

PATRICK J ROCHETTE

**CARTOGRAPHIE DES DIMÈRES
CYCLOBUTYLIQUES DE PYRIMIDINES (DCP)
INDUITS PAR LES UVA ET ÉTUDE DES EFFETS DE
CERTAINS GÈNES DE RÉPARATION DES
MÉSAPPARIEMENTS ET DU GÈNE P53 MUTÉ SUR
LA RÉPARATION PAR EXCISION DE
NUCLÉOTIDES DES DCP**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

MARS 2005

Résumé Court

Les cancers cutanés sont associés à la formation des dimères cyclobutyliques de pyrimidine (DCP) générés par les ultraviolets (UV) du soleil. Nos résultats indiquent que les transversions T→G retrouvées suite aux UVA sont dues aux DCP formés majoritairement sur les TT. Nous avons également démontré que, contrairement au dogme établi, les protéines réparant les mésappariements n'influencent pas la réparation des DCP. *p53* a indéniablement une influence sur la réparation des DCP. Cependant, la lignée SW480, contenant un gène *p53* double-muté, est fonctionnelle en réparation par excision de nucléotides des DCP. Normalement, un stress est nécessaire à l'activation des effecteurs de *p53*. Cependant, la protéine *p53* double-mutée des SW480 active constitutivement *p21*, un effecteur de *p53*. L'activation des protéines réparant les DCP par *p53* se fait probablement de la même façon que *p21*. L'éclaircissement de ces mécanismes a amené une meilleure compréhension de l'induction des cancers.

Résumé Long

La compréhension des mécanismes complexes d'initiation des cancers est essentielle à l'élaboration d'un traitement. La fréquence d'apparition des mutations précancéreuses dépend, entre autres, de la fréquence des dommages induits par des agents carcinogènes et de la vitesse de réparation de ces dommages. Les travaux présentés dans cette thèse aident à mieux comprendre ce qui influence la fréquence et la réparation des dommages potentiellement mutagènes. Les cancers cutanés sont indéniablement causés par les dimères cyclobutyliques de pyrimidine (DCP) produits par la composante ultraviolette (UV) du soleil. Cependant, jusque récemment, seuls les UVB et les UVC étaient reconnus pour générer des DCP. Grâce à la technique de ligation-mediated PCR (LMPCR), nous avons démontré que les UVA induisent des DCP majoritairement sur les dipyrimidines TT. Ce qui concorde avec les transversions T→G retrouvées suite aux UVA. Concernant la réparation des dommages induits par tous les types d'UV, une équipe a montré précédemment que les protéines qui réparent les mésappariements (MMR) catalysaient la réparation des DCP par excision de nucléotide (NER) sur le brin transcrit des gènes actifs (TCNER). Toujours à l'aide de la LMPCR, nous avons montré que les protéines de la MMR n'ont aucune influence sur la TCNER. De son côté, le gène supresseur de tumeurs *p53* a indéniablement une influence sur la NER. Cependant, la lignée d'adénocarcinome colorectal SW480 contient des mutations dans *p53* et est fonctionnelle en NER. Nous avons tenté d'éclaircir cette contradiction. Nous avons montré que, dans les SW480, le gène *p53* est en 3 copies contenant chacune 2 mutations. Malgré ces 2 mutations, *p53* est capable de lier sa séquence consensus *in vitro*. Dans les lignées normales en *p53*, un stress est nécessaire à la liaison de *p53* à ses effecteurs. Cependant, il a semblé que le *p53* double-muté active constitutivement *p21*, un effecteur connu de *p53*. Nous pensons qu'un phénomène semblable se produit au niveau des gènes de la NER activés par *p53* et que c'est ce qui amènerait une réparation NER normale. Il est certain que l'éclaircissement de ces mécanismes a amené une meilleure compréhension de l'induction des cancers.

Avant-propos

Remerciements

Ce document est le reflet de plus de cinq années d'étude et de travail acharné. Il serait cependant insensé de penser accomplir ce travail sans l'appui de plusieurs personnes qui me sont chères. Avant de débiter, je tiens donc à remercier ceux et celles qui ont contribué de façon directe ou indirecte à la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Régen Drouin, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je me souviens de notre première rencontre comme si c'était hier. Dr Drouin m'a donné tous les outils nécessaires afin de mener à bien ce doctorat. Il m'a permis d'acquérir une grande autonomie, un sens critique, une rigueur scientifique et une capacité de réflexion qui me permettront, je l'espère, d'avoir une belle carrière comme chercheur. Dr Drouin, j'ai beaucoup d'admiration et de reconnaissance pour vous.

Je tiens également à remercier les organismes subventionnaires qui ont fourni l'argent nécessaire à la réalisation des projets. Tous ces organismes sont énumérés dans la section « Remerciements » à la fin des articles (Chapitres 2, 3 et 4 et Annexe) inclus dans cette thèse.

Il est important pour moi de remercier les étudiants et les assistants de recherches qui ont constitué l'équipe du Dr Drouin pendant ces années. Plus que des collègues, j'ai trouvé des amis en ces personnes. Grâce à leur amitié, leur aide et leur appui, j'ai passé de très belles années avec eux. Parmi eux, une pensée spéciale revient à Nathalie Bastien. Une grande amitié ainsi qu'une grande complicité ont germé de tout ce bon temps passé ensemble. J'ai appris énormément à son contact, tant sur le plan scientifique que personnel.

Nathalie, je tiens à te remercier de toujours avoir été là, surtout quand je passais des bouts difficiles.

Je voudrais remercier mes parents, Huguette et Jean-Paul, pour leur appui, leur compréhension mais surtout pour leur amour. Vous avez toujours cru en moi et m'avez donné tous les outils nécessaires afin que je puisse accomplir mes rêves. Sans vous, je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui. La famille est très importante, elle nous amène une force inestimable. Une force qui m'a souvent été nécessaire.

Finalement, j'aimerais remercier celle qui partage ma vie malgré tous les sacrifices que ça implique. Mireille, tu es une sainte d'endurer une personne qui n'a pas d'horaire, qui semble vouloir rester étudiant toute sa vie, qui n'a aucune stabilité et qui ne sait trop où la vie le mènera... Ta compréhension, ton soutien et ton amour m'ont permis de réaliser mes projets. Mireille, je t'aime.

