les pétris sont rincés avec une solution de PBS 1X¹ (pH 7,4), ce qui élimine l'excédent de milieu et les cellules mortes flottantes. Une solution dénaturante (2ml) composée de guanidinium thiocyanate 4M(Fluka), de sodium citrate 25mM pH 7, de sarcosyl 0.5% et de 2-mercaptoethanol 0.1M est ajoutée directement dans les pétris provoquant l'éclatement des cellules et la solubilisation de l'ARN. Cette solution est laissée en présence des cellules pour une période de 5 minutes et transférée dans des tubes de polypropylène. Puis 0.2ml de sodium acétate 2M pH 4, 2ml de phénol (saturé avec du TRIS 0,5M et

¹La solution PBS 1X est composée de: NaCl 136mM, KCl 28mM, Na₂PO₄ 10mM, KH₂PO₄1.6mM.

1M, pH 8,0) et 0.4ml d'un mélange chloroforme alcool-isoamyl (49:1) sont ajoutés un à un en mélangeant par inversion après chaque addition. Le tout est ensuite bien mélangé au vortex et placé sur la glace pour une période de 15 minutes. Après une centrifugation effectuée à 10 000g pendant 20 minutes et à 4°C, l'ARN est présent dans la phase aqueuse alors que l'ADN et les protéines se retrouvent dans la phase phénolique et à l'interface. La phase aqueuse est soigneusement prélevée (2ml), en prenant garde de ne rien prélever à l'interface, et 1 volume de 2-propanol est ajouté à cette phase. Une incubation à -20°C pour une période d'une heure précipite l'ARN. Une centrifugation faite dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment forme un culot blanc d'ARN encore souillé d'impuretés.

Ce culot est alors dissout avec 0.3ml de la solution dénaturante et transféré dans des tubes "ependorfs". L'ajout d'un volume de 2-propanol et une incubation à -20°C pendant une heure reprécipite l'ARN. Après une centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C le culot est resuspendu avec 1 ml d'éthanol (75%) et sédimenté à nouveau. Le culot est séché pour éliminer toute trace d'éthanol, puis dissout avec une solution de SDS 0.5% (dans l'eau). L'ARN ainsi obtenu est entièrement débarrassé des impuretés et est chauffé à 65°C pour une période de 10 minutes. Ce traitement élimine les structures secondaires de l'ARN et facilite la dissolution de l'ARN. L'ARN peut être directement utilisé ou placé à -80°C.

L'ARN total extrait est quantifié par spectrophotométrie à 260 nm. À partir de la valeur de la densité optique obtenue à 260 nm, la concentration de l'ARN est calculée d'après la corrélation suivante: $1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$. La pureté de l'ARN est vérifiée, entre autres, par spectrophotométrie où le rapport de l'absorbance à 260nm et celle à 280nm doit se situer entre 1.8 et 2.0. Une contamination aux RNase, la "bête noire" de toute extraction d'ARN, sera confirmée grâce à la visualisation de l'ARN rendue possible par l'intermédiaire du bromure d'éthidium utilisé lors de la séparation de l'ARN totale par un gel électrophorèse dénaturant (voir section suivante). Le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases de l'ARN et est activé par fluorescence sous les UV (254nm).

2.4 GEL ÉLECTROPHORÈSE DÉNATURANT

La séparation de l'ARN total (ARNm, ARNt, ARNr) en différentes longueurs est effectuée avec un gel électrophorèse dénaturant. Dénaturant puisque l'ARN forme facilement des structures secondaires et il est essentiel d'être dans des conditions favorisant le maintien d'un ARN simple brin tout au long de l'électrophorèse pour déterminer la longueur des ARN. L'agent dénaturant est la formaldéhyde. Le gel est composé d'agarose (1% p/v) contenant un tampon de migration (1X) et de la formaldéhyde (1,85%). Le tampon de migration est composé de MOPS (3 (N-morpholino) propanesulfanic acid, 20nM), de sodium acétate (5mM) et d'EDTA (0.7mM). 10 μg d'ARN sont déposés dans chaque puit.

Un mélange composé de l'ARN (10 μ g) d'une solution de charge¹ (2 volumes) et d'une solution de bromure d'éthidium 1mg/ml (1 μ l) est chauffé pour une période de 15 minutes à 68°C puis placé dans la glace, avant d'être mis sur gel. Ce traitement assure une dénaturation de l'ARN. La migration de l'ARN s'effectue dans le tampon MOPS 1X à 120mV pour une période d'environ 1 heure 15 minutes (75min.).

Une photographie du gel est effectuée à l'aide d'un appareil Polaroid. La photo démontre deux séries de bandes distinctes qui correspondent à deux types d'ARN ribosomiaux (ARNrs) nommées selon leur coefficient de sédimentation soit le 28s et le 18s. Les ARNrs représentent 95 % de la population d'ARN alors que les ARN messagers (ARNms) représentent que 1%. C'est la raison pour laquelle les ARNms ne sont pas distinctement visibles comme le sont les ARNrs après la séparation de l'ARN total par gel électrophorèse dénaturant.

Aucun standard d'ARN n'est ajouté lors de la migration. La référence est obtenue par les ARN ribosomiaux qui migrent à 5.0 Kb pour le 28s et 2 Kb pour le 18s. Les deux ARNm analysés lors de cette étude sont ceux du gène IL-1 β et GAPDH qui migrent respectivement à 1.8 Kb et 1.6 Kb

¹La solution de charge est composée de: formamide déionisée 50%; MOPS 1X; formaldéhyde 5%; glycérol 7%; bromophénol bleu 1mg /ml.

2.5 BUVARDAGE DE TYPE NORTHERN.

2.5.1 TRANSFERT

Les fragments d'ARN messagers et ribosomaux séparés sur gel d'agarose sont transférés sur une membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham). Pour ce faire, un appareil de transfert sous vide est utilisé (Vacuoblot, Tyler Research Instruments).

Le gel d'agarose est lavé avec de l'eau distillée stérile pour une période d'environ 20 minutes. La membrane de nylon est trempée dans une solution de NaOH 0.05N. Puis la membrane de nylon est soigneusement déposée sur une membrane poreuse et le gel est posé de façon à recouvrir la membrane de nylon. Le vide est appliqué par un système d'aspiration de l'eau du robinet. L'ajustement du vacuum est fait avec un régulateur de pression branché directement à l'appareil de transfert. (Tyler Research Instruments).

La solution de NaOH 0.05N est ajoutée sur le gel d'agarose tout juste pour le recouvrir et est rajouté au besoin tout au long du transfert d'une durée de 3 heures. Une fois le transfert terminé, la membrane de nylon est rincée 3 fois dans une solution SSC 2X¹. Cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter une fixation de l'ARN sous les UV. L'ARN chargé négativement se lie à la membrane de nylon chargée positivement (liaison ionique). La présence du NaOH lors du transfert fixera l'ARN de façon covalente à la membrane de nylon.

¹La solution SSC 2X est composée de: NaCl 300mM, Sodium citrate 330 mM.

Il est très important de bien rincer avec le SSC 2X afin de neutraliser le NaOH excédent sur la membrane. Cette précaution est réalisée dans le but de prévenir une liaison covalente lors de l'hybridation de la sonde radioactive avec l'ARN qui peut amener des problèmes lors de la déshybridation.

2.5.2 PRÉ-HYBRIDATION ET HYBRIDATION DU FILTRE DE NYLON.

Afin d'éviter l'attachement non-spécifique de la sonde radioactive, le filtre est incubé pour une période de 4 heures à 68°C avec agitation constante dans un sac de plastique scellé, contenant 15ml d'une solution de préhybridation¹. Le filtre est ensuite incubé pour une période de 12 heures à 68°C dans 5ml d'une solution d'hybridation² contenant 20×10^6 cpm d'une sonde radioactive. La sonde est préalablement dénaturée à 100°C pour une période de 5 minutes.

Après l'hybridation, la radioactivité retenue de façon non-spécifique sur la membrane est éliminée par 3 lavages successifs: un premier lavage dans une solution SSC 2X pour une période de 20 minutes à la température de la pièce et sans agitation. Un deuxième lavage, dans une solution de SSC 0.1X + 0.1% SDS pour une période de 60 minutes à 68°C avec agitation constante. Finalement, le troisième lavage n'est qu'un rinçage de la membrane dans une solution de SSC 0.1X à la température de la pièce.

Le filtre est exposé à -80°C sur un film Kodak XAR-S en présence d'écrans intensifiants pour une période variant selon l'intensité du signal. L'intensité du signal est quantifiée par densitométrie (Ultrascan XL, Pharmacia LKB).

Lorsqu'une déshybridation est nécessaire la membrane est trempée dans une solution de 0.1% SDS chauffée à 100°C et laissée à la température de la pièce jusqu'à ce que la solution soit refroidie.

2.6 PRÉPARATION D'UNE SONDE RADIOACTIVE

2.6.1 ISOLEMENT PRÉPARATIF DU FRAGMENT D'ADN

Le plasmide YEpsec1 est un vecteur de sécrétion dérivé du vecteur d'expression de levure pEMBLyex2 (Baldari *et al.*, 1987). La figure 7 illustre la carte du vecteur YEpsec1. Le cDNA codant pour les acides aminés 121 à 269 de l'IL-1 β humain (Auron *et al.*, 1984) est cloné au site de restriction BamH1 situé juste en amont de la séquence du peptide "leader" de la toxine de YEpsec. Alors le nouveau clone sera le plasmide YEpsec1-h11 à partir duquel il est possible d'extraire un fragment d'ARN de l'IL-1 β de 600pb en coupant aux sites de restriction SmaI et BamH1.

	¹ Solution de pré-hybridation: [finale]	² Solution d'hybridation [finale]
Tris ph 7.4	120mM (6mL)	120mM (6mL)
NaCl	600mM	600mM
EDTA	8mM	8mM
Na ₄ PP	0.1%	0.1%
SDS	0.2%	0.2%
Héparine	100 μ g/ml	625 μ g/ml

Le plasmide YEpsec1-hIL-1 β obtenu de la compagnie ATCC est inséré dans la souche bactérienne *E. coli* HB 101 qui est amplifié dans un milieu LB. Une extraction plasmidique (d'après la méthode décrite par Maniatis; Maniatis et al. 1989) est réalisée. Après une centrifugation de la culture bactérienne, le culot est resuspendu avec une solution de Tris 25mM pH8, EDTA 10mM et glucose 50mM. Puis une solution de lyse contenant du NaOH 0.2N et du SDS 1% est ajoutée. Une solution de potassium acétate (pH 4.8) est additionnée au mélange précédent et une centrifugation à 10 000g est effectuée. Puis une extraction au phénol chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol de la phase aqueuse donne un culot d'ADN plasmidique obtenu après une dernière centrifugation.

Une digestion de l'ADN plasmidique avec les endonucléases de restriction BamH1 et SmaI à 37°C pour une période de 12 heures est effectuée afin d'obtenir un grand fragment de 8.9Kb et un fragment de 0.6Kb. Cet ADN de 600pb codant pour le gène de l'IL-1 β est d'abord séparé sur gel d'agarose 1% pour ensuite être purifié par la méthode de GENE CLEAN (BIO 101 Inc.). Cette technique est basée sur l'attachement de l'ADN à des billes de silice afin d'éliminer les contaminants tels que protéines, ARN, chloroforme, phénol, bromure d'éthidium. L'ADN débarrassé de ces impuretés est élué avec de l'eau puis dosé sur un pètri d'agarose (1%) et bromure d'éthidium (67 μ g/ml) par comparaison avec un ADN standard de sperme de saumon.

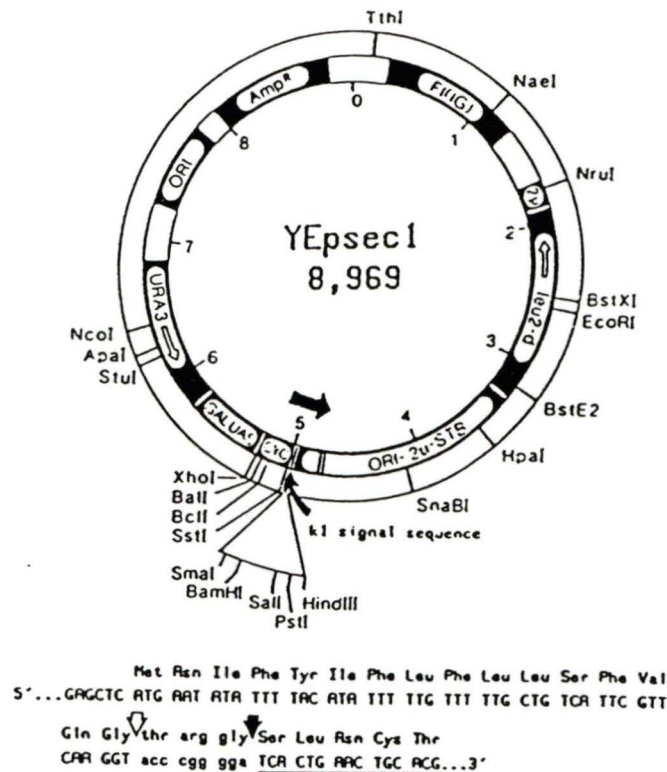


FIGURE 7: Carte du vecteur de sécrétion YEpsc1 montrant les sites de restrictions uniques.

La flèche indique la direction de la transcription et la double ligne représente le signal de terminaison et de polyadénylation du gène FLP. La séquence du peptide "leader" de la toxine k. lactis (K1 signal séquence) et la jonction entre la séquence signal et le cDNA de l'IL-1 β cloné dans YEpsc1 sont reportées dans la partie du bas. Le site de clivage hypothétique pour le peptide de la toxine est montré par la flèche pleine tandis que la flèche unique indique le site de clivage déterminé expérimentalement. La séquence (début) de l'IL-1 β est soulignée.

Un cDNA codant pour la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) humain est aussi utilisé comme sonde. Cette sonde est un cadeau provenant de Claude Asselin Ph.D (Université de Sherbrooke). Une digestion enzymatique au site de restriction Pst1 donne un fragment d'ARN de GAPDH de 1000 pb purifié par la méthode de GENE CLEAN.

2.6.2 MARQUAGE AU $^{32}[\alpha\text{P}]$ dCTP DE LA SONDÉ (cDNA)

La sonde est préparée à l'aide du système "Multiprime DNA labelling" développé par Feinberg et Vogelstein (1983) et manufacturé par Amersham. Cette technique implique le marquage d'une séquence d'ADN simple brin par le fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*.

Le marquage se fait dans le mélange réactionnel suivant: 20 à 30ng du fragment d'ADN, préalablement dénaturé 5 minutes à 100%; 10 μ l d'un tampon contenant les déoxyribonucléotides dGTP, dATP, dTTP; 5 μ l d'un tampon contenant des amorces aléatoires synthétique et de l'eau distillée de façon à compléter le mélange à un volume final de 50 μ l; 5 μ l de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 μ Ci/ μ l, 3000 Ci/mmol Amersham) et 2 μ l du fragment Klenow de l'ADN polymérase 1 d'*E. coli*. La réaction se fait pendant 4 heures à la température de la pièce. L'incorporation à l'ADN de la cytosine marquée est évaluée à l'aide d'un compteur beta. L'incorporation de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP est mesurée par précipitation de l'ADN en présence de TCA (10%) sur filtre 3M. Le pourcentage d'incorporation est calculé par le rapport des coups incorporés sur les coups totaux et donne des valeurs qui se situent aux environs de 40%.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 DÉTERMINATION DES CONTRÔLES NÉGATIFS ET POSITIFS

Pour notre étude, nous avons utilisé le gène IL-1 β comme gène modèle. Les kératinocytes humains expriment l'ARNm de l'IL-1 β en absence de stimulation (Kupper *et al.*, 1987). En effet, quelques expériences préliminaires ont démontré un niveau de base d'ARNm d'IL-1 β sans stimulation. La figure 8 démontre les niveaux d'ARNm de l'IL-1 β pour des temps en culture des kératinocytes de 48, 72, 78, 84, 96, et 108 heures. Le niveau d'ARNm est déterminé par l'extraction de l'ARN total des cellules après chacun des temps en culture, puis l'analyse par buvardage de type Northern. Après 48 heures de culture, les A431 ont un haut niveau de base de l'ARNm de l'IL-1 β . En augmentant le temps en culture des cellules, nous avons observé une diminution du contenu en ARNm de l'IL-1 β . Étant donné que les expériences futures seront basées sur l'effet de différents stimuli sur le messenger du gène IL-1 β , il est

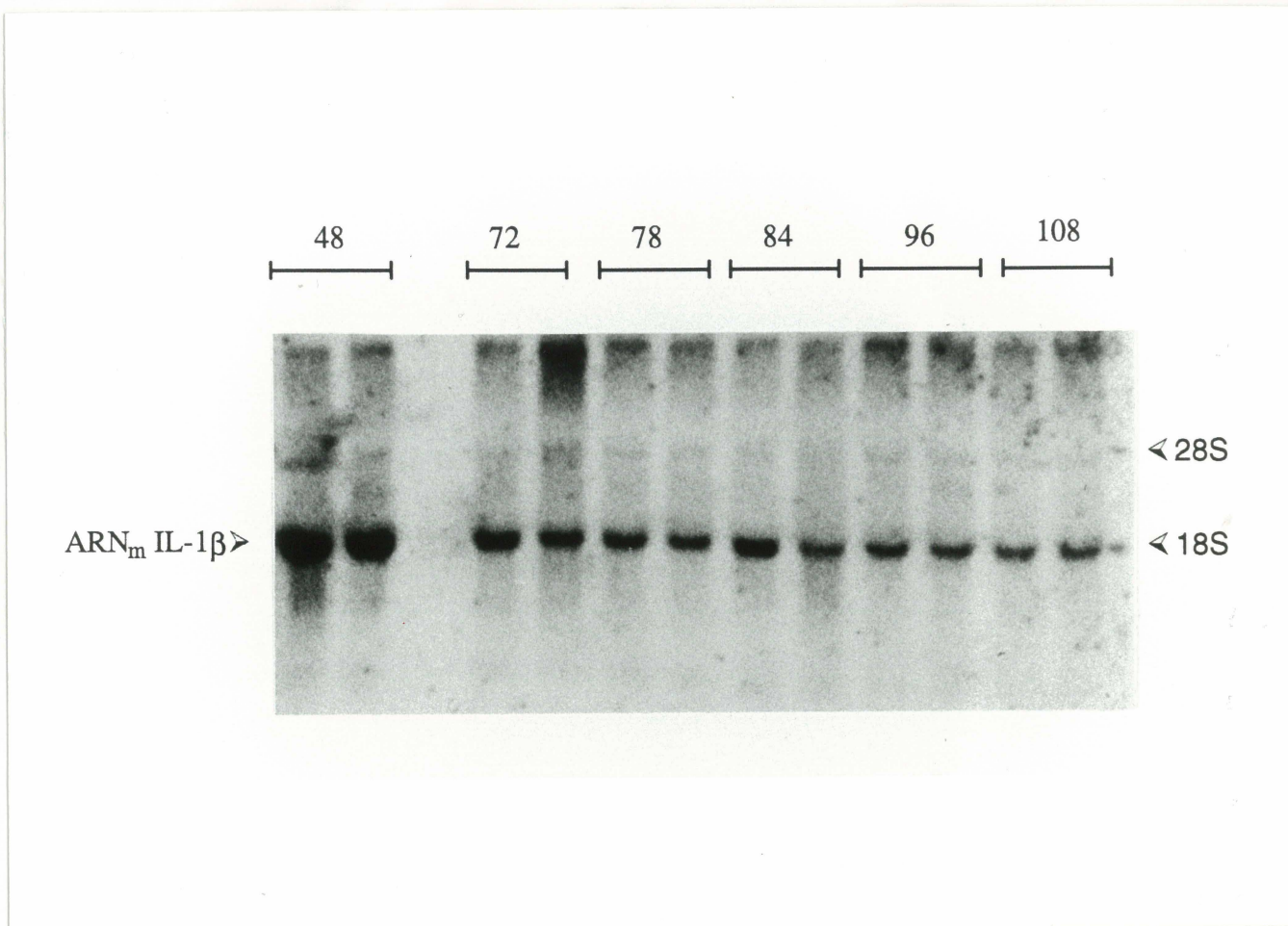


FIGURE 8: Contenu en ARN_m de l'IL-1β suivant le temps en culture de la lignée des kératinocytes A 431.