Contribution aux travaux publiés

Les paragraphes qui suivent sont une description de ma contribution et celle des co-auteurs aux ouvrages scientifiques qui composent ma thèse.

Chapitre II

Ces travaux ont été publiés dans la revue scientifique « Nucleic Acids Research ». La moitié des travaux inclus dans cet article ont été effectués dans le laboratoire du Dr Évelyne Sage, à l'Institut Curie (Paris, France). L'autre moitié a été effectué sous la supervision du Dr Régen Drouin, au centre de recherche de l'hôpital St-François d'Assise (Québec). Ma contribution dans cet article concerne la préparation des protocoles, l'exécution des manipulations, l'interprétation, la préparation des figures et la révision du manuscrit. Jean-Philippe Therrien (étudiant de Dr Drouin à ce moment) a reproduit une partie des manipulations pour fin de validation. La rédaction a été faite par Dr Régen Drouin, Dr Évelyne Sage et Dr Elliot A Drobetsky. Dans l'ensemble des travaux incluant la rédaction, ma contribution relative est de 60%.

Chapitre III

Ces travaux ont été publiés dans la revue scientifique « Oncogene ». Ma contribution à cet article concerne la préparation des protocoles, l'exécution des manipulations, l'interprétation, la préparation des figures. Une partie (5%) des travaux ont été effectués par le Dr Bruce C McKay et une partie (5%) par le Dr Elliot A Drobetsky. La rédaction a été faite principalement par le Dr Drobetsky mais j'ai contribué d'une manière significative à la rédaction de la section « matériel et méthodes » et à la section « résultats ». Dans l'ensemble des travaux incluant la rédaction, ma contribution relative est de 70%.

Chapitre IV

Ces travaux ont été soumis à la revue scientifique « Journal of Molecular Biology ». Ma contribution à cet article concerne la détermination du modèle expérimental, la préparation des protocoles, l'exécution des manipulations, l'interprétation, la préparation des figures et l'écriture de tout l'article. Le Dr Régen Drouin et le Dr Sylvain L Guérin ont supervisé l'écriture de l'article. Dans l'ensemble des travaux incluant la rédaction, ma contribution relative est de 80%.

À Huguette, Jean-Paul et Mireille, je dédie cette thèse.

Table des matières

Résumé Court.....	i
Résumé Long.....	ii
Avant-propos.....	iii
Table des matières.....	viii
Liste des figures et tableaux.....	x
Liste des abréviations et des symboles.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Généralités.....	2
1.1.1 La peau (Figure 1).....	2
1.1.2 « Le côté sombre du soleil ».....	4
1.2 Composante UV du soleil.....	7
1.3 Dommages induits par la composante UV du soleil.....	9
1.3.1 Les Dimères Cyclobutylques de Pyrimidines (DCP).....	9
1.3.2 Les Photoproduits de Pyrimidines (6-4) Pyrimidones (6-4PP).....	9
1.3.3 Facteurs influençant la formation des DCP et des 6-4PP.....	12
1.3.4 Autres types de dommages induits par les UV.....	14
1.4 Mécanismes de réparation des DCP et des 6-4PP.....	15
1.4.1 Photoréversion.....	15
1.4.2 Réparation par excision de bases (BER).....	17
1.4.3 Réparation par excision de nucléotides (NER).....	19
1.4.3.1 Protéines impliquées dans la NER.....	19
1.4.3.2 Étapes de la NER.....	19
1.4.3.3 Maladies associées à déficience de la NER.....	22
1.5 Les UV induisent des mutations.....	23
1.5.1 Mutations « signatures » des UV.....	23
1.5.2 Théorie de la mutagenèse somatique.....	24
1.6 p53 en réponse au stress des UV.....	29
1.6.1 Point de contrôle (« Checkpoint ») G1/S (Figure 11).....	29
1.6.2 Apoptose.....	30
1.6.3 La théorie du « Double Punch » solaire.....	32
1.7 Technologie de la Ligation-Mediated PCR (Figure 12).....	32
1.8 Contexte et objectifs de recherche.....	35
1.8.1 Chapitre 2 : Les UVA comme agent mutagène.....	35
1.8.2 Chapitre 3 : Influence des protéines de la réparation des mésappariements (MMR) dans la NER.....	36
1.8.3 Chapitre 4 : Les cellules SW480 : Caractérisation cytogénétique et statut de <i>p53</i>	37
Chapitre 2 : UVA-Induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells.....	39
2.1 Résumé en français.....	40
2.2 Article.....	41
2.2.1 Résumé (anglais).....	42

2.2.2 Introduction.....	43
2.2.3 Matériel et Méthodes	46
2.2.4 Résultats et Discussion	49
2.2.5 Remerciements.....	56
2.2.6 Références.....	57
2.2.7 Table I.....	61
2.2.8 Légendes des figures.....	62
Chapitre 3 : Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes <i>hMLH1</i> or <i>hMSH2</i> are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair.....	68
3.1 Résumé en français	69
3.2 Article	70
3.2.1 Résumé (anglais).....	71
3.2.2 Introduction.....	72
3.2.3 Matériel et Méthodes	75
3.2.4 Résultats et Discussion	78
3.2.5 Abréviations.....	82
3.2.6 Remerciements.....	82
3.2.7 Références.....	83
3.2.8 Table 1	86
3.2.9 Légendes des figures.....	87
Chapitre 4 : SW480, a double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions.....	98
4.1 Résumé en français	99
4.2 Article	100
4.2.1 Résumé (anglais).....	101
4.2.2 Introduction.....	102
4.2.3 Matériel et Méthodes	105
4.2.4 Résultats.....	110
4.2.5 Discussion.....	115
4.2.6 Abréviations.....	121
4.2.7 Remerciements.....	122
4.2.8 Références.....	123
4.2.9 Table 1	131
4.2.10 Légendes des figures.....	132
Chapitre 5 : Discussion et Conclusion.....	144
5.1 Discussion sur le Chapitre 2	145
5.2 Discussion sur le Chapitre 3	149
5.3 Discussion sur le Chapitre 4	151
5.4 Conclusion générale.....	155
Bibliographie (Chapitres 1 et 5).....	157

Liste des figures et tableaux

Chapitre 1 (Introduction)

Figure 1 Représentation schématique des différentes couches qui constituent la peau.....	3
Figure 2 Photos montrant un exemple de chacun des types de cancers cutanés.....	6
Figure 3 Représentation schématique du spectre des radiations électromagnétiques du soleil.....	8
Figure 4 Représentation schématique d'un dimère cyclobutylique de pyrimidines (TT). ..	11
Figure 5 Représentation schématique d'un photoproduit de pyrimidines (6-4) pyrimidone (TC).....	11
Figure 6 Représentation schématique de la réparation d'un DCP par la photolyase DCP de <i>E. Coli</i>	16
Figure 7 Représentation schématique du principe de réparation d'un DCP par la T4 endonucléase V comme modèle de réparation BER.....	18
Figure 8 Représentation schématique de la voie de réparation des DCP par NER.	20
Figure 9 Représentation schématique de la théorie de la mutagenèse somatiques.....	26
Figure 10 Représentation schématique de la désamination d'une cytosine et d'une 5-méthylcytosine.....	28
Figure 11 Représentation schématique de la voie d'induction de l'arrêt au point de contrôle G1/S.	31
Figure 12 Représentation schématique des différentes étapes de la technique LMPCR.....	34

Chapitre 2

Table 1 Proportion relative de formation des DCP aux quatre types dipyrimidiniques, sur les deux brins de l'exon 2 du gène <i>aprt</i> dans les cellules CHO, suite à une irradiation aux UVA, UVB, UVC et à la SSL.....	61
Figure 1 Induction de DCP suite à une irradiation aux UVA, UVB, UVC et à la SSL, au nucléotide près, sur le brin non-transcrit de l'exon 2 du gène <i>aprt</i> des cellules CHO.	64
Figure 2 Distribution des DCP et des mutations induites par les UVA, les UVB, les UVC et la SSL sur l'exon 2 du gène <i>aprt</i> des cellules CHO.	66
Figure 3 Distribution des DCP induits par les UVA, les UVB, les UVC et la SSL sur le brin transcrit de l'exon 2 du gène <i>aprt</i> dans les cellules CHO.	67

Chapitre 3

Table 1 Réparation, en fonction du brin, des dimères cyclobutyliques de pyrimidines dans les fibroblastes CSB immortalisés, ainsi que dans les cellules d'adénocarcinome HCT116, HCT116-chr3, LoVo et SW480 suite à une irradiation aux UVB et aux UVC (254 nm).....	86
Figure 1 Niveau de résistance à la 6-thioguanine dans les cellules d'adénocarcinome colorectal compétentes en MMR en comparaison avec les déficientes en MMR.	90
Figure 2 (a) Autoradiogramme LMPCR montrant la réparation, au nucléotide près, des DCP induits par les UVB sur le brin transcrit du proto-oncogène <i>c-jun</i> dans les cellules déficientes en MMR HCT116 (gauche) et les cellules compétentes en MMR HCT116-chr3 (droite). (b) Représentation graphique de la vitesse de réparation des DCP.....	91
Figure 3 Autoradiogramme LMPCR montrant la réparation, au nucléotide près, des DCP induits par les UVB sur le brin non-transcrit du proto-oncogène <i>c-jun</i> dans les cellules déficientes en MMR HCT116 (gauche) et les cellules compétentes en MMR HCT116-chr3 (droite).	92
Figure 4 Autoradiogramme LMPCR montrant la réparation, au nucléotide près, des DCP induits par les UVB sur le brin transcrit du gène suppresseur de tumeurs <i>p53</i> dans les cellules déficientes en MMR LoVo (gauche) et les cellules compétentes en MMR SW480 (droite).	93
Figure 5 Autoradiogramme LMPCR montrant la réparation, au nucléotide près, des DCP induits par les UVB sur le brin non-transcrit du gène suppresseur de tumeurs <i>p53</i> dans les cellules déficientes en MMR LoVo (gauche) et les cellules compétentes en MMR SW480 (droite).	94
Figure 6 Autoradiogramme LMPCR montrant la réparation, au nucléotide près, des DCP induits par les UVB sur le brin transcrit (droite) et non-transcrit (gauche) du gène suppresseur de tumeurs <i>p53</i> dans les cellules déficientes en TCNER, les fibroblastes CS-B.....	95
Figure 7 Cytotoxicité induite par les UV dans des lignées cellulaires différentes par leur statut en MMR.	96
Figure 8 Effet du statut de la MMR sur la reprise de la synthèse d'ARN suite à une irradiation aux UVB.....	97

Chapitre 4

Table 1 Résumé des altérations chromosomiques trouvées dans la lignée cellulaire SW480 et comparaison de ces altérations avec celles retrouvées par d'autres groupes de recherche.	131
Figure 1 Caryotype représentatif des cellules SW480 produit à l'aide des techniques GTG banding et m-FISH.....	135
Figure 2 Analyse FISH utilisant une sonde spécifique pour <i>p53</i> fait en parallèle avec un PRINS utilisant des amorces spécifiques pour la région centromérique du chromosome 17.	137
Figure 3 (a) Résultat du séquençage du fragment amplifié contenant les codons 273 et 309. (b) Représentation schématique du test utilisant les enzymes de restrictions pour détecter les mutations aux codons 273 et 309. (c) Gel d'agarose montrant le produit PCR clivé par les enzymes de restriction.....	138
Figure 4 Analyse par western de l'expression de p53 dans les cellules SW480, LoVo et LF041.....	139
Figure 5 Analyse par immunofluorescence du niveau de p53 dans les cellules SW480, LoVo et LF041.....	140
Figure 6 Analyse par western de l'expression de $p21^{Cip1/WAF1}$ dans les cellules LoVo, LF041 et SW480.....	141
Figure 7 Empreinte génomique in vivo du promoteur de $p21^{Cip1/WAF1}$ dans les cellules SW480, LoVo et LF041.....	142
Figure 8 Analyse par EMSA de la liaison de p53, extrait des cellules SW480, LoVo et LF041, à sa séquence consensus.....	143