L'ensemencement initial est de $1,6 \times 10^6$ cellules par pètri. Les cellules sont incubées à 37°C pour une période de temps variant de 48 heures à 108 heures. % des kératinocytes en cultures pour tous les temps en culture: entre 96% et 99%. Le temps dédoublement = 24 heures. 108 heures de culture correspond à environ 70% de confluence. 48 heures de culture correspond au tout début de la phase log. L'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1β marqué au ^{32}P . 10µg d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un pètri et elles sont regroupées selon le temps (en heure) d'incubation des cellules. Cette expérience a été réalisée une fois.

avantageux de choisir un temps de culture qui amène un faible niveau de base d'ARNm d'IL-1 β afin de mieux voir une augmentation de ce niveau d'ARNm. Nous avons choisi un temps en culture de 108 heures qui servira comme temps de référence avant toutes stimulations. De plus, après 108 heures de culture le niveau d'ARNm de l'IL-1 β est stable ce qui élimine une bonne partie des variations entre les pétris et entre les expériences. Ainsi, nous avons déterminé un contrôle négatif fiable.

Kupper *et al.* (1987) a aussi montré qu'un phorbol ester, le PMA, augmente l'ARNm d'IL-1 β (7 fois plus de messagers que les cellules (HFR) non traitées au PMA).

À la figure 9, trois concentrations de PMA sont évaluées, soit 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, sur le contenu en ARNm d'IL-1 β . Pour chacune de ces concentrations nous ajoutons un ionophore soit l'ionomycine (1 μ M). L'ARN total est extrait des cellules puis analysé par buvardage de type Northern. Toutes les concentrations de PMA ont induit une augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β en présence d'ionomycine. La concentration la plus faible (5 ng/ml) augmente de façon suffisante le contenu en ARNm d'IL-1 β (selon l'analyse par densitométrie effectuée pour la figure 10 cette augmentation est de 4.2 fois) et est donc choisie pour les prochaines expériences où le PMA et l'ionomycine serviront de contrôle positif.

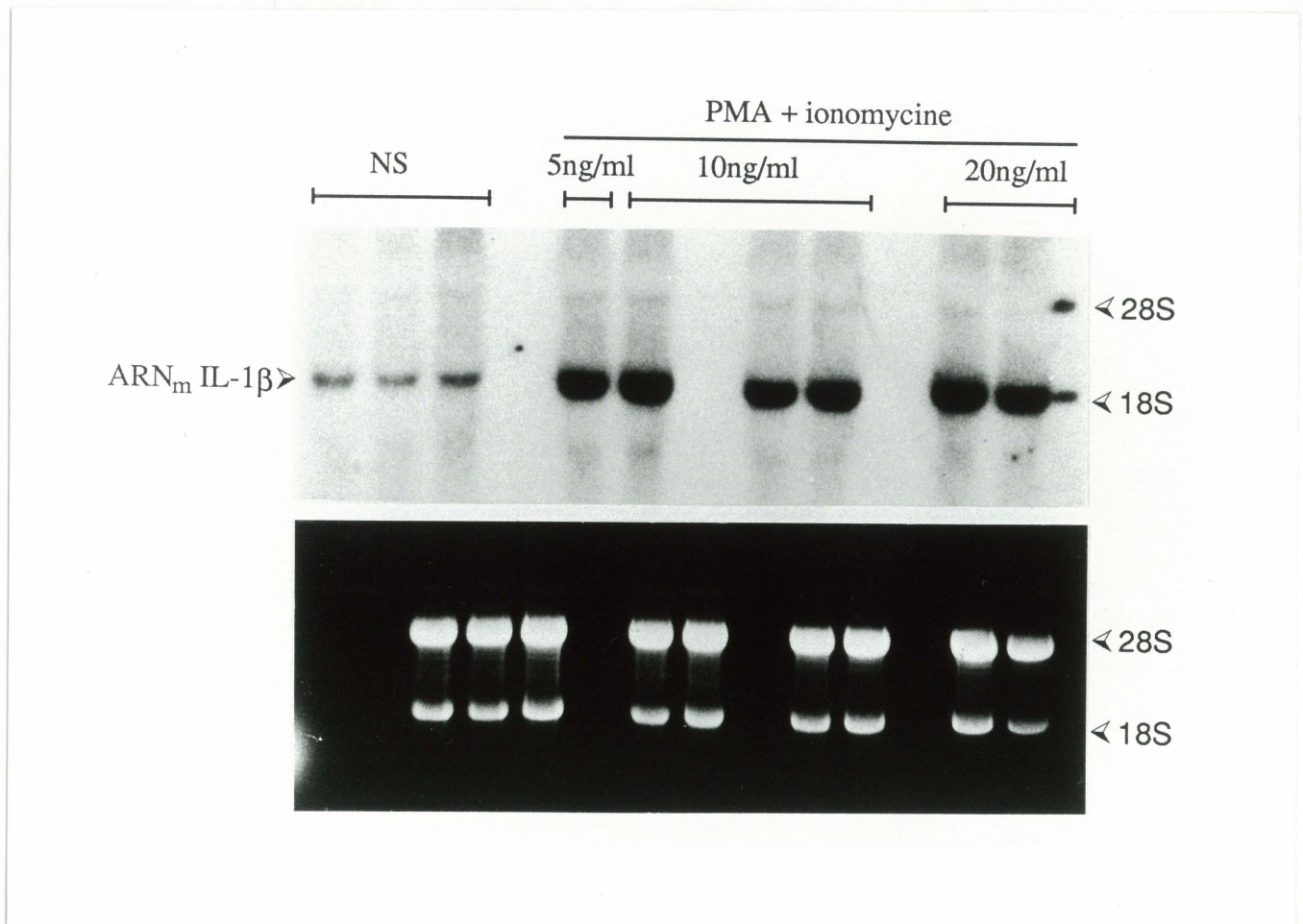


FIGURE 9: Stimulation des kératinocytes en culture avec le PMA et l'ionomycine.

Les cellules sont stimulées avec le PMA plus ionomycine (1µg/ml) et incubées pour une période de 6 heures. L'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1β marqué au ³²P. 10µg d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un puits et elles sont regroupées selon la concentration de PMA. La photo du gel électrophorèse dénaturant est présentée et montre les deux formes principales d'ARN ribosomiaux, 28s et 18s. Cette expérience a été effectuée une fois.

Nous avons aussi déterminé le laps de temps nécessaire pour observer un effet du PMA sur l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β (figure 10). Les cellules sont stimulées avec l'ionomycine et/ou le PMA. Après des périodes d'incubation allant de 1 heure à 6 heures, l'ARN cellulaire total, est extrait puis analysé par buvardage de type Northern. Deux heures d'incubation des cellules en présence de PMA plus ionomycine suffisent pour observer une augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β . Cette augmentation se maintient jusqu'à 6 heures. Selon l'analyse par densitométrie, à 2 heures nous avons 3.5 fois plus de messagers d'IL-1 β alors qu'à 6 heures c'est 4.2 fois plus d'ARNm d'IL-1 β qui est observé. À la figure 10 nous démontrons aussi l'effet d'un ajout d'ionomycine et de PMA. L'ionomycine est un ionophore; il provoque une entrée de Ca⁺⁺ dans la cellule, ce Ca⁺⁺ intracellulaire active la PKC. Ainsi le PMA et indirectement l'ionomycine induisent la PKC pour une transduction du message jusqu'au noyau plus efficace. L'analyse par densitométrie des autoradiogrammes indique que 1.7 à 2.3 fois plus d'ARNm d'IL-1 β est détecté lorsqu'on combine le PMA avec l'ionomycine. Cette combinaison est alors fortement appréciée dans le sens où nous obtenons un contrôle positif sans équivoque.

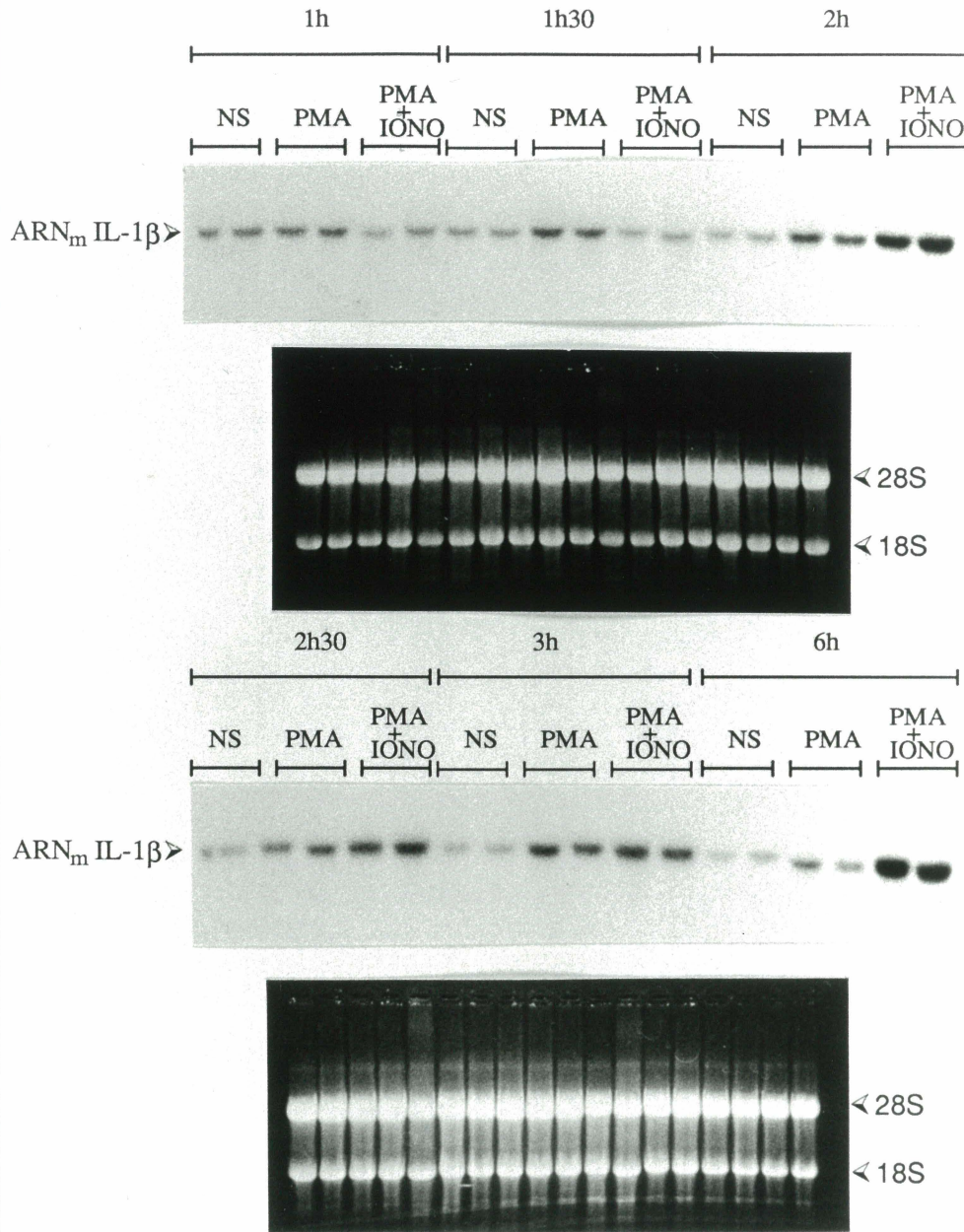


FIGURE 10: Cinétique d'augmentation du niveau d'ARNm de l'IL-1 β après une stimulation au PMA.

Les cellules sont non stimulées (NS), stimulées avec PMA ou avec PMA plus ionomycine et incubées pour des temps de 1, 1.5, 2, 2.5, 3 et 6 heures. L'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marqué au ^{32}P . Chaque bande correspond à un pétri (6×10^6 cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation. $10 \mu\text{g}$ d'ARN/puit. La photo du gel électrophorèse dénaturant est présentée et montre les deux formes principales d'ARN ribosomiaux, 28s et 18s. Cette expérience, répétée deux fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

3.2 EFFET DES RADIATIONS ULTRAVIOLETTES SUR LE MESSAGER DU GÈNE IL-1 β CHEZ LES KÉRATINOCYTES EN CULTURE.

3.2.1 CINÉTIQUE DE L'INDUCTION DU GÈNE IL-1 β

Les effets des UV sur l'expression du gène IL-1 β chez les kératinocytes ont déjà été étudiés. Selon Kupper *et al.* (1987) des doses de 200 ou 300 J/m² et une incubation après irradiation de 6 heures sont les paramètres les plus efficaces pour observer une augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β . À partir de ces données, nous avons d'abord évalué la réponse de nos kératinocytes en culture (A431) face à une irradiation aux UVB. Nous avons étudié des doses d'UVB allant de 125 J/m² à 1000 J/m² et des temps d'incubation après irradiation de 1 heure jusqu'à 12 heures. (Figure 11, 12, 13 et 14). L'ARN total des cellules irradiées est extrait puis analysé par buvardage de type Northern.

Les faibles doses (125 et 250 J/m²) ne provoquent pas d'augmentation de l'expression de l'IL-1 β pour aucun temps après irradiation. La majorité du temps, c'est plutôt une diminution du niveau de base de l'ARNm de l'IL-1 β qui est observée (Figure 12, 13,14 et 15). C'est à 6 heures que cette diminution est la plus significative soit de 2 fois moins d'ARNm IL-1 β à 125 J/m² (Fig. 13) et 2.5 (Fig. 15) à 3.5 (Fig. 13) fois moins pour une dose de 250 J/m².

Une dose de 500 J/m² a un léger effet sur le messager d'IL-1 β pour un temps d'incubation de 3 heures après l'irradiation (1.4 fois plus). À 6 heures,

c'est une forte diminution de messenger d'IL-1 β (2.5 fois moins) alors qu'à 12 heures on observe aussi une diminution d'expression d'IL-1 β mais beaucoup moins importante (1.6 fois moins).

C'est avec une dose de 1000 J/m² que l'on démontre le plus grand effet sur l'expression du gène de l'IL-1 β . Une augmentation du messenger de l'IL-1 β de l'ordre de 2.8 fois par rapport aux cellules non-irradiées est observée pour un temps d'incubation de 6 heures. À 3 heures, cette augmentation est moins marquée soit de l'ordre de 1.7 fois.

En résumé, un temps d'incubation après irradiation de 1 heure démontre aucun effet des différentes doses d'UVB sur le niveau de l'ARNm d'IL-1 β (Figure 11). À 3 heures, les doses de 500 J/m² et de 1000 J/m² induisent une légère augmentation, un peu plus prononcée pour 1000 J/m² (Figure 12).

À 6 heures, uniquement une dose de 1000 J/m² provoque une augmentation de l'ARNm d'IL-1 β , alors que pour les autres doses d'UV nous observons plutôt une diminution du messenger IL-1 β (Figure 13).

À 12 heures, l'expression de l'ARNm d'IL-1 β est très peu modulée par les UV; de petites diminutions d'expression pour les doses de 125, 250 et 500J/m², alors qu'à une dose de 1000 J/m² une très légère augmentation de l'ARNm d'IL-1 β est remarquée (Figure 14).