Liste des abréviations et des symboles

5,10-MTHF	Methenyltetrahydrofolate
5-OhdC	5-Hydroxy-2'-désoxycytidine
6-4PP	Photoproduit de Pyrimidine (6-4) Pyrimidone
8-oxodA	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadenine
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
A	Adénine
Ac ou « Ab »	Anticorps
ACD	Association Canadienne de Dermatologie
AND ou « DNA »	Acide DésoxyriboNucléique
AP	Apurinique Apyrimidinique
aprt	Adenine phosphoribosyl transferase
ARN ou « RNA »	Acide RiboNucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BCC	Carcinome Baso-Cellulaire
BER	Réparation par excision de bases
BSA	« Bovine Serum Albumin »
C	Cytosine
CHO	« Chinese Hamster Ovarian »
CS	Syndrome de Cockayne
CSA	Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation A
CSB	Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation B
DCP ou « CPD »	Dimère cyclubutylique de pyrimidines
DHFR	DiHydroFolate Reductase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMSA	« Electrophoretic Mobility Shift Assay »
ERCC1	« Excision Repair Cross Complementation group-1 »
FADH	Flavine
FBS	« Fetal Bovine Serum »
FISH	« Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization »
G	Guanine
GGNER	Réparation par excision de nucleotides génomique globale
GTG	Bandes G produite par la Trypsin et colorées au Giemsa
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC-MS/MS	« Hi-Pressure Liquide Chromatography » couplé à deux spectromètres de masse
J	Joule
kDa	KiloDalton
LMPCR	« Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction »
m	Mètre
m-FISH	« Multicolor Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization »
MMR	Réparation des mésappariements

NER	Réparation par excision de nucléotides
nm	NanoMètre
NMSC	Cancers de la Peau Non-Mélanocytiques
·OH	Radical hydroxyle
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
pb ou « bp »	Paire de Base
PRINS	« Primed <i>In Situ</i> labeling »
Pyr ^m CpG	Site dipyrimidinique contenant une cytosine méthylée
Rb	Retinoblastome
RFC	Facteur de réplication C
ROS	Espèces réactives d'oxygène ou « reactive oxygen species »
RPA	Protéine de réplication A
SCC	Carcinome Spino-Cellulaire
SKY	« Spectral Karyotyping »
SSL	Lumière Solaire Simulée
T	Thymidine
T4 endo V	T4 endonucléase V
TCNER	Réparation par excision de nucléotides couplée à la transcription
TDPCR	« Terminal Transferase-dependent Polymerase Chain Reaction »
TFIIH	Facteur de transcription basale
TTD	Trichothiodystrophie
UV	Ultraviolets
UVA	Ultraviolets de type A
UVB	Ultraviolets de type B
UVC	Ultraviolets de type C
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation A
XPB	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation B
XPC	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation C
XPD	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation D
XPF	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation F
XPG	Xeroderma pigmentosum de groupe de complémentation G

Chapitre 1 Introduction

1.1 Généralités

Cette thèse est le reflet de plus de cinq années de travail sur la cartographie et la réparation des dommages induits dans l'ADN par les ultraviolets (UV) du soleil. Pour bien comprendre le cadre dans lequel s'intègre nos travaux, une introduction générale de la mutagenèse solaire s'impose.

1.1.1 La peau (Figure 1)

La peau est l'organe délimitant l'interface interne/externe de l'être humain. Elle assure plusieurs fonctions telles la protection contre des stress externes (température, pression, pollution, agents chimiques,...) , la thermorégulation, la sensation tactile et la sécrétion de diverses substances (sueur, sébum,...). Elle est constituée de trois principales couches. De la plus profonde à la plus superficielle, on retrouve l'hypoderme, constitué principalement de tissu adipeux; le derme, contenant des fibroblastes synthétisant le tissu de soutien fibro-élastique, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des terminaisons nerveuses; et l'épiderme, qui est en contact direct avec l'extérieur.

De par sa position, l'épiderme est la couche la plus en contact avec les stress externes et environnementaux et donc la plus susceptible de subir les effets des radiations solaires. C'est donc celle qui est touchée lors de cancers cutanés. À la surface de l'épiderme, la couche cornée (ou stratum corneum) formée de kératine produite par les kératinocytes est la première ligne de défense pour les UV. Sous la couche cornée, on retrouve principalement trois types cellulaires pouvant tous se transformer en tumeurs. À la base de l'épiderme, on retrouve des cellules cubiques ou cylindriques, les cellules basales. Près de la surface, sont présentes les cellules squameuses, appelées aussi kératinocytes. Finalement, en nombre moins important, on retrouve les mélanocytes qui se situent plus au niveau de la couche basale, mais qui peuvent avoir des extensions qui atteignent la surface de l'épiderme.