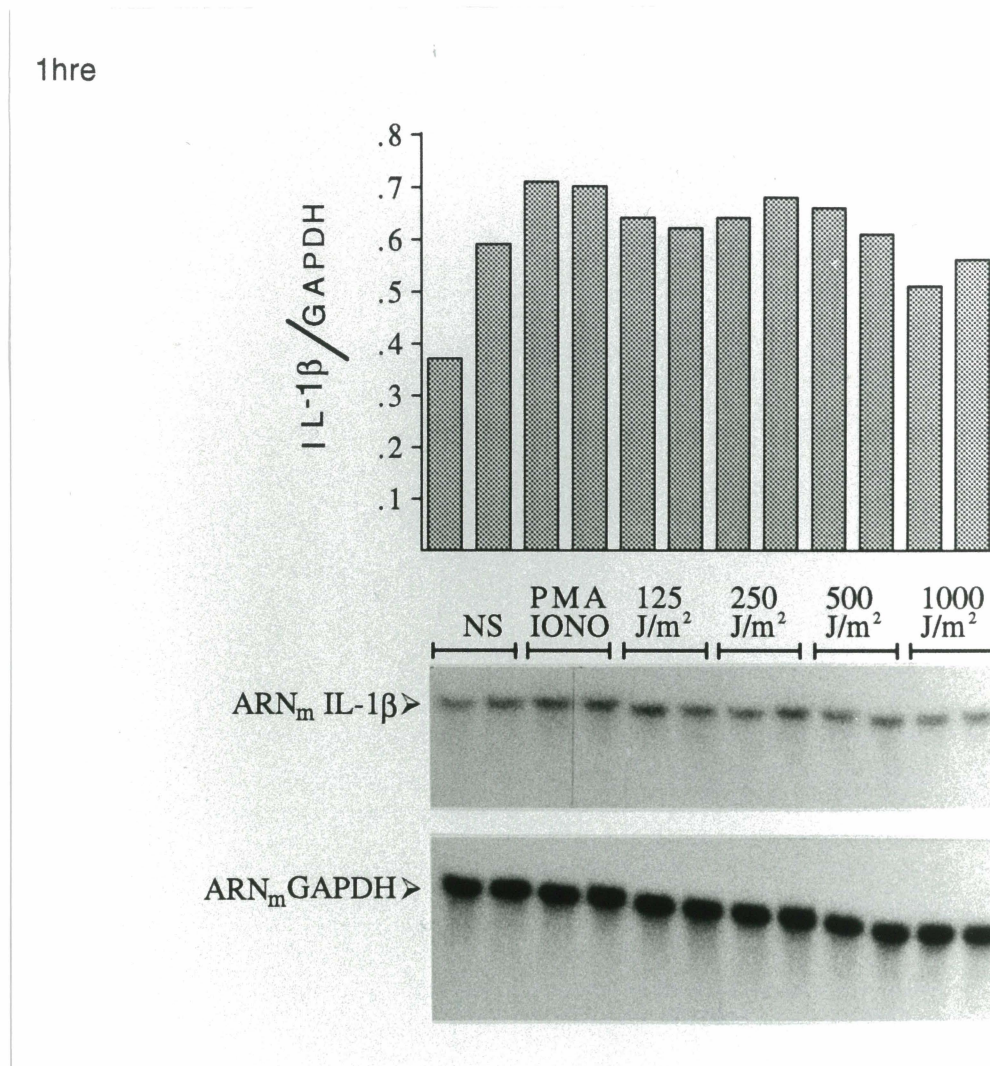


FIGURE 11: Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARN_m de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 1 heure.

L'ARN total des cellules non-stimulées (NS), irradiées à différentes doses d'UVB ou stimulées avec le PMA plus ionomycine est extrait et hybridé avec un cDNA de l'IL-1 β humain marqué au ³²P. Chaque membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. 10 μ g d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un puits (8x10⁶ cellules/puits) et elles sont regroupées d'après le type de stimulation. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience, répétée trois fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

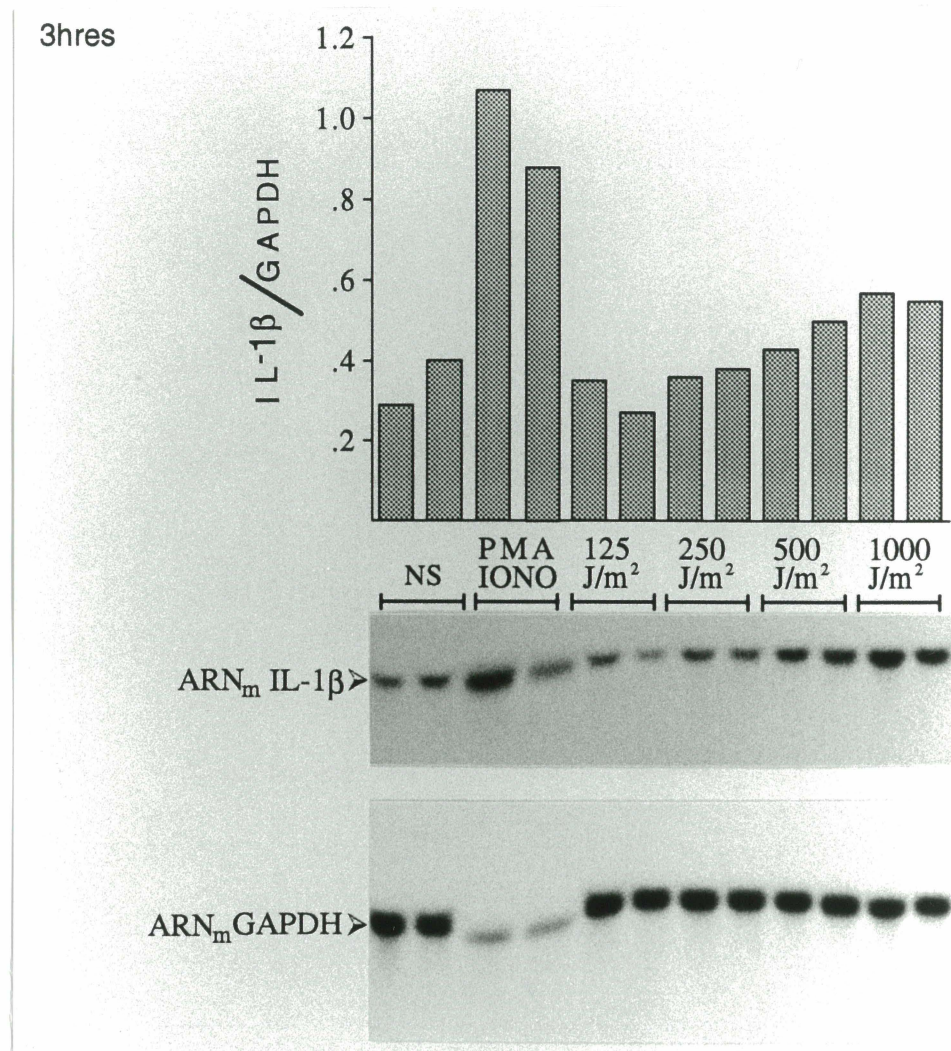


FIGURE 12: Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARN_m de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 3 heures.

L'ARN total des cellules non-stimulées (NS), irradiées à différentes doses d'UVB ou stimulées avec le PMA plus ionomycine est extrait et hybridé avec un cDNA de l'IL-1 β humain marqué au ³⁰P. Chaque membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. 10 μ g d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un pétri (6.5x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées d'après le type de stimulation. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience, répétée cinq fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

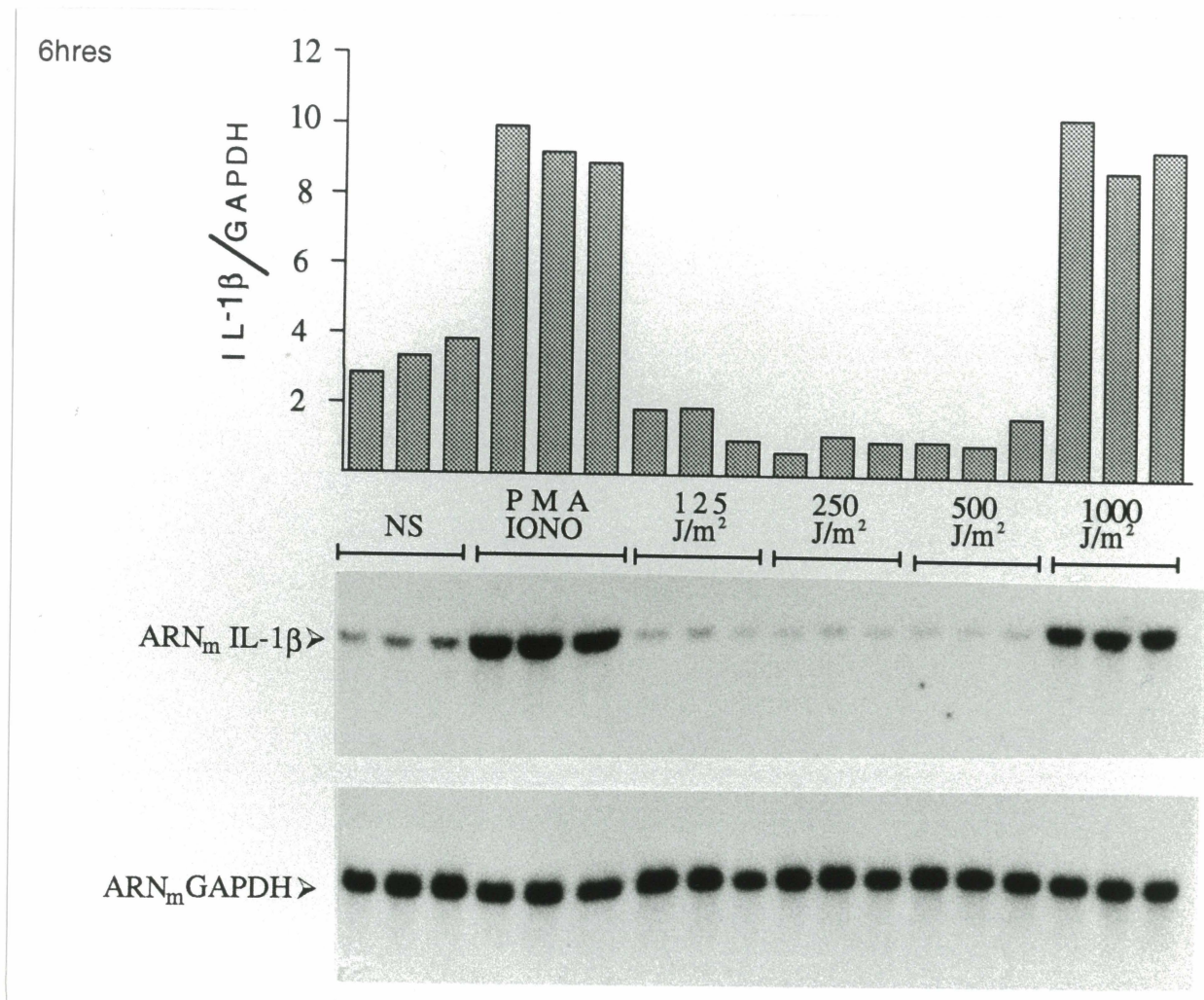


FIGURE 13: Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARN_m de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 6 heures .

L'ARN total des cellules non-stimulées (NS), irradiées à différentes doses d'UVB ou stimulées avec le PMA plus ionomycine est extrait et hybridé avec un cDNA de l'IL-1 β humain marqué au ³⁰P. Chaque membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. 10 μ g d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un pétri (9x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées d'après le type de stimulation. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience, répétée sept fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

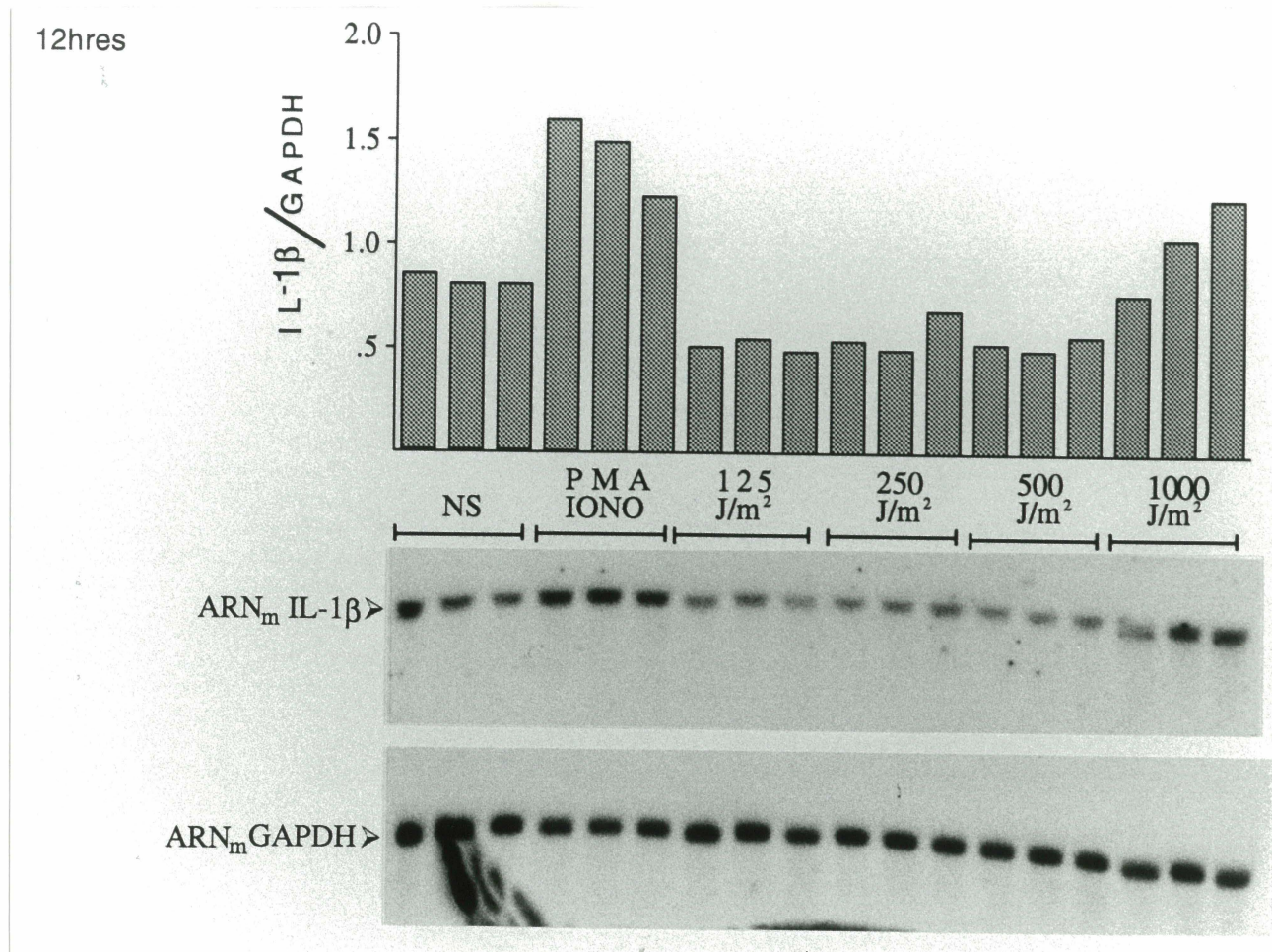


FIGURE 14: Effet des rayons ultraviolets sur le niveau d'ARN_m de l'IL-1 β chez les kératinocytes en culture pour un temps après irradiation de 12 heures .

L'ARN total des cellules non-stimulées (NS), irradiées à différentes doses d'UVB ou stimulées avec le PMA plus ionomycine est extrait et hybridé avec un cDNA de l'IL-1 β humain marqué au ³⁰P. Chaque membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. 10 μ g d'ARN/puit. Chaque bande correspond à un pétri (9x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées d'après le type de stimulation. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience, répétée deux fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

Le tableau 4 montre la viabilité des A431 après des irradiations à des doses différentes d'UVB pour des temps après irradiation de 6 et 24 heures. Les pourcentages ont été calculés à partir du nombre total de cellules vivantes avant irradiation et du nombre de cellules vivantes après irradiation. Pour un temps après irradiation de 6 heures, les doses de 250 et 500 J/m² ont peu ou pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Pour les doses plus élevées, 750 et 1000 J/m² il y a au moins 42% de mort cellulaire. La majeure partie des cellules mortes se retrouvent dans le milieu de culture puisque le pourcentage de mortalité effectué sur les cellules adhérees est de 4 à 6% (non montré). C'est donc dire que l'ARN total extrait des cellules provient presque entièrement de cellules vivantes puisque le milieu cellulaire est jeté lors de l'extraction de l'ARN. Une incubation des cellules après irradiation d'une durée de 24 heures a un effet beaucoup plus marqué sur la viabilité des cellules. En effet, la plus petite dose, soit 250 J/m², provoque une mortalité cellulaire de 65% et une dose de 1000 J/m² ne laisse que 5% de cellules vivantes adhérees après 24 heures d'incubation. Ce temps n'est jamais utilisé dans nos expériences.

Tableau 4: Pourcentage des cellules adhérees et vivantes après des irradiations à des doses d'UV différentes.

	UVB (J/m ²)				
	NI	250	500	750	1,000
6 hres	100%	100%	94%	57%	58%
24 hres	100%	35%	33%	13%	5%

La totalité des cellules adhérees est trypsinisée (0.2%), centrifugée à 1000rpm et comptée au microscope à l'aide d'un hémacytètre.

Après avoir démontré qu'une forte augmentation de l'expression d'IL-1 β est induite par une dose d'UV de 1000J/m² pour une période d'incubation de 6 heures après irradiation, nous nous sommes demandés quels effets auraient des doses d'UV plus élevées sur l'ARNm d'IL-1 β . À la figure 15 nous démontrons qu'à partir de la dose de 1000 J/m², à mesure que nous avons augmenté la dose d'UV, le niveau d'ARNm diminue. L'allure globale de la réponse du niveau d'ARNm en fonction de la dose prend la forme d'une cloche. Nous observons que les doses extrêmes (250 et 2500 J/m²) ont pour effet de diminuer l'ARNm d'IL-1 β à un niveau beaucoup plus bas que celui des cellules non-irradiées (45% moins de messenger pour une dose de 250 J/m² et pour 2500 J/m² c'est 28% moins de messenger) .

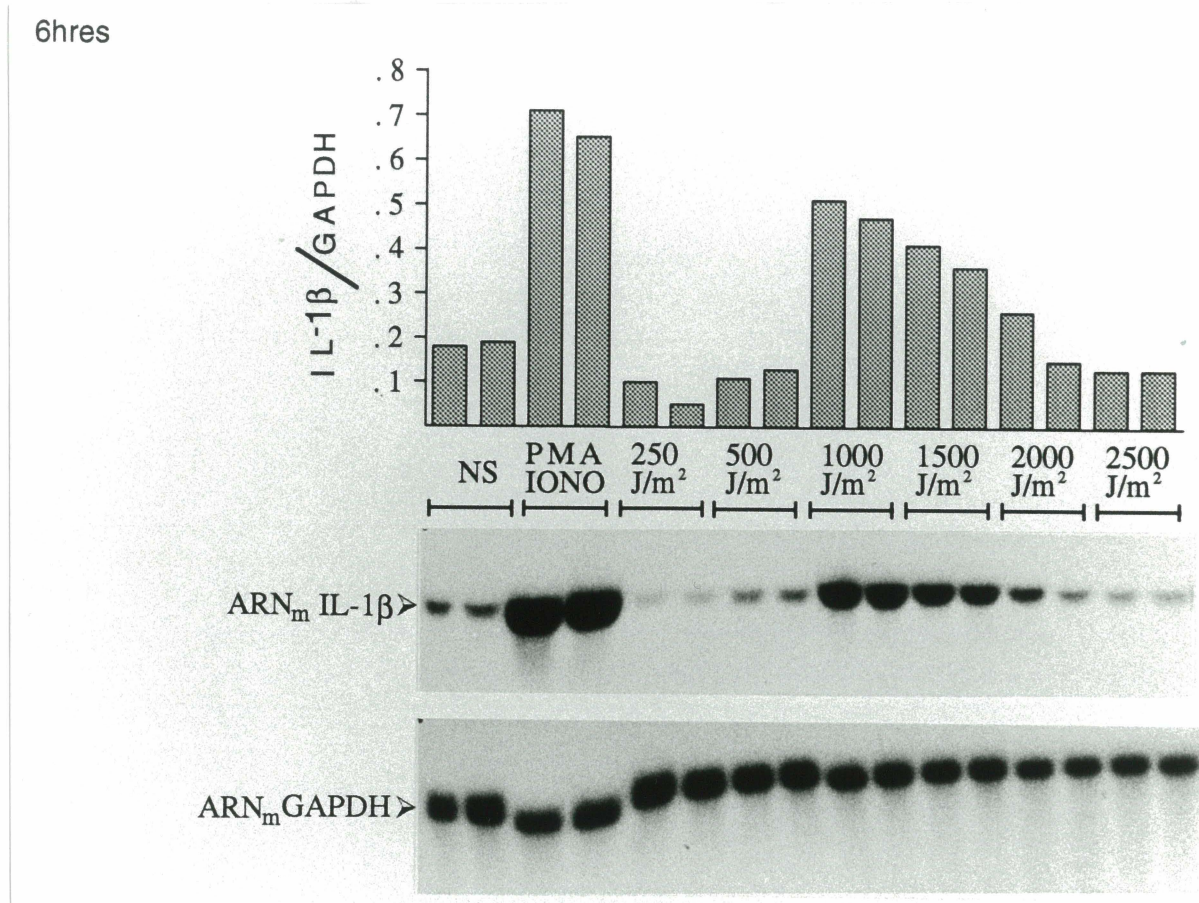


FIGURE 15: Expression de l'ARN_m de l'IL-1 β en fonction de la dose d'UV.

Les cellules A431 sont non-stimulées (NS), stimulées avec PMA plus ionomycine ou irradiées à différentes doses d'UVB puis incubées pour une période de 6 heures. L'ARN est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marquée au ³²P. La même membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. Chaque bande correspond à un pétri (6.5x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation. 10 μ g d'ARN/puit. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience a été effectuée une fois.

Pour toutes ces expériences (Figure 11, 12, 13, 14 et 15) où différentes doses d'UV sont utilisées pour démontrer un effet des radiations sur le contenu en ARNm de l'IL-1 β , nous avons vérifié si l'expression du gène GAPDH est modulée par les UV. Le niveau de l'ARNm du GAPDH varie très peu d'une dose d'UV à l'autre, les doses de 1000 J/m² et plus où nous observons une diminution du messager du gène GAPDH (pas remarquée pour toutes les expériences).

Une fois ces expériences préliminaires complétées nous nous tournons vers notre principal intérêt qui est de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la modulation de l'expression de gène, dans notre cas le gène de l'IL-1 β , induit par une irradiation aux UV. Nous avons mis le focus de notre étude sur l'implication de la formation de dommages dus aux UV sur la molécule d'ADN. Étant donné qu'un dommage sur l'ADN implique automatiquement toute une machinerie d'enzymes capables de réparer ce dommage, nous portons aussi notre étude sur le rôle de la réparation de l'ADN dans l'expression de gène IL-1 β suite à une exposition aux UV des kératinocytes.

3.2.2 CINÉTIQUE DE RÉPARATION

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la cinétique de la réparation du gène IL-1 β après l'induction de dommages à l'ADN par les UV. Notre démarche s'est étalée en 3 étapes: premièrement en se référant à l'expérience de la figure 10, nous avons retenu que le temps nécessaire pour observer un effet stimulateur du PMA plus l'ionomycine sur l'expression de l'IL-1 β est de 2 heures; deuxièmement, nous voulons trouver une dose d'UV capable de bloquer cet effet du PMA plus ionomycine. Pour cette expérience, nous utilisons différentes doses d'UV et pour ces mêmes doses d'UV, le PMA plus ionomycine sont ajoutés immédiatement après l'irradiation. La période d'incubation après ces traitements est de 2 heures, temps nécessaire pour observer un effet du PMA plus ionomycine sans irradiation des cellules (figure 16). Nous considérons qu'une dose de 1000J/m² empêche suffisamment l'induction de l'expression de l'IL-1 β car nous cherchons une dose capable d'inhiber l'effet du PMA sans toutefois être en présence d'une dose d'UV trop élevée qui provoquerait un trop grand nombre de dommages à l'ADN. L'inhibition de l'effet stimuloire du PMA plus ionomycine sur le messenger d'IL-1 β est de l'ordre de 33%, selon l'analyse par densitométrie.

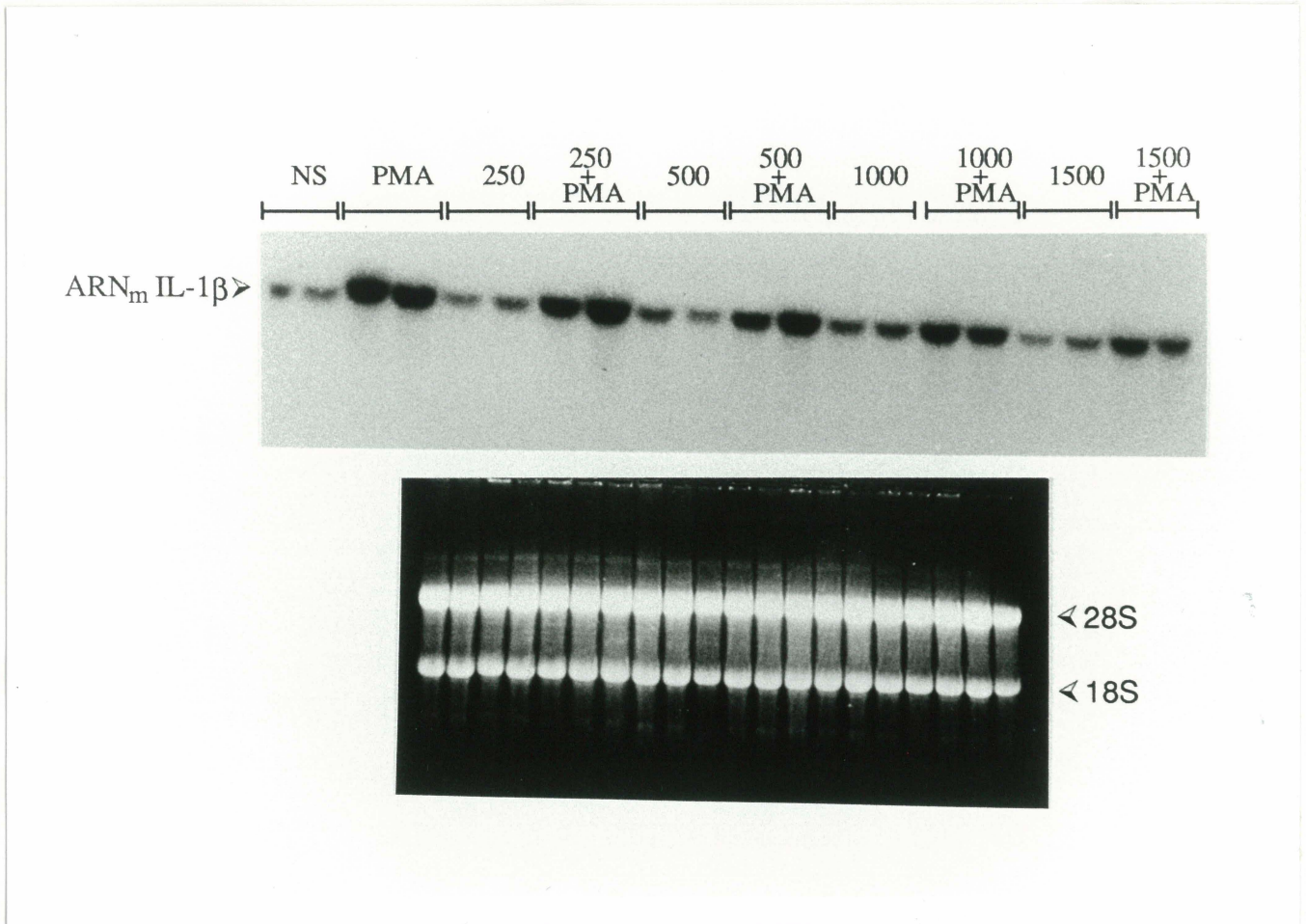


FIGURE 16: Dose d'UVB capable d'inhiber l'effet stimulant du PMA.

Les cellules A431 sont non stimulées, stimulées au PMA plus ionomycine ou irradiées à différentes doses d'UVB avec ou sans PMA plus ionomycine et incubées pour une période de deux heures. L'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marqué au ^{32}P . Chaque bande correspond à un pétri (7×10^6 cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation. $10 \mu\text{g}$ d'ARN/puit. La photo du gel électroporèse dénaturant est présentée et montre les deux formes principales d'ARN ribosomiaux, 28s et 18s. Cette expérience, répétée deux fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

Troisièmement, à partir de ces données, nous sommes en mesure d'évaluer la cinétique de la réparation du gène IL-1 β (Figure 17). Pour ce faire nous irradiions les cellules à une dose de 1000J/m². Puis nous incubons les cellules pour des périodes de 1, 2, 3, 4 et 6 heures. Pendant ces temps d'incubation les processus de la réparation de l'ADN sont en action. Après chacun de ces temps nous traitons les cellules avec le PMA plus ionomycine. Finalement, nous incubons les cellules pour une période de 2 heures (laps de temps nécessaire pour observer un effet du PMA). L'ARNm cellulaire total est extrait et analysé par buvardage de type Northern. Nous remarquons qu'un temps de 4 heures après une irradiation de 1000J/m² suivi d'un traitement au PMA plus ionomycine donne un temps de réparation suffisamment long pour rétablir un niveau d'expression de l'IL-1 β similaire à celui observé avec le PMA plus ionomycine seul. Après 6 heures, nous démontrons que le niveau d'expression d'IL-1 β est le même pour une irradiation seule et pour une irradiation suivie d'un traitement au PMA plus ionomycine.

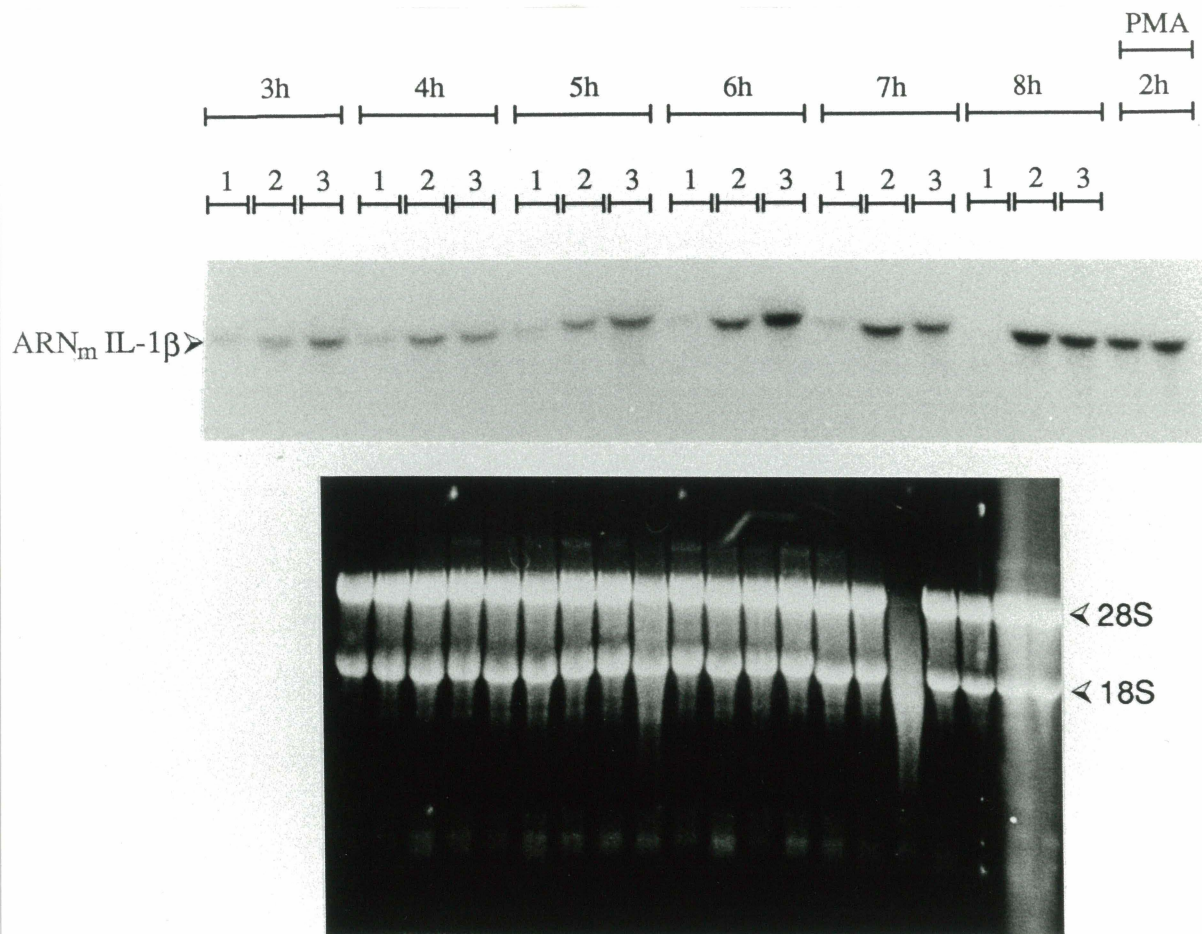


FIGURE 17: Cinétique de réparation du gène IL-1 β .

Les cellules A431 sont: 1- non stimulées et incubées pour des périodes de 3,4,5,6,7 et 8 heures; 2- irradiées avec une dose de 1000 J/m² et incubées pour des périodes de 3,4,5,6,7 et 8 heures; 3- irradiées avec une dose de 1000 J/m², incubées pour des périodes de 1,2,3,4,5 et 6 heures, stimulées avec le PMA plus ionomycine et incubés pour une période de deux heures. Les cellules sont aussi stimulées avec le PMA plus ionomycine et incubées pour une période de deux heures (deux dernières bandes, contrôle positif). L'ARN total des cellules est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marqué au ³²P. Chaque bande correspond à un pétri (7x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation. 10 μ g d'ARN/puit. La photo du gel électrophorèse dénaturant est présentée et montre les deux formes principales d'ARN ribosomiaux, 28s et 18s. Cette expérience, répétée deux fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

3.2.3 INHIBITEURS DE LA RÉPARATION

En second lieu, l'utilisation d'inhibiteurs de la réparation est envisagée dans le but de déterminer si la réparation par excision est un pré-requis pour l'induction du gène IL-1 β . Une combinaison de deux inhibiteurs est utilisée soit l'aphidicholine (2.5 μ g/ml), inhibiteur de la polymérase α , δ et ϵ , et l'hydroxyurea (10mM), inhibiteur de la ribonucléotide réductase. La présence des inhibiteurs a pour effet de créer des zones de réparation incomplète de 10 à 30 nucléotides puisque c'est l'étape de polymérisation du brin excisé qui est inhibée (voir mécanisme de réparation par excision-resynthèse dans l'introduction, p.24). Les inhibiteurs sont ajoutés immédiatement après l'irradiation. Après une période d'incubation de trois ou six heures l'ARN total des cellules est extrait puis analysé par buvardage de type Northern avec une sonde radioactive spécifique au messenger de l'IL-1 β .

Comme il a été déterminé par les expériences précédentes, les temps d'incubation de trois et six heures sont retenus pour évaluer l'effet des inhibiteurs de la réparation sur le messenger du gène IL-1 β .