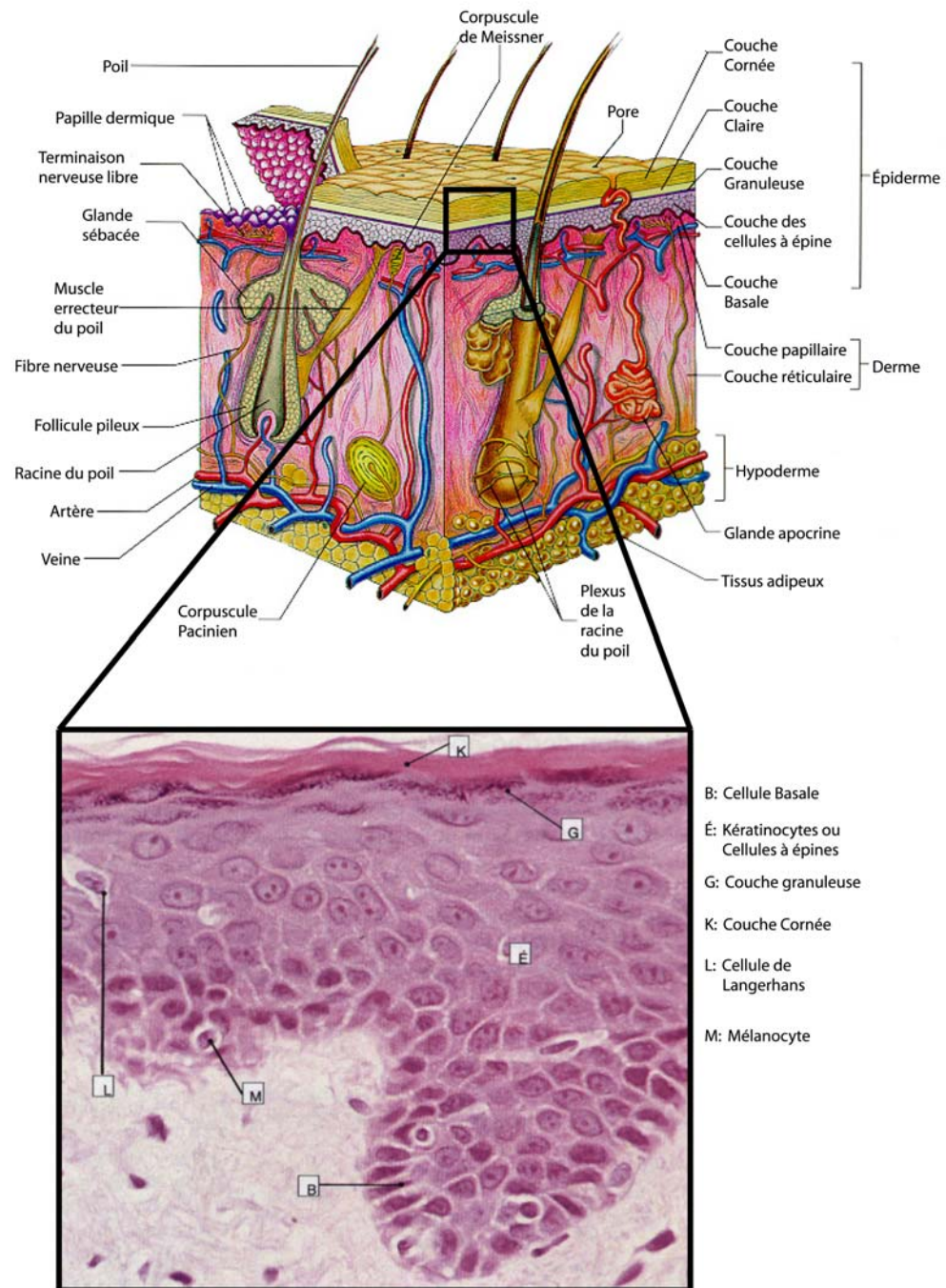


Figure 1 Représentation schématique des différentes couches qui constituent la peau.

1.1.2 « Le côté sombre du soleil »

Il est indéniable que le soleil est essentiel aux humains et à la vie sur terre. Cependant, comme rien n'est parfait, il possède certains effets secondaires néfastes.

Les trois types de cellules constituant l'épiderme peuvent devenir néoplasiques pour donner les trois types de cancers de la peau : les mélanomes et les cancers de la peau non-mélanocytiques (NMSC), soit les carcinomes spinocellulaires et les carcinomes basocellulaires (**Figure 2**).

Les carcinomes spinocellulaires (SCC) prennent naissance au niveau des cellules squameuses de la surface de l'épiderme et les carcinomes basocellulaires (BCC) proviennent des cellules basales de l'épiderme. De façon routinière, les cellules squameuses et basales prolifèrent, se différencient et se rendent dans les couches superficielles de l'épiderme. Des expositions chroniques au soleil génèrent des zones de kératoses actiniques contenant des kératinocytes qui se différencient et prolifèrent de façon aberrante (de Gruijl and Forbes 1995). La majorité de ces kératoses vont régresser mais environ une sur mille va progresser en SCC. Les SCC sont souvent aneuploïdes et peuvent entraîner des métastases. Ils sont la cause de la majorité des cas de mortalité suite à un NMSC. De leur côté, les BCC semblent apparaître sans signe précurseur, souvent au niveau des follicules pileux. Ils sont normalement diploïdes et présentent rarement des métastases. Les SCC et BCC apparaissent surtout en âge avancé (70 ans et plus). On les retrouve principalement au niveau des zones exposées au soleil, soit sur le visage, le cou et les mains. S'ils sont détectés assez tôt, la majorité des NMSC sont traités dans le bureau du médecin à l'aide d'une anesthésie locale et d'une exérèse. Les caractéristiques des personnes susceptibles de développer un NMSC sont les suivantes :

- 1) Antécédents personnels d'épithélioma cutané
- 2) Âge avancé
- 3) Type caucasien (yeux bleus, peau claire, cheveux roux ou blonds)
- 4) Faible aptitude au bronzage (les gens qui « brûlent » plutôt que de bronzer)
- 5) Densité élevée de taches de rousseurs
- 6) Importante exposition cumulative à vie au soleil

De son côté, le mélanome est formé à partir des mélanocytes, des cellules qui ne prolifèrent pas en condition normale. Les mélanocytes produisent la mélanine, un pigment brunâtre qui protège des effets néfastes du soleil. Le mélanome commence par une prolifération radiale des mélanocytes. Il devient menaçant lorsque la lésion radiale commence à se développer verticalement. Les métastases deviennent alors possible. Le mélanome peut être sur n'importe quelle partie du corps et peut apparaître chez les jeunes adultes. S'il n'est pas diagnostiqué très tôt dans son développement, les chances de survie sont faibles. Il est beaucoup plus mortel que les NMSC, mais il est heureusement moins fréquent.

En Australie et au sud des États-Unis d'Amérique, le nombre de cas de cancer de la peau excède tous les autres types de cancers combinés et son incidence est toujours en augmentation. Selon l'Association Canadienne de Dermatologie (ACD), il y aura 30% plus de nouveaux cas de cancers de la peau cette année au Canada qu'il y a dix ans. En fait, l'ACD estime qu'il y aura plus de 76 000 nouveaux cas de cancers de la peau en 2004 alors qu'en 1994, 58 500 nouveaux cas ont été recensés. En 1992, il y a eu 51 000 cas dont 80% étaient des BCC, 15% des SCC et 5% des mélanomes. Toujours selon les chiffres de l'ACD, chez les hommes canadiens, le taux de mortalité dû au cancer cutané a grimpé de 41% depuis 1988. En 1993, 2950 cas de cancers de la peau étaient des mélanomes. De ce

nombre, 560 en sont décédés, ce qui représente un taux de mortalité de 19%. L'incidence des mélanomes et le taux de mortalité est en augmentation dans la plupart des pays où il y a eu recensement (Marks 2000). Cette croissance alarmante des cas d'épithéliomas cutanés est causée par plusieurs facteurs tels l'obsession des plages et des salons de bronzage, l'amincissement de la couche d'ozone, l'utilisation de crèmes solaires ne bloquant pas les UVA, ...

En plus du cancer de la peau, plusieurs autres effets néfastes peuvent être observés suite à une exposition excessive et chronique aux radiations solaires. Parmi ces effets, nous comptons le vieillissement prématuré de la peau, aussi appelé photo-vieillesse, une immunosuppression et des dommages au cristallin et à la rétine de l'œil.