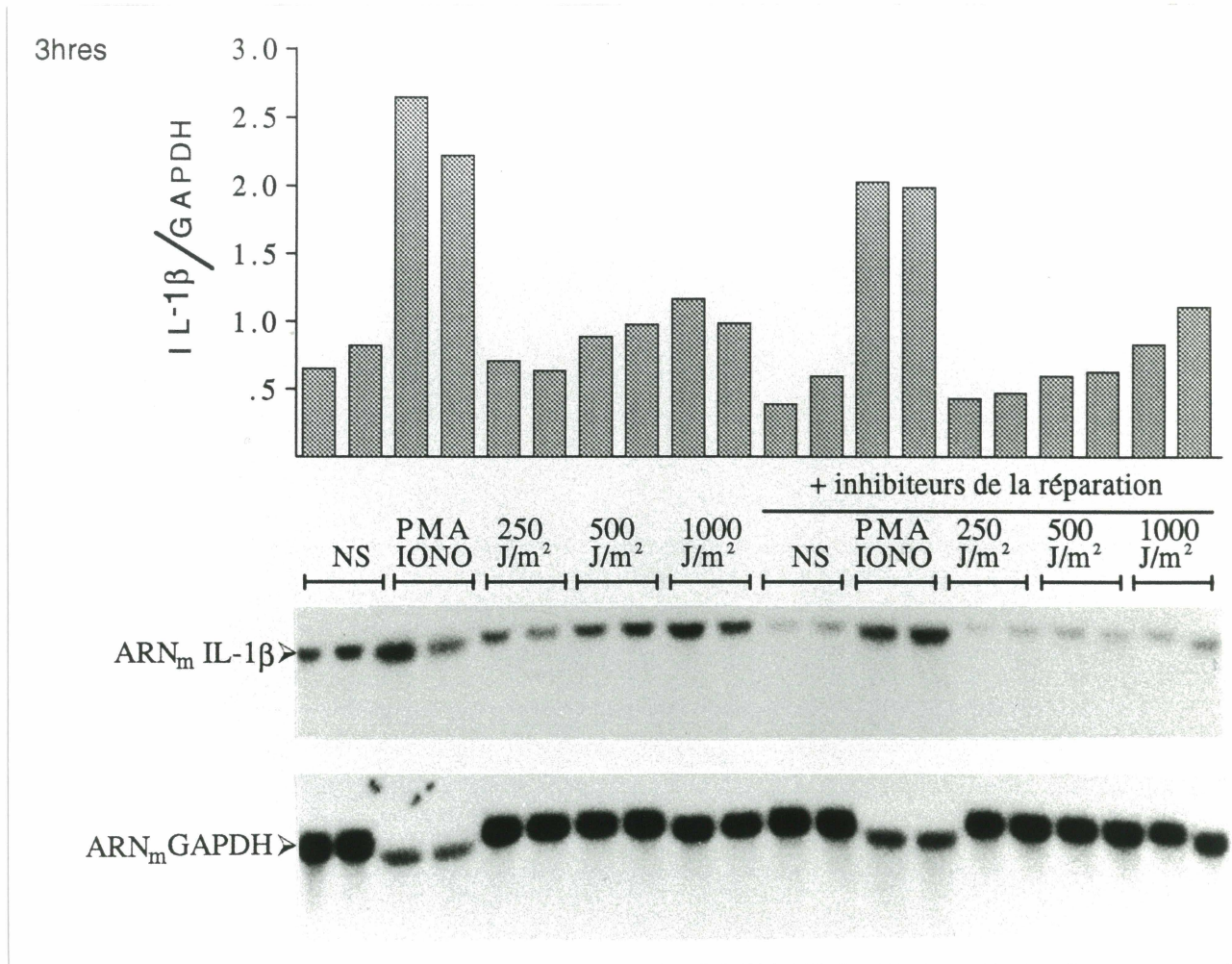


FIGURE 18: Effet des inhibiteurs de la réparation sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β pour un temps après irradiation de 3 heures.

Les cellules A431 sont non-stimulées (NS), stimulées avec PMA plus ionomycine ou irradiées à différentes doses d'UVB avec ou sans inhibiteurs de la réparation. Après un temps d'incubation de 3 heures l'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marqué au ³²P. La membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. Chaque bande correspond à un pétri (6x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation 10 μ g d'ARN/puit. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience a été répétée une fois.

Pour un temps de 3 heures après l'irradiation, la figure 18 montre que les inhibiteurs ont provoqué une diminution du niveau d'ARNm de l'IL-1 β pour toutes les doses d'UV analysées par comparaison avec une irradiation seule. Par contre, la présence des inhibiteurs seuls diminue le niveau de base de l'ARNm de l'IL-1 β . Alors nous ne pouvons pas conclure que les inhibiteurs modulent l'effet des UV sur le niveau d'ARNm.

Pour un temps de 6 heures après l'irradiation nous avons observé que la présence des inhibiteurs n'a pas le même effet selon la dose d'UV (Figure 19). Une dose d'UV de 1000J/m² combinée avec les inhibiteurs de la réparation a pour effet de bloquer l'induction du messager du gène IL-1 β observée avec une irradiation de 1000J/m² seule. À des doses de 250 et de 500J/m² où on observe peu ou pas d'augmentation de l'expression avec une irradiation seule, l'effet des inhibiteurs est de provoquer une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β .

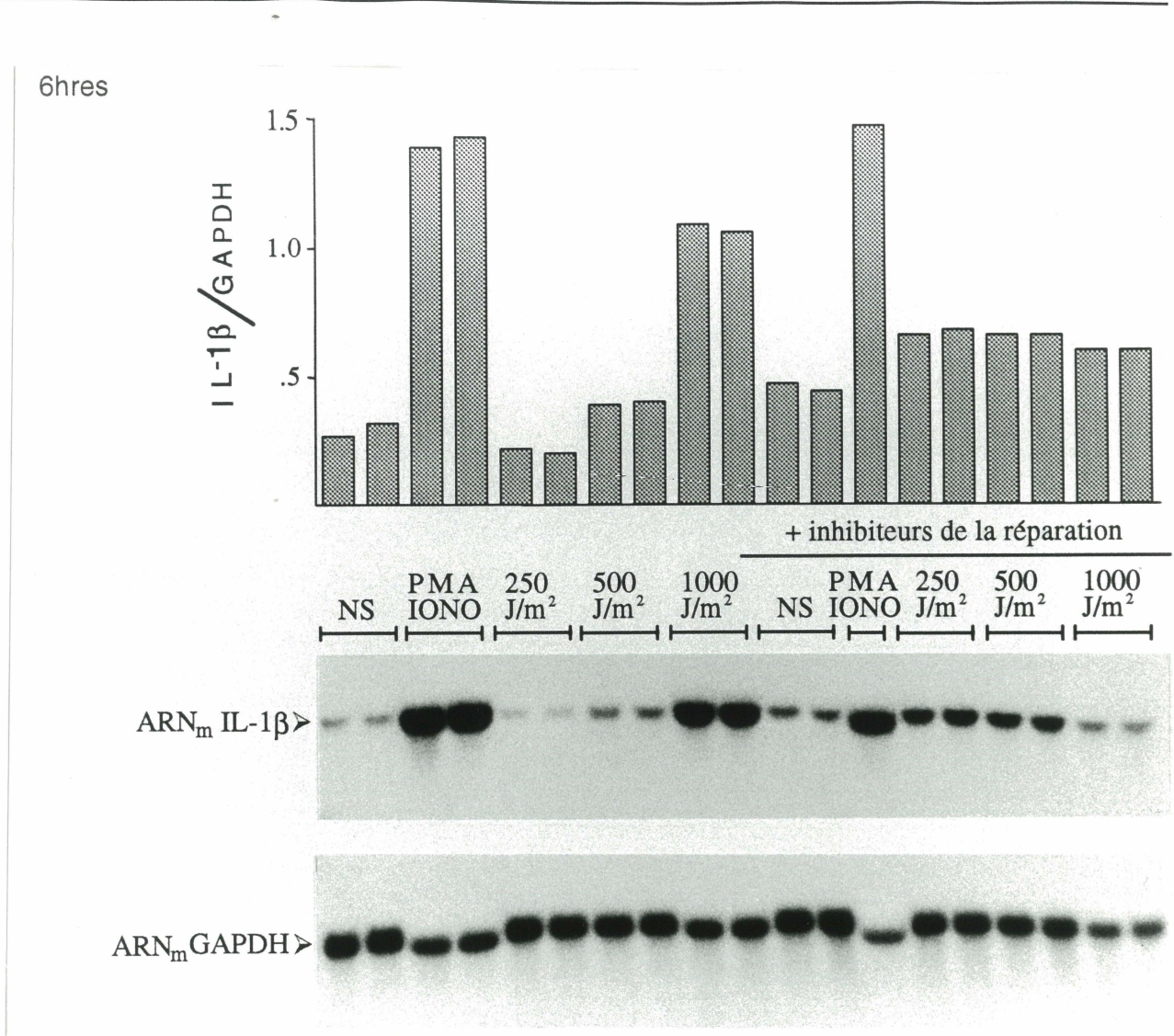


FIGURE 19: Effet des inhibiteurs de la réparation sur le niveau d'ARNm de l'IL-1 β pour un temps après irradiation de 6 heures.

Les cellules A431 sont non-stimulées (NS), stimulées avec PMA plus ionomycine ou irradiées à différentes doses d'UVB avec ou sans inhibiteurs de la réparation. Après un temps d'incubation de 6 heures l'ARN total est extrait et analysé par buvardage de type Northern avec un cDNA de l'IL-1 β marqué au ³²P. La membrane est ré-hybridée avec une sonde GAPDH. Chaque bande correspond à un pétri (6x10⁶ cellules/pétri) et elles sont regroupées selon le type de stimulation. 10 μ g d'ARN/puit. Les données sont aussi présentées sous forme d'histogramme (partie supérieure) où chaque bloc est le rapport IL-1 β sur GAPDH en unité de densitométrie. Cette expérience, répétée deux fois, est représentative de l'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions.

Une mise au point doit être apportée sur certaines figures (fig. 12, 15, 18 et 19) qui démontrent un niveau anormalement bas d'ARNm du gène GAPDH. Dans ces expériences, nous remarquons d'après le dosage que la quantité d'ARN totale est très basse pour tous les pétris où les cellules sont stimulées au PMA plus ionomycine. De même, les membranes hybridées avec la sonde GAPDH démontrent que le niveau d'ARNm est dégradé. Des expériences pour trouver la cause de ce problème nous ont indiqué qu'un haut taux de mortalité cellulaire est observé avec les cellules traitées avec le PMA plus ionomycine. Les cellules stimulées avec le PMA seulement ont démontré un bon taux de viabilité. Le problème se situait au niveau de la solution d'ionomycine qui s'est concentré par l'évaporation de l'acétone (solvant dans lequel l'ionomycine est dilué).

Nous tenons aussi à amener une certaine mise en garde face à l'analyse par densitométrie. Bien que cette méthode soit très utile comme élément de comparaison, il ne faut pas la considérer comme une analyse quantitative totalement précise puisque nous ne pré-exposons pas nos autoradiogrammes. Une pré-exposition du film a l'avantage d'établir une relation linéaire entre l'intensité du signal sur l'autoradiogramme et la quantité de radioactivité de l'échantillon. En omettant de pré-exposer le film nous nous retrouvons avec une relation de type sigmoïdale (Sambrook *et al.*, 1989). Donc un signal de forte intensité est la plupart du temps sous estimé alors qu'un signal de faible intensité est sur-estimé (s'il est de très faible intensité il risque d'être sous-estimé).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Les rayons UVB ont des effets sur la transcription de plusieurs gènes dans une variété de cellules. Le gène codant pour l'IL-1 β en est un exemple et a servi de modèle pour cette étude. *In vivo*, chez la souris et chez l'humain il a été montré qu'une activité de l'IL-1 est présente au niveau de la couche cornée et des cellules épidermiques (Garhing *et al.*, 1985; Hauser *et al.*, 1986). Une exposition aux UVB induit une augmentation de la production de l'IL-1 par le kératinocyte (Ansel *et al.*, 1983). Les effets des UV sur la transcription du gène IL-1 n'ont pas encore été démontrés, *in vivo*. Les cultures primaires de kératinocytes humains et murins, de même que les lignés cellulaires de kératinocytes et de carcinomes squameuses, produisent tous une forme active de l'IL-1 (Luger *et al.*, 1983; Sauder, 1985), et les ARNm de l'IL-1 α et de l'IL-1 β sont présents dans les kératinocytes en culture. *In vitro*, les effets des UV tant sur la production que sur la transcription de l'IL-1 ont été étudiés. Les UVB augmentent la production (Ansel *et al.*, 1983) et l'expression de l'IL-1 (Kupper *et al.*, 1987) chez les kératinocytes humains en culture.

La compréhension du mécanisme moléculaire menant à l'induction de la transcription du gène IL-1 induite par les UV est le point central de cette étude.

4.1 CINÉTIQUE DE L'INDUCTION DU MESSAGER DE L'IL-1 β

À partir des données de Kupper (Kupper *et al.*, 1987), nous voulons d'abord établir les bases de notre étude par la mise en évidence que les kératinocytes humains en culture ont leur niveau d'ARNm de l'IL-1 β augmenté par une irradiation aux UVB. C'est par la cinétique de l'induction du gène IL-1 que nous avons trouvé une dose d'UV (1000 J/m²) et un temps après irradiation (6 heures) qui induisent une réponse maximale, évaluée par le niveau d'ARNm. En effet, aucune dose plus faible (125, 250, 500 J/m²) ou plus élevée (1500, 2000, 2500 J/m²) ni aucun temps plus court (1 et 3 heures) ou plus long (12 heures) évalués dans cette étude parvient à produire une réponse aussi forte que celle observée avec ces deux paramètres.

Nous avons émis l'hypothèse que la présence de dommages sur la molécule d'ADN est le signal initiateur et que la réparation par excision est un pré-requis pour l'induction de la transcription du gène IL-1 β . Notre interprétation face au type de réponse obtenu lors des expériences sur la cinétique pour l'induction du gène IL-1 β est qu'il semble exister une interdépendance entre la dose et le temps après irradiation. La dose d'UV de 1000 J/m² induit un certain nombre de dommages dans tout l'ADN entre autres dans le gène IL-1. Selon le

temps de réparation (i.e. le temps après irradiation) ces dommages pourront ou ne pourront pas être réparés. Nous observons ce genre de cinétique, c'est-à-dire qu'à des temps après irradiation plus courts que six heures le niveau d'ARNm est peu ou pas modulé, ni pour des temps plus longs. Alors, lorsque le temps de réparation n'est pas assez long, la présence de dommages dans le gène IL-1 ou dans des gènes contrôlant son expression empêche sa transcription. La présence de dommage dans tout l'ADN induit par les UV génère le signal mais l'effet final sur le niveau d'ARNm ne peut avoir lieu. Par contre, si le temps après irradiation est long, le même effet final est observé mais pour des raisons inversées: il n'y a plus de signal initiateur puisque la majorité des dommages dans tout l'ADN sont réparés.

Les doses plus élevées que 1000J/m² pour un temps de six heures après irradiation appuient le même genre de conclusion. À mesure que la dose d'UV est augmentée la réponse diminue. Notre interprétation est que la probabilité d'induire des dommages dans le gène IL-1 ou dans ceux qui en contrôlent son expression est augmentée et le temps de six heures ne fournit pas le temps nécessaire pour réparer les dommages.

Les doses de 125 et 250 J/m² n'ont aucun effet sur le niveau d'ARNm d'IL-1 β pour tous les temps après irradiation évalués. À prime abord, nous pouvons envisager qu'un minimum de dommage doive être induit pour générer un signal. Par contre, deux autres possibilités peuvent être considérées: le plus petit temps de réparation, soit de 1 heure, est suffisant pour réparer le nombre

de dommages induit par ces doses ou que ce temps est trop court pour observer l'effet final sur l'expression du gène. Des expériences où des temps plus courts que 1 heure seraient évalués, pourraient éclaircir l'interprétation de ces résultats. Si des temps plus courts induisent une augmentation du niveau d'ARNm d'IL-1 β , alors le nombre de dommages sur la molécule d'ADN ne serait pas le facteur limitant, mais plutôt le temps de réparation et le temps nécessaire pour observer l'effet final. Mais s'il n'y a pas d'induction, dans ce cas aucune conclusion ne pourrait être tirée sur le rôle des dommages comme signal initiateur, puisque le signal peut être généré sans que l'effet final n'est lieu à cause d'un temps trop court.

La cinétique d'induction de la transcription a été étudiée pour un grand nombre de gènes. Des gènes comme *gadd 153* et *c-fos* sont très rapidement modulés. Des temps de 1 à 4 heures suffisent pour augmenter l'ARNm de ces gènes après une dose d'UVB (285nm) de 320 J/m² chez les kératinocytes, alors que pour le gène HSP 70 ce temps monte à 24 heures. (Garmyn *et al.*, 1991). Des expériences où un gène chimérique est construit, contenant les séquences promotrices essentielles pour une induction par les UV reliées à un gène rapporteur (CAT), montrent des cinétiques encore plus rapides. Par exemple, pour le gène *c-fos* une accumulation maximale d'ARNm est induit à des temps après irradiation de 10 à 15 minutes (Büscher *et al.*, 1988). De même, l'ARNm de la collagénase et d'HIV sont rapidement détectés, soit 30 minutes après l'irradiation (20 J/m² d'UV à 254 nm) (Stein *et al.*, 1989a). Selon l'équipe de

Garmyn (Garmyn *et al.*, 1991), il y aurait deux catégories de gènes qui entreraient en jeu suite à une irradiation aux UV. Les gènes qui répondent très tôt suite à une irradiation et ceux qui répondent plus tard. Les premiers répondent aux stress UV avant même qu'il y ait présence de dommage cellulaire relié aux UV, alors que les seconds sont des gènes qui augmentent leur expression quand le dommage cellulaire est déjà bien avancé. La réponse hâtive pourrait être une réponse direct aux UV, tandis que la réponse tardive serait une réponse secondaire qui représenterait une voie finale commune de la réponse cellulaire au stress UV. Le gène IL-1 β se retrouverait donc dans la catégorie des gènes plutôt hâtif selon cette interprétation.

4.2 RÔLE DU DOMMAGE À L'ADN ET DE LA RÉPARATION PAR EXCISION

Ces expériences préliminaires avaient pour objet d'évaluer la réponse des kératinocytes aux UVB afin d'établir les bases pour des études plus en profondeur sur l'implication de la réparation et le rôle des dommages à l'ADN dans l'induction du niveau d'ARNm de l'IL-1 β .