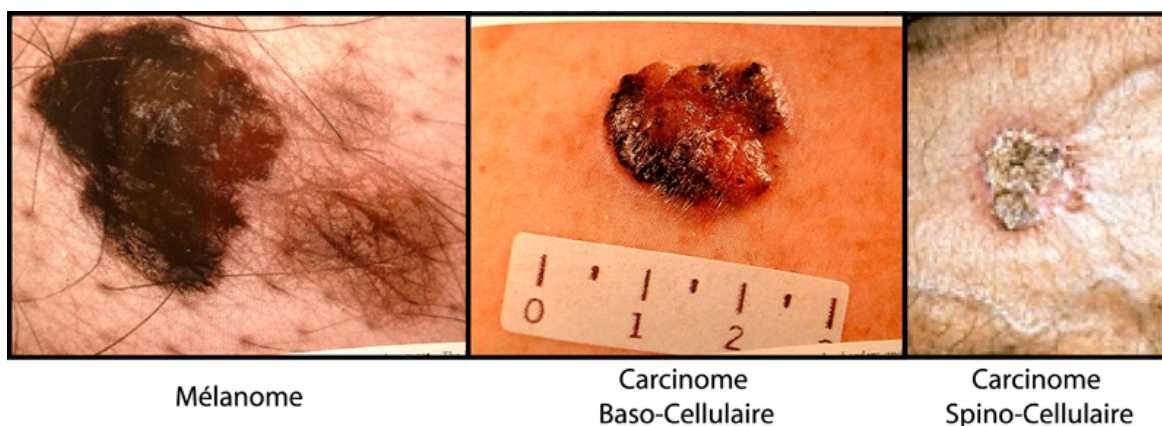


Figure 2 Photos montrant un exemple de chacun des types de cancers cutanés.

1.2 Composante UV du soleil

Le soleil émet un spectre continu de radiations électromagnétiques qui peuvent être divisées en trois principales catégories en fonction de leur longueur d'onde (**Figure 3**). On retrouve les UV, compris entre 100 et 400 nm, la lumière visible, de 400 à 700 nm et les infrarouges, au-dessus de 700 nm. Bien que les longueurs d'ondes de plus de 400 nm sont importantes dans le rôle du soleil sur terre, mes travaux de doctorat sont concentrés sur la composante UV du soleil.

Les UV sont divisés en trois sous-catégories. Les UVA (320–400 nm, les UVB (280–320 nm) et les UVC (100–280 nm). Les longueurs d'ondes sous 300 nm ne se rendent pas à la surface de la terre car elles sont complètement absorbées par la couche d'ozone. Heureusement pour nous car les UVC sont les plus énergétiques et les plus efficaces à endommager l'ADN. Cependant, la couche d'ozone tend à s'amincir et les longueurs d'ondes auxquelles nous sommes exposés sont de plus en plus courtes. On estime que, sans la couche d'ozone, les cancers de la peau augmenteraient par un facteur de 10^8 fois (Brash 1997). Les UVB constituent 0,3% de l'énergie solaire terrestre et sont partiellement absorbés par la couche d'ozone (<300 nm). Par rapport aux UVC, ils sont moins absorbés par l'ADN. Les UVB pénètrent les couches superficielles de l'épiderme et vont causer de l'érythème, des brûlures (coups de soleil). Ils peuvent aussi causer des dommages à la rétine de l'oeil.

De leur côté, les UVA, qui constituent 5,1% de l'énergie solaire terrestre, sont, relativement aux UVB et UVC, beaucoup moins énergétiques (environ 10^5 fois moins énergétiques que les UVB) et ne sont théoriquement pas absorbés directement par l'ADN. Ils sont reconnus pour être en cause dans le photo-vieillessement de la peau. Les UVA, en combinaison avec du psoralène (en voie orale ou topique), servent à traiter certaines maladies de peau tels que le psoriasis, le mycosis, le vitiligo, ... (Honigsmann, Szeimies et al. 1999).

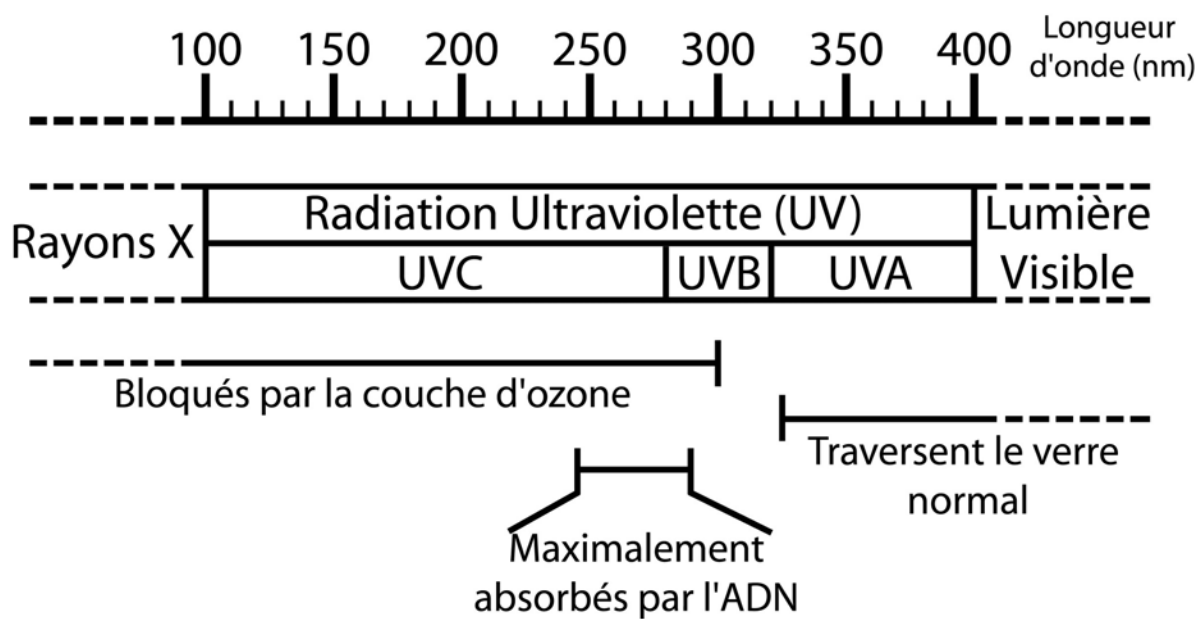


Figure 3 Représentation schématique du spectre des radiations électromagnétiques du soleil.

1.3 Dommages induits par la composante UV du soleil

La longueur d'onde maximale d'absorbance de l'ADN se situe aux alentours de 260 nm. Plus précisément, l'ADN absorbe les longueurs d'ondes entre 245 à 290 nm (Tornaletti and Pfeifer 1996), c'est-à-dire les UVC et, de façon moindre, les UVB. Cette absorption des UV par l'ADN fournit l'énergie nécessaire à la liaison covalente de pyrimidines adjacentes. Cette liaison peut se faire de deux manières différentes, amenant la génération des deux principaux types de photo-dommages: les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP) et les photoproduits de pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP). Les DCP et les 6-4PP sont les deux principaux types de dommages induits par les UV.

1.3.1 Les Dimères Cyclobutyliques de Pyrimidines (DCP)

Suite à une exposition aux UVB ou aux UVC, les DCP sont en moyenne trois fois plus fréquemment formés que les 6-4PP (Tornaletti and Pfeifer 1996). Ils sont générés lorsque deux pyrimidines adjacentes se lient de façon covalente pour former une structure en anneau à quatre membres où les carbones 5 et 6 de chaque pyrimidine sont impliqués. Le tout résulte de la saturation de leurs doubles liens 5,6 respectifs (Wang 1965; Lober and Kittler 1977) (**Figure 4**). Les DCP créent une distorsion de l'ADN d'environ 7 à 9 degrés par rapport à sa conformation B (Wang and Taylor 1991; Kim and Choi 1995; Kim, Patel et al. 1995). Cette distorsion empêche une majorité des ADN polymérase et des ARN polymérase de passer. Les DCP, comme les 6-4PP (voir section 1.3.2) ne peuvent pas être générés par un autre type d'agent mutagène connu.

1.3.2 Les Photoproduits de Pyrimidines (6-4) Pyrimidones (6-4PP)

Les 6-4PP sont formés lorsqu'une structure en anneau à quatre membres est créée entre les carbones 5 et 6 d'une base pyrimidinique en 5' et le carbone 4 et l'oxygène ou le groupement imino tautomère à la position 4 d'une pyrimidine en 3'. Cet anneau se rompt spontanément, résultant en un transfert d'un groupement hydroxy ou amino au carbone 5 de

la pyrimidine en 5'. De ceci résulte la formation d'un pont stable entre la position 6 et 4 de deux pyrimidines adjacentes (Friedberg, Walker et al. 1995) (**Figure 5**). Les 6-4PP sont produits à environ à 15-30% du niveau des DPC suite aux UVB et UVC (LeClerc, Borden et al. 1991). Ce ratio est cependant très dépendant du contexte de séquence et de l'environnement chromatinien (voir section 1.3.3). Sur l'ADN, les 6-4PP créent une distorsion d'environ 44 degrés par rapport à la conformation B de l'ADN (Kim and Choi 1995; Kim, Patel et al. 1995). De ce fait, ils bloquent une vaste majorité des ARN polymérases et des ADN polymérases lors de la transcription ou de la réplication. À 313 nm, les 6-4PP sont convertis en leur photoisomère de valence Dewar. De ce fait, les 6-4PP formés sur notre ADN suite à une irradiation extérieure sont généralement convertis en photoisomères Dewar (Clingen, Arlett et al. 1995).

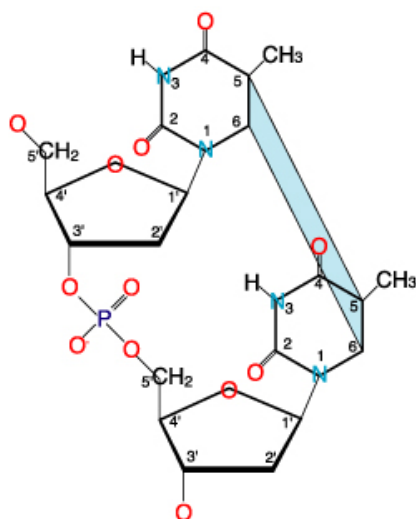


Figure 4 Représentation schématique d'un dimère cyclobutylique de pyrimidines (TT).

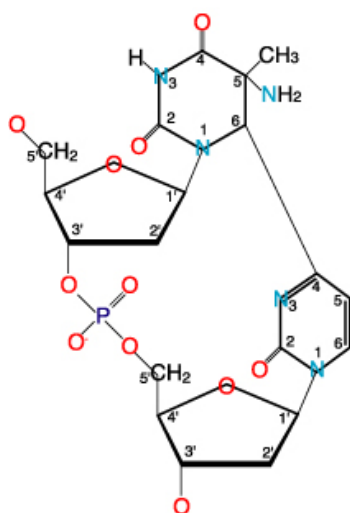


Figure 5 Représentation schématique d'un photoproduit de pyrimidines (6-4) pyrimidone (TC).

1.3.3 Facteurs influençant la formation des DCP et des 6-4PP

Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation des DCP et des 6-4PP sur l'ADN : la séquence en nucléotides de l'ADN, la longueur d'onde d'irradiation (UVA, UVB ou UVC), la méthylation, la structure chromatinienne et la présence de protéines liées à l'ADN.

Des recherches ont indiqué qu'*in vitro*, les DCP sont majoritairement formés au niveau des séquences TT et moins au niveau des CC (Brash and Haseltine 1982). Plus précisément, la distribution des DCP au niveau des quatre types de sites dipyrimidiniques TT:CT:TC:CC est de 68:13:16:3 pour un plasmide irradié aux UVC et de 52:19:21:7 pour un même plasmide irradié aux UVB. On peut supposer que ces résultats sont similaires chez l'humain (Mitchell, Jen et al. 1992; Tornaletti, Rozek et al. 1993). Pour leur part, les 6-4PP sont observés principalement au niveau des séquences TC, CC et moins fréquemment TT. Ils sont très rarement formés au niveau des séquences CT (Lippke, Gordon et al. 1981; Brash, Seetharam et al. 1987; Pfeifer, Drouin et al. 1991).