4.2.1 CINÉTIQUE DE RÉPARATION

Une première approche a été de combiner l'effet du PMA et des UV afin de déterminer indirectement la cinétique de réparation du gène IL-1 β . Une dose d'UV de 1000 J/m² qui induit en moyenne 0,3 dimère par kb empêche le PMA de

provoquer son effet stimulant sur l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β à moins qu'une période de réparation soit complétée. Les UV induisent des dommages dans tout l'ADN entre autres dans le gène IL-1 β ou dans des gènes contrôlant son expression. Un des effets du PMA, par l'intermédiaire de la PKC, est aussi d'induire une expression de gènes. Mais, l'action du PMA est dirigée uniquement sur le gène et non comme le peuvent les UV par l'intermédiaire d'un gène qui contrôle l'expression du gène. Dans notre cas, le gène que nous étudions est l'IL-1 β et nous évaluons l'action du PMA que sur ce gène. Alors, nous pensons que la présence de dommages dans le gène IL-1 β est responsable de l'incapacité du PMA d'agir sur l'expression de l'IL-1 β . Il semble qu'un temps de réparation entre trois et quatre heures soit nécessaire pour rétablir l'effet du PMA sur l'ARNm de l'IL-1 β , suite à une irradiation aux UV de 1000 J/m² chez les A431. Ces résultats confirment ceux obtenus plus tôt où pour une dose de 1000 J/m² seulement un temps après irradiation de six heures permet une augmentation du niveau d'ARNm de l'IL-1 β . Pour les temps plus courts (1 et 3 heures) la réparation entre autres dans le gène IL-1 β n'est pas terminée et aucune modulation significative est observée sur le messager de l'IL-1 β .

Dans la littérature des études sur la vitesse de réparation ont été rapportées, entre autres pour les kératinocytes humains en culture. Schothorst *et al.*(1991) ont quantifié la formation de dimères de pyrimidines dans l'ADN en déterminant le nombre de sites sensibles à l'endonucléase V du phage T4

(ESS). Ces résultats démontrent qu'à une longueur d'onde de 302 nm, une dose de 200 J/m² induit 9.1 ± 1.9 ESS/10⁸ daltons. Sachant qu'une paire de base (pb) correspond à 660 daltons, alors 9.1 ESS / 10⁸ daltons équivalent à 1 dimère par 16 Kb. Si l'on transpose ces données pour le gène IL-1 β qui possède une séquence en acide nucléique de 7.5 Kb, alors on peut dire que pour une dose de 200 J/m² à 302 nm un gène sur deux sera endommagé par la présence d'un dimère de pyrimidine. Ils ont aussi mesuré le taux de réparation par la perte des sites ESS. Un temps de neuf heures après irradiation permet d'enlever 55% des sites ESS et après 24 heures ce pourcentage passe à 70%. Un autre paramètre entre en jeu en ce qui concerne la réparation des dommages à l'ADN. Il a été montré par le groupe d'Hanawalt (Bohr *et al.*, 1987) que la réparation par excision s'effectuait préférentiellement dans les parties génomiques liées à une transcription active. Immédiatement après l'action des agents génotoxiques, les enzymes de réparation de l'ADN éliminent les lésions sur le brin transcrit des gènes actifs, c'est-à-dire le brin copié par l'ARN polymérase. Ensuite, le brin non transcrit est réparé, suivi par la grande majorité de l'ADN cellulaire dont la réparation efficace n'a lieu que plusieurs heures après le traitement délétère. Alors, puisque le gène IL-1 β est un gène transcrit de façon constitutive chez le kératinocyte humain en culture, nous pouvons considérer que le taux de réparation des dommages dans le gène IL-1 β sera plus rapide que dans les gènes non-actifs. Ces données sont en accord avec les conclusions présentées précédemment sur la relation entre la présence de dommages comme signal

initiateur et la nécessité d'un temps de réparation pour observer une induction de l'ARNm de l'IL-1 β . En effet, une fois le dommage formé (signal initiateur) il doit être réparé pour que le gène puisse être exprimé. Nos résultats montrent que pour une dose de 1000 J/m² il faut 6 heures d'incubation pour observer une induction du messager de l'IL-1 β . Cela peut correspondre à un temps de réparation convenable, compte tenu de la littérature. Comme Schothorst l'a démontré, un temps de 9 heures permet d'enlever 55% des dommages. De plus, si nous regardons qu'un seul gène et que c'est un gène actif, nous pouvons penser, selon les conclusions d'Hanawalt, que ce gène sera réparé préférentiellement. Donc pour le gène IL-1 β , nous pouvons supposer que 6 heures de réparation permettent d'enlever au-delà de 55% des dommages.

4.2.2 INHIBITEUR DE LA RÉPARATION

Finalement, toujours au regard de notre hypothèse que les lésions sur l'ADN seraient le signal initiateur menant à l'induction de l'ARNm de l'IL-1 et d'une dépendance envers le mécanisme de la réparation de l'ADN dans ce processus, nous utilisons comme dernière approche l'utilisation d'inhibiteurs de la réparation. La présence des inhibiteurs de la réparation provoque l'accumulation de zones de réparation incomplètes. L'action des inhibiteurs est de bloquer l'étape de resynthèse du fragment excisé par la polymérase delta d'où la présence de zones incomplètes de 10 à 30 nucléotides.

Pour des doses d'UVB de 250 et 500 J/m², l'effet des inhibiteurs est de déclencher une grande augmentation du contenu en ARNm de l'IL- β qui n'était pas observée avec une irradiation seule. Tandis qu'une dose de 1000 J/m² jumelée avec les inhibiteurs de la réparation a pour effet de bloquer l'induction du niveau d'ARNm de l'IL-1 β observée avec une irradiation seule. Ces résultats sont observés pour un temps de six heures après le traitement aux UV. Notre interprétation est que le nombre de dommages induits par les doses de 250 et 500 J/m² sont en temps normal réparés par les enzymes de réparation présentes dans la cellule et ainsi aucune signalisation ne peut avoir lieu. Mais la présence des inhibiteurs amène une accumulation de zones de réparation incomplètes capables de déclencher un signal. C'est résultats nous indiquent aussi que ces doses n'induisent pas de dommages dans le gène IL-1 β ou dans des gènes contrôlant son expression, dans la plupart des cellules, puisque même une accumulation de zones incomplètes est capable d'induire une augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β .

Par contre, l'effet inverse est observé avec une dose de 1000J/m². Nous pensons que la présence de dommages dans le gène IL-1 β ou dans des gènes qui en contrôlent son expression, ne sont pas réparés à cause des inhibiteurs et empêche la transcription du gène. Le signal, c'est-à-dire le dommage, est présent mais l'effet final ne peut avoir lieu.

Nos résultats suggèrent que la présence de dommages sur la molécule d'ADN soit un élément clé, de même que le processus de réparation de l'ADN, dans le phénomène d'induction de gène.

4.3 L'HYPOTHÈSE:

Rôle proéminent du dommage à l'ADN et prérequis de la réparation par excision dans l'induction de gène.

L'hypothèse que la présence de dommage sur la molécule d'ADN soit le signal initiateur est aussi une conclusion retrouvée dans la littérature. Les équipes de Stein (1989a) et Luethy et Holbrook (1992) ont utilisé les cellules XPA dans leur démarche pour démontrer que l'augmentation de l'expression des gènes étudiés (*fos*, *HIV-1*, *collagenase* et *gadd 153*) est reliée aux dommages à l'ADN induits par les UV. Comme déjà mentionné, les cellules provenant de malades XPA sont déficientes dans les étapes précoces de la réparation par excision resynthèse (Sarasin *et al.*, 1992). Ces auteurs suggèrent que la lésion au niveau de l'ADN n'ait pas besoin d'être réparée pour provoquer une réponse. Il tire cette conclusion par le fait que ni la réparation par excision ni la réparation post-réplivative sont requises puisqu'ils observent une réponse aux UV chez les cellules XPA (Stein *et al.*, 1989a). Leurs études sont effectuées avec des doses d'UV très petites (de 5 à 20 J/m²) et à une longueur d'onde de 254 nm. Il est certain qu'à une longueur d'onde de 254nm le nombre de dommages induit est beaucoup plus grand que pour une même dose donnée à une longueur d'onde située dans les UVB (290-320nm). Probablement que la dépendance du

mécanisme de réparation dans la réponse aux UV est reliée à la dose ou plutôt à la quantité de dommages induits puisque selon la longueur d'onde une même dose n'induit pas le même nombre de dommages. Dans notre étude, nous supposons que certaines doses provoquent un grand nombre de dommages, entre autres dans le gène IL-1 β . De là, vient la nécessité d'un temps de réparation afin de rétablir la transcription. Par contre, dans les études de Stein (Stein *et al.*, 1989a) et Holbrook (Luethy et Holbrook, 1992), les doses données en relation avec la longueur d'onde utilisée ne doivent pas induire de dommages dans les gènes étudiés, d'où l'indépendance de la réparation par excision dans la réponse aux UV.

4.4 COMPLEXE PROTÉIQUE DE RÉPARATION: MODÈLE POUR LA SIGNALISATION

D'un côté, nous sommes fortement en faveur d'un rôle essentiel de la réparation par excision. En effet le processus de réparation fait intervenir une machinerie d'enzymes. Il se pourrait que les différentes étapes de la réparation soient sous le contrôle d'enzymes faisant parti d'un complexe protéique. Ceci a été démontré pour *Escherichia coli* où le complexe uvrA, uvrB, uvrC est nécessaire pour que l'étape d'incision au site du dommage soit réalisée. uvrA et uvrB forment un premier complexe protéique avec une activité endonucléase mais la protéine uvrC est essentielle pour une activité maximale de l'endonucléase. Nous pensons que ce genre de complexe protéique pourrait être

la clé dans le processus de la transduction du signal. Certes, il y a une transmission de signaux à partir du signal initiateur (dommage à l'ADN) jusqu'à l'effet final mais la question est de savoir quelles sont les protéines capables de reconnaître le dommage et d'émettre un signal. Celles-ci sont encore inconnues. Des expériences avec des gels de rétention ont montré que des protéines se lient à l'ADN endommagé (ex. pour l'ADN endommagé par les UV: Chu et Chang,1988; Patterson et Chu,1989; Hirschfeld *et al.*,1990; Chao *et al.*,1991). Par contre, il n'a pas été démontré si ces protéines sont capables de générer un signal. Ces protéines peuvent très bien faire partie des réactions de réparation puisqu'elles ont la propriété intrinsèque de reconnaître le dommage sur l'ADN. Alors selon le concept d'un complexe protéique, une de ces protéines du complexe aurait une double propriété, soit de reconnaître le dommage et de générer un signal, ce qui est très rentable pour la cellule.

Il se pourrait que cette protéine soit une protéine kinase puisque dernièrement des protéines kinases dépendante de l'ADN ont été découvertes (Jackson *et al.*, 1990; Lees-Miller *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1990). De plus il a été démontré que des inhibiteurs de protéine kinase empêchent l'expression de gène induit par des agents génotoxiques (Büsher *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1988; Krämer *et al.*, 1990).

Le modèle d'un complexe protéique contenant une protéine génératrice d'un signal est aussi compatible avec les résultats obtenus par les équipes de Stein (1989a), Luethy et Holbrook (1992). Leurs études avec les cellules XPA,

ont montré que l'activation des gènes est possible à des doses plus faibles qu'avec les cellules normales. C'est précisément l'étape d'incision qui est déficientes chez les cellules XPA. Alors le complexe protéique peut être présent au site du dommage mais une protéine essentielle pour une activité d'incision maximale est manquante ou inactive. Donc parmi les protéines présentes au site du dommage, il y en aurait une avec la responsabilité de générer un signal malgré la défectuosité de la réparation.

4.5 SPÉCIFICITÉ DU DOMMAGE

De chercher à savoir quelles sont les premières protéines capables de reconnaître un dommage à l'ADN puis de déclencher tout un processus de transmission de signaux est une chose, mais qu'en est-il de la spécificité du dommage. Deux possibilités ont été envisagées (Herrlich *et al.*, 1992): soit que différents types de dommage sur l'ADN sont reconnus par des protéines différentes lesquelles généreraient un signal; soit qu'une propriété commune du dommage sur l'ADN est reconnue. La transmission des signaux pourrait être la responsabilité de protéines qui reconnaissent une ou quelques caractéristiques de la structure d'ADN altéré (ex.. distorsion de l'hélice). Notre suggestion que la protéine de reconnaissance du dommage fasse parti d'un complexe protéique concorde avec la deuxième possibilité. Étant donné que le processus de réparation par excision de tous les dommages à l'ADN possède une étape d'incision et qu'il est possible que cette étape fasse intervenir un complexe

protéique, alors c'est une propriété commune du dommage (distorsion de l'hélice) qui est reconnue par le complexe de réparation. Ainsi, indirectement la protéine de signalisation reconnaît tous les types de dommage. Cette idée que tous les dommages à l'ADN aient le potentiel de générer un signal est supportée par nos expériences avec les inhibiteurs de la réparation. Nous observons une augmentation du messager de l'IL-1 β tout autant avec ou sans inhibiteur, alors les dimères et les brèches de 10 à 30 nucléotides sont capables de générer un signal. De plus, d'autres agents génotoxiques comme les radiations ionisantes qui entraînent des dommages différents (ex.. bris simple brin) induisent aussi l'expression de gène. Woloschak et Chang-Liu (1990) ont rapporté que les gènes α -tubuline, γ -actin, IL-1, protéine kinase C, α -interféron et c-fos ont un niveau d'expression augmenté après un traitement aux rayons γ et aux rayons-X.

4.6 FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Une des étapes si ce n'est la dernière étape dans la transmission des signaux menant à l'activation de la transcription de gènes implique des facteurs de transcription. Stein *et al.* (1989a) avec des études de délétion de séquences promotrices des gènes HIV-1, fos et collagénase trouvent que l'activation de ces gènes induite par les UV est causée par des éléments du enhancer. Ces séquences lient des protéines comme les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Il est intéressant de souligner que les équipes de Shirakawa (1993) et Hunninghake (1992) ont démontré des séquences promotrices du gène

pro-IL-1 β disponibles pour la liaison, entre autres, des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Alors la régulation de la transcription du gène IL-1 β est compatible avec des éléments du enhancer déjà démontrés comme étant impliqués dans l'activation de gène induite par les UV.

4.7 LA CONTRE HYPOTHÈSE

À toute hypothèse, il y a la possibilité d'une contre hypothèse. Dans notre cas, l'hypothèse inverse est que le dommage à l'ADN induit par les UV n'est pas le signal initiateur menant à l'augmentation de l'ARNm de l'IL-1 β . Alors, existe-t-il un autre photorécepteur des radiations UV qui serait capable de générer un signal. Dans la littérature, un autre photorécepteur au niveau de l'épiderme (plus spécifiquement à la couche cornée) a été identifié soit l'acide urocanique (Noonan *et al.*, 1988). L'acide urocanique semble avoir un rôle dans l'immunosuppression induite par les UV démontré par le fait que l'isomère cis-urocanique, formé par l'effet des UV sur la protéine native, a une activité immunosuppressive chez la souris (Ross *et al.*, 1988). Il n'a pas été démontré que l'acide cis-urocanique induit par les UV a une implication dans l'induction de l'expression de gène. Alors bien que l'acide cis-urocanique puisse être un photorécepteur potentiel au niveau de l'épiderme son rôle comme molécule de signalisation reste à être démontré.

Nous avons mentionné qu'une protéine kinase pourrait être une protéine capable de générer un signal en plus de son rôle de reconnaissance du

dommage. Il serait possible que les UV ait un effet direct sur l'activité de cette protéine. La protéine kinase serait alors le photorécepteur et le signal initiateur. La présence de dommage serait encore impliquée dans le processus, puisque l'activité de cette protéine kinase est dépendante de l'ADN (Jackson *et al.*, 1990; Lees-Miller *et al.*, 1990; Carter *et al.*, 1990), mais le dommage n'aurait qu'un rôle de synergie avec la protéine kinase. Comme il a été montré par plusieurs auteurs (Büsher *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1988; Krämer *et al.*, 1990), la présence d'inhibiteur de la protéine kinase inhibe l'expression de gène puisque le signal initiateur n'est plus actif. En continuité avec cette suggestion un autre candidat pourrait être certains facteurs de transcription. En effet, puisque plusieurs agents génotoxiques, par exemple les radiations ionisantes, génèrent des intermédiaires réactionnels de l'oxygène, il a été postulé que des protéines régulatrices (tels les facteurs de transcription) pourraient directement percevoir une attaque radicalaire ou un changement redox. En particulier, deux facteurs NF- κ B et Fos/Jun pourraient être les cibles. (Abate *et al.*, 1990; Staal *et al.*, 1990; Schreck *et al.*, 1991)

Finalement, nous avons axé notre approche sur des mécanismes plutôt moléculaire que cellulaire. Ainsi notre hypothèse ne touchait que le côté moléculaire, c'est-à-dire le rôle de la réparation. Mais du côté cellulaire, bien que nous avons parlé de l'acide cis-urocanique, il y aurait une autre alternative qui pourrait être considéré. D'abord, notons que la protéine pro-IL-1 β produite par les kératinocytes ne peut être convertit en une protéine mature dans la cellules

mais qu'à l'extérieur de la cellule (Mizutani *et al.*, 1991). Quant à eux les UV peuvent induire un certain taux de mortalité cellulaire. Ainsi, la pro-IL-1 β libérée par les cellules mortes peut être convertie en IL-1 β mature par une convertase exogène. De plus, il a été démontré que les cellules qui produisent l'IL-1 peuvent elles-mêmes répondre à la présence d'IL-1 et ainsi augmenter sa production (Warner *et al.*, 1987). Donc, il est possible que l'augmentation du message de l'IL-1 β chez les cellules vivantes soit due à la présence d'IL-1 β libéré par les kératinocytes morts à cause des UV. Nous avons évalué le taux de mortalité cellulaire après irradiation pour les temps de 6 et 24 heures et il est vrai que des doses élevées provoquent un bon pourcentage de mortalité cellulaire (environ 42% de mortalité).

4.8 SPÉCIFICITÉ DES INHIBITEURS

Notre démarche consiste à employer des inhibiteurs de la réparation. L'utilisation d'inhibiteur de la réparation pose la question de la spécificité de ces inhibiteurs. Ceux-ci pourraient-ils provoquer un effet autre que leur activité inhibitrice sur la synthèse de l'ADN qui induirait aussi l'activation de gène. Nous avons vérifié si les deux inhibiteurs seuls sont capables de moduler le niveau d'ARNm IL-1 β (fig.13). Nous observons une légère augmentation ou diminution selon le temps du message de l'IL-1 β . Luethy et Holbrook (Luethy et Holbrook, 1992) ont aussi regardé l'effet de ces deux inhibiteurs sur l'expression du gène *gadd 153*. Ils montrent aucune induction de l'ARNm de *gadd153*. Il est difficile

d'affirmer avec certitude que les modulations sur le niveau d'ARNm d'IL-1 β ne sont dues qu'aux propriétés spécifiques des inhibiteurs sur la réparation et la réplication de l'ADN (Nocentini, 1982) en excluant toute autre action ailleurs dans la cellule. Dans cette optique, il serait intéressant de vérifier si un autre inhibiteur de la réparation, par exemple l'arabinosyl cytosine (araC), a le même effet sur le niveau d'ARNm d'IL-1 β .

4.9 TRANSCRIPTION OU STABILISATION

En dernier lieu, il faut souligner que le mécanisme par lequel l'ARNm IL-1 β est augmenté dans la population de kératinocytes en culture ne peut être déterminé à partir de cette étude. Il est cependant peu probable que les radiations UV amènent une stabilisation de tout l'ARNm cellulaire en interférant avec le taux de dégradation de l'ARNm puisqu'un autre ARNm (GAPDH), qui est produit de façon constitutive par les kératinocytes n'est pas augmenté par les UV. Il est possible que les radiations UV induisent des événements qui causeraient la stabilisation sélective de certains ARNm incluant IL-1 β . Hilgers (Hilgers *et al.*, 1991) a montré que l'augmentation de l'ARNm de l'interféron α et de l'IL-1 α est due à une stabilisation de ces ARNm induite par les UV. Mais d'un autre côté, il est aussi possible que ces événements induisent la transcription du gène IL-1 β . Des études par run-on et sur la demi-vie de l'ARNm de l'IL-1 β élucideraient si c'est la transcription ou la stabilisation qui est responsable de

l'élévation du niveau d'ARNm de l'IL-1 β . Les résultats observés avec les inhibiteurs de la réparation où, par exemple, une petite dose de 250 J/m² n'a pas d'effet alors que cette même dose jumelée avec les inhibiteurs provoque une augmentation du niveau de l'ARNm IL-1 β , suggèrent que les UV n'induisent pas la stabilisation de l'ARNm de l'IL-1 β .

4.10 CONTRÔLE INTERNE

Un premier type de contrôle interne a été d'employer la quantification par spectrophotométrie et la visualisation par le bromure d'éthidium des ARN ribosomiaux. Les ARNr_s représentent 95% des ARN totaux tandis que les ARNm_s représentent que 1%. La quantification des ARNr_s est par rapport à celle des ARNm_s beaucoup moins sujette à des variations ce qui assure une constance dans la quantité d'ARN prélevé et déposé dans chaque puits. De plus l'intégrité de l'ARN extrait est évidente par la visualisation des deux formes distinctes d'ARNr, 28s et 18s. Le gène GAPDH a été aussi utilisé comme contrôle interne pour vérifier l'intégrité de l'ARN extrait des cellules et la constance dans la quantité d'ARN déposée dans chaque puit. En plus, il a fourni l'évidence que les UVB n'induisent pas une augmentation non spécifique de tous les ARNm_s. Au cours des expériences nous avons observé que le niveau d'ARNm de GAPDH est diminué avec des hautes doses d'UV (surtout pour des doses de 1000 J/m² et plus). Une étude par Garmyn (Garmyn *et al*, 1991) a démontré que l'expression de GAPDH est diminuée par une irradiation aux UV

(320 J/m² à 285nm) après un temps de 48 heures. Donc, il est tout de même pertinent d'utiliser ce genre de contrôle interne mais il serait préférable d'employer un ARN plus stable. Des oligonucléotides des ARNrs 28s, 18s et même 5s sont idéals pour ce genre de contrôle.

CHAPITRE 5

CONCLUSION

Nous avons démontré que la présence de dommage sur la molécule d'ADN induite par les UV, est un élément clé dans l'induction du message de l'IL-1 β chez les kératinocytes humains en culture. De plus, pour des doses qui induisent un grand nombre de dommages la réparation par excision est un pré-requis afin de rétablir la transcription du ou des gènes endommagés. Même si le signal est présent (le dommage), l'effet final ne peut avoir lieu que si la transcription du ou des gènes induits est possible.

L'immunosuppression induite par les UV est un phénomène complexe qui ne peut être attribuée qu'à un type cellulaire ou qu'à un type de facteurs solubles (cytokines ou autres:prostaglandines). L'interleukine-1 a peut-être un rôle dans l'immunosuppression mais n'est pas la seule impliquée dans tout le processus menant à cette l'immunosuppression.

Donc, sachant que les kératinocytes produisent une variété de cytokines immunosuppressives, dont l'interleukine-1, et que leur production est fortement affectée par les UV, notre idée sur le phénomène d'immunosuppression induite

par les UV est résumée par le modèle suivant:

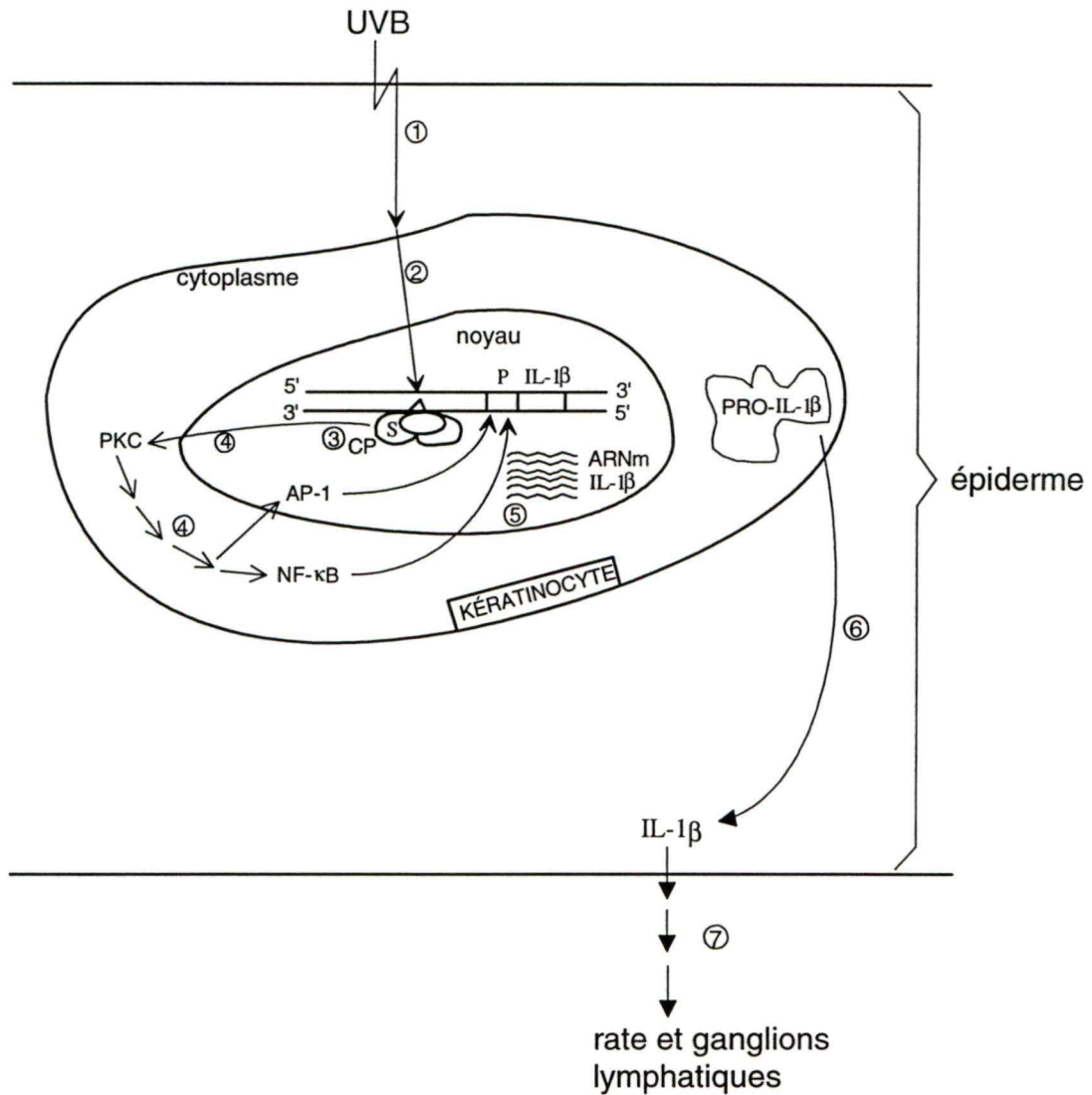


FIGURE 20: Schéma représentatif de l'immunosuppression induite par les UV.

P: promoteur du gène IL-1β; S: protéine de signalisation du complexe protéique; CP: complexe protéique de réparation; Δ: dimère de pyrimidine.

- 1• Les UVB pénètrent jusqu'à l'épiderme et une des cellules cibles est le kératinocyte.
- 2• Les UVB induisent des dommages à l'ADN des kératinocytes et la lésion majeure est le dimère de pyrimidine. Cette lésion est réparée par la voie d'excision-resynthèse. La présence d'un dommage est le signal initiateur qui déclenche tout un processus de transmission de signaux jusqu'à l'effet final (induction de la transcription).
- 3• Un complexe protéique reconnaît la lésion et une protéine du complexe serait alors impliquée à la fois dans la réparation et dans le processus de signalisation (transduction du signal). Cette protéine pourrait être une protéine kinase.
- 4• La transmission des signaux peut faire intervenir une PKC. De même, des facteurs de transcription activés par les UV (NF- κ B et AP-1) interviennent dans la dernière étape de la transmission des signaux. Ces facteurs se lient à des séquences spécifiques au niveau du promoteur du gène IL-1 β et contrôlent ainsi la transcription, qui mène à l'augmentation des messagers du gène IL-1 β .

5. L'augmentation de la transcription du gène IL-1 β est un processus dépendant de la réparation par excision.
6. La protéine traduite, pro-IL-1 β , est sécrétée à l'extérieur de la cellule où la forme biologique active sera produite.
7. IL-1 β devient un des facteurs solubles qui irait agir au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques et induirait l'apparition de lymphocytes T suppressifs impliqués dans le phénomène de l'immunosuppression systémique induite par les UV.

REMERCIEMENTS

Mes tout premiers mercis vont à mes deux directeurs de recherches, Darel Hunting PhD et Jana Stankova PhD, qui par leur confiance et leur enthousiasme m'ont fait cheminer dans un projet parsemé de rebondissement. Vous m'avez légué une passion, dégagé par votre dévouement, votre acharnement et votre courage. Encore mille mercis!

En second lieu j'adresse mes remerciements à toute la gang du département d'immunologie. Ces années d'efforts ont été grandement allégées par le dynamisme et la coopération que vous m'avez accordé. À toi Céline, un merci bien spécial pour avoir eu la patience de me divulguer tous les secrets de la culture cellulaire et de l'extraction d'ARN. À toi Suzanne, la psy du labo, un bien grand merci. Tes conseils à tout point de vue ont été d'un grand réconfort. À Marie-Josée et Nathalie qui sont maintenant elles aussi dans la jungle du marché du travail, je tiens à vous exprimer toute mon amitié. Comme nous nous sommes bien supportés et encouragés. Merci et bonne chance! À tout le monde encore merci!

Sans être très souvent dans le laboratoire de Darel, situé dans les catacombes du CHUS, j'aimerais remercier aussi toute cette gamique qui m'a

toujours considéré comme l'une des leurs. Merci pour votre coopération. À toi Nathalie, j'aimerais te dire un merci bien spécial pour ton écoute, ton encouragement et ta générosité. Notre amitié me tient beaucoup à coeur. Bonne chance dans tes projets d'avenir.

Cette maîtrise je la dois à tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont soutenu sans relâche. Darel, Jana et tous les amis de laboratoire en sont bien sûr responsables d'une part. De l'autre part, je suis d'abord particulièrement reconnaissante envers mes parents, Jacqueline et Victor et à mon frère, Sylvain. Nous formons une famille extraordinaire, source de réconfort, d'encouragement, de compréhension, de joie et d'amour. Du fond du coeur, MERCI!

Mais, il y a une personne à qui mes remerciements sont à mes yeux les plus importants. Cette personne est arrivée tout au début de ce grand projet de maîtrise. Depuis, nous formons une petite famille formidable. Benoit, qui non seulement m'a apporté un support moral sans limites, a été par surcroît le maître d'oeuvre de ce travail. Il n'a pas compté ses heures passées à dactylographier la majeure partie de ce travail et à exécuter toute la mise en page de ce mémoire. Merci, qui me semble un mot trop petit pour toute la reconnaissance que j'éprouve. Je t'aime.

Amélie, ce petit trésor, qui est venu combler notre vie, je te dis à toi aussi, merci. Toutes ces heures où maman était occupée à rédiger et que tu acceptais de jouer toute seule, m'ont donné beaucoup de courage.

BIBLIOGRAPHIE

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., and Curran, T. (1990). Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding in vitro. *Science* **249**:1157-1161.
- Ananthaswamy, H.N., and Kripke, M.L. (1981). In vitro transformation of primary cultures of neonatal BALB/c mouse epidermal cells with ultraviolet-b radiation. *Cancer Res.* **41**:2882-2890.
- Ananthaswamy, H.N. (1984). Lethality and transformation of 1-T1/ 2 mouse embryo fibroblast cell line by various wavelengths of ultraviolet radiation. *Photodermatology* **1**:265-276.
- Ansel, J.C., Luger T.A., Lowry, D., Perry, P., Roop, D.R., and Mountz, J.D. (1988). The expression and modulation of IL-1 in murine keratinocytes. *J. Immunol.* **140**:2274-2278.
- Ansel, J.C., Luger, T.A., and Green, I. (1983). The effect of in vitro and in vivo UV irradiation on the production of ETAF activity by human and murine keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **81**:619-624.
- Applegate, L.A., Ley, R.D., Alcalay, J., and Kripke, M.L. (1989). Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* **170**:1117-1131.
- Atkins, E. (1960). The pathogenesis of fever. *Physiol. Rev.* **40**:580-646.
- Auron, P.E., Webb, A.C., Rosenwasser, L.J., Mucci, S.F., Rich, A., Wolff, S.M., and Dinarello, C.A. (1984). Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7907-7911.

- Baadsgaard, O. (1991), In vivo ultraviolet irradiation of human skin result in profound pertubation of the immune system. *Arch. Dermatol.* **127**:99-109.
- Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesaren, G., and Galeotti, C.L. (1987). A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 1 β in *Saccharomyces cerevisia*. *EMBO J.* **6**: 229-234.
- Bensi, G., Mora, M., Raugei, G., Bounanmassa, D., Rossini, M., and Melli, M. (1990). An inducible enhancer controls the expression of the human interleukin 1 beta gene. *Cell. Growth. Diff.* **1**:491-497.
- Bergstresser, P.R. (1986). Ultraviolet B radiation induces "local immunosuppression". *Curr. Probl. Dermatol.* **15**:205-218.
- Beukers, R., and Berends, W. (1960). Isolation and identification of the irradiated product of thymine. *Biochem. Biophys. Acta* **41**:550.
- Borh, V.A., Philipps, D.H., and Hanawalt, P.C. (1987). Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.* **47**:6426-6436.
- Büscher, M., Rahmsdorf, H.J., Litfin, M., Karin, M., and Herrlich, P. (1988). Activation of *c-fos* gene by UV and phorbol ester: different signal transduction pathways converge to the same enhancer element. *Oncogene* **3**:301-311.
- Callard, R.E. (1989). Cytokine regulation of B-cell growth and development. *Br. Med. Bull.* **45**:371-388.
- Carter, T., Vancurova, I., Sun, I., Lou, W., and DeLeon, S. (1990). A DNA-activated protein kinase from HeLa cell nuclei. *Mol. Cell Biol.* **10**:6460-6471.

- Chao, C.C.K., Huang, S.L., Huang, H., and Lin-Chao, S. (1991). Cross-resistance to UV radiation of a cisplatin-resistant human cell line: overexpression of cellular factors that recognize UV-modified DNA. *Mol. Cell Biol.* **11**:2075-2080.
- Chomczynsky, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
- Chu, G., and Chang, E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* **242**:564-567.
- Chung, H.-T., Burnham, D.K., Robertson, B., Roberts, L.K. and Daynes, R.A. (1986). Involvement of prostaglandins in the immune alterations caused by the exposure of mice to ultraviolet radiation. *J. Immunol.* **137**:2478.
- Ciarrocchi, G., Surtherland, B.M., and Pedrini, A.M. (1982). Photoreversal of DNA unwinding caused by pyrimidine dimers. *Biochimie* **64**:665-668.
- Clark, B.D., Collins, K.L., Gandy, M.S., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1986). Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse-transcribed pro-interleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.* **14**:7897-7914.
- Clark, B.D., Fenton, M.J., Rey, H.L., Webb, A.C., and Auron, P.E. Characterization of cis and trans acting element involved in human proIL-1 beta gene expression. In M.C. Powanda, J.J. Oppenheim, M.J. Kluger, C. Dinarello (Ed): *Monokines and other non-lymphocytic cytokines*. Alan R. Liss, Inc., New York (1988), p. 47-53.
- Coffey, R.J., Derynck, R., Wilcox, J.N., Bringman, T.S., Goustin, A.S., Moses, H.L., and Pittelkow, M.R. (1987). Production and auto-induction of transforming growth factor alpha in human keratinocytes. *Nature* **328**:817-820.

- DeFabo, E.C., and Noonan, F.P. (1983). Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J. Exp. Med.* **157**:84.
- Dinareello, C.A. (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**:1627-1652.
- Dower, S.K., Kronheim, S.R., Hopp, T.P., Cantrell, M., Delly, M., Gillis, S., Henney, C.S., and Urdal, D.L. (1986). The cell surface receptor for interleukin 1 α and interleukin 1 β are identical. *Nature (Lond.)* **234**:266-267.
- Elmets, C.A., Bergstresser, P.R., Tigelaar, R.E., Wood, P.J., and Strelein, J.W. (1983). Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* **158**:781-794.
- Engel, A., Johnson, M.L., and Haynes, S.G. (1988). Health effects of sunlight exposure in the United States. *Arch. Dermatol.* **124**:72-79.
- Everett, M.A., Yeagers, E., Sayre, R.M., and Olson, R.L. (1966). Penetration of epidermis by ultraviolet rays. *Photochem. Photobiol.* **5**:533-542.
- Feldmann, M., Londei, M., and Hawoth, C. (1989). T cells and lymphokines. *Br. Med. Bull.* **45**:361-370.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983) A technic for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**:6-13.
- Feng Li, Y., Kim, S.T., and Sancar, A. (1993). Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4389-4393.
- Fisher, M.S., and Kripke, M.L. (1978). Further studies on the tumor-specific suppressor cells induced by ultraviolet radiation. *J. Immunol.* **121**:1139.

- Fisher, M.S., and Kripke, M.L. (1982). Suppressor T lymphocytes control the development of primary skin cancers in ultraviolet-irradiated mice. *Science* **216**:1133.
- Fornace, Jr. A.J. (1992). Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu. Rev. Genet.* **26**:507-526.
- Furutani, Y.M., Notake, M., Fukui, T., Ohue, M., Nomura, H., Yamada, M., and Nakamura, S. (1986). Complete nucleotide sequence of the gene for human interleukin 1 alpha. *Nucleic Acids Res.* **14**:3167-3179.
- Gahring, L.C., Buckley, A., and Daynes, R.A. (1985). The presence of ETAF/IL-1 in normal human stratum corneum. *J. Clin. Invest.* **76**:1585-1594.
- Gallo, R.L., Brownstein, E., and Granstein, R.D. (1989). Secretion of interleukin 3 activity from a transformed murine keratinocyte line after exposure to ultraviolet radiation: role of membrane signal transduction mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* **92**:432A.
- Garmyn, M., Yaar, M., Holbrook, N. and Gilchrest, B.A. (1991). Immediate and delayed molecular response of human keratinocytes to solar-simulated irradiation. *Lab. Invest.* **65**:471-478.
- Halaban, R., Langdon, R., and Birchall, D. (1988). Paracrine stimulation of melanocytes by keratinocytes through basic fibroblast growth factor. *Ann. NY Acad. Sci.* **548**:180-190.
- Hall, J.D., and Mount, D.W. (1981). Mechanisms of DNA replication and mutagenesis of ultraviolet-irradiated bacteria and mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Molec. Biol.* **25**:53-126.
- Hauser, C., Saurat, J.H., Schmitt, A., Jaunin, F., and Dayer, J.M. (1986). Interleukin 1 is present in normal human epidermis. *J. Immunol.* **136**:3317-3321.

- Herrlich, P., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **119**:187-223.
- Hilgers, G., Clauss, I.M., Huez, G.A., and Rommelaere, J. (1991). Post-transcriptional effect of ultraviolet light on gene expression in human cells. *Eur. J. Biochem.* **201**:483-488.
- Hirschfeld, S., Levine, A.S., Ozato, K., and Protic, M. (1990). A constitutive damage-specific DNA binding protein is synthesized at higher levels in UV-irradiated primate cells. *Mol. Cell Biol.* **10**:2041-2048.
- Hollander, M.C., and Fornace, A.J. Jr. (1989). Induction of fos RNA by DNA-damaging agents. *Cancer Res.* **49**:1687-1692.
- Hunninghake, G.W., Monks, B.G., Geist, L.J., Monick, M.M., Monroy, M.A., Stinski, M.F., Webb, A.C., Dayer, J.M., Auron, P.E., and Fenton, M.J. (1992). The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin1 β gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**:3439-3448.
- Hunting, D.J., Gowan, B.J., and Dresler, S.L. (1991). DNA polymerase delta mediates excision repair in growing cells damaged with ultraviolet radiation. *Biochem. Cell Biol.* **69**:303-308.
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., and Tjian, R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**:155-165.
- Jessup, J.M., Hanna, N., Palaszynski, E., and Kripke, M.L. (1978). Mechanisms of depressed reactivity to dinitrochlorobenzene and ultraviolet-induced tumors during ultraviolet carcinogenesis in BALB/c mice. *Cell Immunol.* **38**:105-115.
- Kane, C.J.M., Knapp, A.M., Mansbridge, J.N., and Hanawalt, P.C. (1990). Transforming growth factor- β 1 localization in normal and psoriatic epidermal keratinocyte in situ. *J. Cell. Physiol.* **144**:144-150.

- Kirnbauer, R., Köck, A., Krutmann, J., Schwarz, T., Urbanski, A., and Luger, T.A. (1989). Different effects of UVA and UVB on epidermal cell-IL6 expression and release. *J. Invest. Dermatol.* **92**:459A.
- Köck, A., Urbanski, A., and Schwarz, T. (1989). Tumor necrosis factor- alpha mRNA expression and release by human epidermal cells. *Cytokine* **1**:109A.
- Krämer, M., Sachsenmaier, C., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H.J. (1993) UV irradiation-induced interleukin-1 and basic fibroblast growth factor synthesis and release mediate part of the UV response. *J. Biol. Chem.* **268**:6734-6741.
- Krämer, M., Stein, B., Mai, S., Kunz, E., König, H., Loferer, H., Grunicke, H.H., Ponta, H., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H.J. (1990). Radiation-induced activation of transcription factors in mammalian cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**:303-313.
- Kripke, M.L. (1974). Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**:1333-1336.
- Kripke, M.L., Cox, P.A., Alas, L.G., and Yarosh, D.B. (1992). Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7516-7520.
- Kripke, M.L., and Fisher, M.S. (1976). Immunologic parameters of ultraviolet carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **57**:211-215.
- Kripke, M.L., and Morison, W.L. (1985). Modulation of immune function by UV radiation. *J. Invest. Dermatol.* **85**:62s-66s
- Krutmann, J., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanska, A., and Luger, T.A. (1990). Epidermal cell-contra-interleukin 1 inhibits human accessory cell function by specifically blocking interleukin 1 activity. *Photochem. Photobiol.* **52**:738.
- Kupper, T.S., Birchall, N., McGuire, J.S., and Lee, F. (1987). Induction of GM-CSF gene expression by interleukin-1 in human keratinocytes. *Clin. Res.* **35**:581.

- Kupper, T.S., Chua, A.O., Flood, P., McGuire, J., and Gubler, U. (1987). Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J. Clin. Invest.* **80**:430-436.
- Kupper, T.S. (1988). Interleukin-1 and other human keratinocyte cytokines: molecular and functional characterization. *Adv. Dermatol.* **88**:501A.
- Kupper, T.S., Kent, M., Pravinkumar, S., Mizutani, H., Birchall, R., and May, L., (1989). Production of IL-6 by keratinocytes: implications for epidermal inflammation and immunity. *Ann. NY Acad. Sci.* **557**:454-465.
- Larsen, C.G., Anderson, A.O., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. (1989). Production of interleukin 8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin 1 or tumor necrosis factor. *Immunol.* **68**:31-39.
- Lees-Miller, S.P., Chen, Y-R., and Anderson, C.W. (1990). Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates Simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol. Cell Biol.* **10**:6472-6481.
- Ley, R.D., Meyrick, J.P., and Loretta, L.L. (1983). Induction of pyrimidine dimers in epidermal DNA of hairless mice by UVB: an action spectrum. *J. Invest. Dermatol.* **244**:288-289.
- Lin, C.S., Goldthwait, D.A., and Samols, D. (1990). Induction of transcription from the long terminal repeat of Moloney murine sarcoma provirus by UV-irradiation, X-irradiation, and phorbol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:36-40.
- Little, J.W., and Mount, D.W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**:11-22.
- Lomedico, P.T., Gubler, U., Hellman, C.P., Dukovich, M., Giri, J.G., Pan, Y.E., Collier, K., Semionow, R., Chua, A.O., and Mizel, S.B. (1984). Cloning and expression of murine interleukin-1 in *Escherichia coli*. *Nature (Lond.)* **312**:458-462.

- Lücke-Huhle, C., and Herrlich, P. (1987). Alpha-radiation-induced amplification of integrated SV40 sequences is mediated by a trans-acting mechanism. *Int. J. Cancer* **39**:94-98.
- Luethy, J.D., and Holbrook, N.J. (1992). Activation of the gadd 153 promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res.* **52**:5-10.
- Luger, T.A., Stadler B.M., Luger, B.M., Sztejn, M.B., Schmidt, J.A., Hawley-Nelson, P., Grabner, G., and Oppenheim, J.J. (1983). Characteristics of an epidermal cell thymocyte activating factor (ETAF) produced by human epidermal cells and a human squamous cell carcinoma cell line. *J. Invest. Dermatol.* **81**:187-193.
- McKenzie, R.C., and Sauder, D.N. (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol.* **6**:105s-107s.
- Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., and Arai, K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **10**:295-331.
- Mizutani, H., Black, R., and Kupper, T.S. (1991). Human keratinocytes produce but not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. *J. Clin. Invest.* **87**:1066-1071.
- Morison, W.L., Bucana, C., and Kripke, M.L. (1984). Systemic suppression of contact hypersensitivity by UVB radiation is unrelated to the UVB-induced alteration in morphology and number of Langerhans cells. *Immunology* **52**:299-306.
- Nakagaki, T., Oda, J., Koizumi, H., Fukaya, T., Yasui, C., and Ueda, T. (1990). Ultraviolet action spectrum for intracellular free Ca²⁺ increase in human epidermal keratinocytes. *Cell Struc. Func.* **15**:175-179.
- Nocentini, S. (1982). Effects of aphidicolin on the recovery of ribosomal RNA synthesis and on the repair of potentially lethal damage in UV irradiated simian and human cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **109**:603-611.

- Nomura, S., and Oishi, M. (1984). UV-irradiation induces an activity which stimulates Simian virus 40 rescue upon cell fusion. *Mol. Cell Biol.* **4**:1159-1162.
- Noonan, F.P., Bucana, C., Sauder, D.N., and DeFabo, E.C. (1984). Mechanism of systemic immune suppression by UV irradiation in vivo. II. The UV effects of number and morphology of epidermal Langerhans cells and UV-induced suppression of contact hypersensitivity have different wavelength dependencies. *J. Immunol.* **132**:2408-2416.
- Noonan, F.P., DeFabo E.C., and Morrison H. (1988). Cis-urocanic acid, a product formed by UVB irradiation of the skin, initiates an antigen presentation defect in splenic cells in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **90**:92.
- Norris, D.A., Lyons, M.B., Middleton, M.H., Yohn, Y.J., and Kashihara-Sawami, M. (1990). Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **95**:132-138.
- Nosaki, S., Abrams, J., Pearce, M., and Sauder, D.N. (1990). Augmentation of GM-CSF expression by ultraviolet irradiation is mediated by IL-1 in Pam 212 keratinocytes. *J. invest. Dermatol.* **94**:560A.
- Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., and Durum, S.K. (1986). There is more than one interleukin 1. *Immunol. Tod.* **7**:45-55.
- Patterson, M., and Chu, G. (1989). Evidence that *Xeroderma pigmentosum* cells from complementation group E are deficient in a homolog of yeast photolyase. *Mol. Cell Biol.* **9**:5105-5112.
- Pentland, A.P., and Mahoney, M.G. (1990). Keratinocyte prostaglandin synthesis is enhanced by IL-1. *J. Invest. Dermatol.* **94**:43-46.
- Rivas, J.M., and Ullrich, S.E. (1992). Systemic suppression of delayed-typed hypersensitivity by supernatants from UV- irradiated keratinocytes. *J. Immunol.* **149**:3865-3871.

- Roberts, L.K., Smith, D.R., Seilstad, K.H., and Jun, B.D. (1988). Photoimmunology: the mechanisms involved in immune modulation by UV radiation. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **2**:149-177.
- Robertson, B., Gahring, L., Newton, R., and Daynes, R.A. (1987). In vivo administration of IL-1 to normal mice decreases their capacity to elicit contact hyper-sensitivity responses: prostaglandins are involved in this modification of the immune response. *J. Invest. Dermatol.* **88**:380.
- Ross, J.A., Howie, S.E.M., Norval, M., and Maingay J. (1988). Systemic administration of urocanic acid generates suppression of the delayed type hypersensitivity response to herpes simplex virus in a murine model of infection. *Photodermatology* **5**:9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Ed.* Cold spring harbor laboratory press, New York (1989).
- Sancar, A., and Sancar, G.B. (1988). DNA repair enzymes *Ann. Rev. Biochem.* **57**:29-67.
- Sarasin, A., Robert-Knebelmann, C., and Sary, A. (1991). La réparation de l'ADN et les réparatososes. *Path. Biol.* **40**:169-177.
- Sauder, D.N., Monick, M.M., and Hunninghake, G.W. (1985). Epidermal cell derived thymocyte activating factor (ETAf) is a potent T cell chemoattractant. *J. Invest. Dermatol.* **85**:431-437.
- Schothorst, A.A., Evers, L.M., Noz, K.C., Filon, R., and Van Zeeland, A.A. (1991). Pyrimidine dimer induction and repair in cultured human skin keratinocytes or melanocytes after irradiation with monochromatic ultraviolet radiation. *J. Invest. Dermatol.* **96**:916-920.

- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF κ B Transcription factor and HIV-1. *Embo. J.* **10**:2247-2258.
- Schwarz, T., Urbanska, A., Gschnait, F., and Luger, T.A. (1987). UV-irradiated epidermal cells produce a specific inhibitor of interleukin 1 activity. *J Immunol* **138**:1457-1463.
- Setlow, R.B. (1989). Twenty five years of DNA repair, dans Castellani (Ed): DNA damage and repair. Plenum press, New York. p.1-11.
- Shirakawa, F., Saito, K., Bonagura, C.A., Galson, D.H., Fenton, M.J., Webb, A.C., and Auron, P.E. (1993). The human prointerleukin 1 β gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **13**:1332-1344.
- Silberberg, E., and Lubera, J.A. (1988). Cancer statistics. *CA* **38**:5-22.
- Slot, W.B., Taylor, J.R., and Strelein, J.W. (1987). Reduction of human epidermal Langerhans cells by in vivo exposure to ultraviolet B radiation. *J. Invest. Dermatol.* **88**:519.
- Snyder, D.R., Carrier, W.L., and Regan, J.D. (1981). Application of arabinofuranosyl cytosine in the kinetic analysis and quantitation of DNA repair in human cells after ultraviolet irradiation. *Biophys. J.*, **35**:339-350.
- Spellman, C.W., and Daynes, R.A. (1978). Properties of ultraviolet light-induced suppressor lymphocytes within a syngeneic tumor system. *Cell Immunol.* **36**:383.
- Staal, F.J.T., Roederer, M., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1990). Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor κ B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:9943-9947.

- Stein, B., Rahmsdorf H.J., Schönthal, A., Büscher, M., Ponta, H., and Herrlich, P. The UV induced signal transduction pathway to specific genes. In: Friedberg, E. Hanawalt, P. (Ed): Mechanisms and consequences of DNA damage processing. Liss, New York (1988), p. 557-570.
- Stein, B., Rahmsdorf, H.J., Steffen, A., Litfin, M., and Herrlich, P. (1989a). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell Biol.* **9**:5169-5181.
- Stein, B., Krämer, M., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., and Herrlich, P. (1989b). UV-induced transcription from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) long terminal repeat and UV-induced secretion of an extracellular factor that induces HIV-1 transcription in nonirradiated cells. *J. Virol.* **63**:4540-4544.
- Swartz, R.P. (1984). Role of UVB-induced serum factors in suppression of contact hypersensitivity in mice. *J. Invest. Dermatol.* **83**:305.
- Taïeb, A. (1992). Le kératinocyte. *Path. Biol.* **40**:85-93.
- Telford, J.L., Macchia, G., Massone, A., Carinci, V., Palla, E., and Melli, M. (1986). The murine interleukin 1 beta gene: structure and evolution. *Nucleic Acids Res.* **14**:9955-9963.
- Toews, G.B., Bergstresser, P.R., Tigelaar, R.E., and Strelein, J.W. (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J. Immunol.* **124**:445-453.
- Tron, V.A., Coughlin, M.D., Jang, D.E., Stanisiz, J., and Sauder, D.N. (1990). Expression and modulation of nerve growth factor in murine keratinocytes (PAM 212). *J. Clin. Invest.* **85**:1085-1089.
- Ullrich, S.E., McIntyre, B.W., and Rivas, J.M. (1990). Suppression of the immune response to alloantigen by factors released from ultraviolet-irradiated keratinocytes. *J. Immunol.* **145**:489-498.

- Valerie, K., Delers, A., Bruck, C., Thiriart, C., Rosenberg, H., Debouck, C., and Rosenberg, M. (1988). Activation of human immunodeficiency virus type 1 by DNA damage in HeLa cells. *Nature (Lond.)* **333**:78-81.
- Warner, S.J.C., Auger, K.R., Libby, and P. (1987). Interleukin-1 induces IL-1 gene expression in smooth muscle cells. *J. Exp. Med.* **165**:1316-1331
- Woloschak, G.E., and Chang-Liu, C.-M. (1990). Differential modulation of specific gene expression following high- and low-LET radiations. *Radiat. Res.* **124**:183-187.
- Zuckerman, S.H., Evans, G.F., and Guthrie, L. (1991). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. *Immunology* **73**:460-465.