D'autres éléments influencent la distribution des dommages au niveau de la séquence. En effet, les longues séquences de pyrimidines adjacentes sont plus favorables à la formation de DCP et de 6-4PP, que les sites dipyrimidines isolés entre des purines (Tornaletti and Pfeifer 1996). Lorsqu'on retrouve une pyrimidine en 5', la formation des DCP est également favorisée. De plus, la présence d'une guanine en 5' inhibe de manière plus importante la formation d'un DCP que la présence d'une adénine.

La distribution des DCP au niveau des sites dipyrimidiniques contenant un C méthylé (Pyr^mCpG) dépend de la longueur d'onde. En fait, une méthylation d'un C dans un site dipyrimidinique entraîne une augmentation de la quantité de DCP formés à ce site suite à une irradiation aux UVB, en comparaison à ce même site, non-méthylé. Ceci s'explique par le fait que la longueur d'absorption des C méthylés est de 273 nm alors que celle des C non-méthylés est de 267 nm. Pour ce qui est des 6-4PP, la méthylation d'une cytosine en son carbone 5 inhibe leur formation (Pfeifer, Drouin et al. 1991).

En dehors de l'événement de la division cellulaire, l'ADN génomique est arrangé en forme de collier de perles. Les perles représentent les nucléosomes (« core DNA ») et l'espace de longueur variable qui sépare les perles est de l'ADN de liaison (« linker DNA »). Les nucléosomes sont composés de 146 pb enroulées autour d'un octamère d'histones. Dans le nucléosome, l'ADN a une périodicité d'environ 10 pb/tours et les DCP y sont formés à intervalle d'environ 10 bases (Gale, Nissen et al. 1987; Pehrson 1989), alors qu'ils sont formés uniformément sur l'ADN de liaison, sans périodicité (Pehrson 1995). Quand l'ADN est sous forme de nucléosomes, il est tordu et c'est ce qui semble influencer la formation des DCP (Pehrson and Cohen 1992). La formation des 6-4PP ne présente pas la périodicité des DCP au niveau des nucléosomes (Smerdon 1991). Cependant, les 6-4PP sont formés 6 fois plus fréquemment dans l'ADN de liaison que dans le nucléosome.

Finalement, les protéines qui viennent se lier sur l'ADN ont un effet sur la formation des DCP et des 6-4PP suite à une exposition aux UV. Elles peuvent inhiber la formation de photoproduits en empêchant l'accès des UV. Elles peuvent également favoriser la formation des DCP et des 6-4PP en créant des zones de distorsion de la double-hélice d'ADN (Pfeifer, Drouin et al. 1992; Tornaletti and Pfeifer 1995).

1.3.4 Autres types de dommages induits par les UV

En plus des DCP et des 6-4PP, les UV entraînent la formation de mono-adduits qui représentent environ 1% du niveau des DCP. Par exemple, on retrouve les cytosines photohydrates qui peuvent persister très longtemps sur l'ADN. Éventuellement, ils peuvent se désaminer pour donner des hydrates d'uracile stables (O'Donnell, Boorstein et al. 1994). Il y a aussi les 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine qui se font sur les adénines suite à une irradiation à 310 nm (Doetsch, Zasatawny et al. 1995).

Les UV peuvent aussi indirectement induire des dommages à l'ADN. En effet, les UVB longs et les UVA ne sont que très faiblement, voire nullement, absorbés par l'ADN. Par contre, ils excitent des chromophores cellulaires qui, à leur tour, génèrent des espèces réactives d'oxygène ou « reactive oxygen species » (ROS) (Tyrrell and Keyse 1990; Rosen, Prahalad et al. 1996). Des exemples de ROS sont les singulets d'oxygène, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyle ($\cdot OH$). Un des effets principaux de ces ROS est l'oxydation des nucléotides. Cette oxydation peut se faire sur différents nucléotides et à différents endroits sur chaque nucléotide. La base oxydée la plus commune est la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG), mais on retrouve également la 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5-OHdC) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadenine (8-oxodA).

Ces types de dommages ne sont pas l'intérêt de cette thèse. De ce fait, on se concentrera donc principalement sur les DCP et les 6-4PP dans la suite de cet écrit.

1.4 Mécanismes de réparation des DCP et des 6-4PP

Les radiations UV sont l'agent génotoxique le plus abondant auquel les organismes vivants ont eu à faire face au cours de l'évolution. De plus, les DCP et les 6-4PP sont des dommages « encombrants » pour l'ADN. Ils empêchent les polymérases de faire leur travail et peuvent amener des mutations. Pour ces raisons, tous les organismes vivants ont dû s'adapter et trouver des moyens pour éliminer ces dommages. Les cellules ont développé trois principaux mécanismes pour réparer leurs photo-dommages : la photoréversion, la réparation par excision de bases (BER) et la réparation par excision de nucléotides (NER).

1.4.1 Photoréversion

La photoréversion à l'aide de photolyases est utilisée par plusieurs organismes pour réparer les dommages induits par les UV. Il existe des photolyases pour réparer les DCP et d'autres pour les 6-4PP (Todo, Takemori et al. 1993; Sancar 1994; Todo 1999; Sancar 2003). Les photolyases sont des protéines de 55-65 kDa liées de manière non covalente à 2 cofacteurs. Elles ont une affinité pour leur type de dommages respectif et n'utilisent aucun autre intermédiaire. Les photolyases nécessitent cependant des photons de longueurs d'ondes entre 350 et 450 nm pour compléter leur action. Le principe de la photolyase DCP de *E. coli* est illustré dans la **figure 6**. Toutes les photolyases semblent opérer de la même façon.

Brièvement, les étapes de la réparation des DCP par la photolyase sont les suivantes. Tout d'abord, la photolyase se lie au dommage et le fait « pénétrer » dans son site actif. La 5,10-MTHF absorbe alors un photon d'UVA et transfère l'énergie d'excitation au cofacteur catalytique FADH-. La FADH-, dans son état excité, transfère un électron au DCP, ce qui amène le clivage du double lien entre les pyrimidines. L'électron revient au radical flavine pour régénérer le FADH-. Le dommage réparé, la photolyase n'a plus d'affinité, elle se détache et peut aller réparer un autre DCP.

Les photolyases semblent avoir également un rôle autre que celui de la réparation des dommages induits par les UV car elles sont exprimées dans des tissus non exposés au soleil (testicules, cerveau, ...) (Pfeifer 1997).

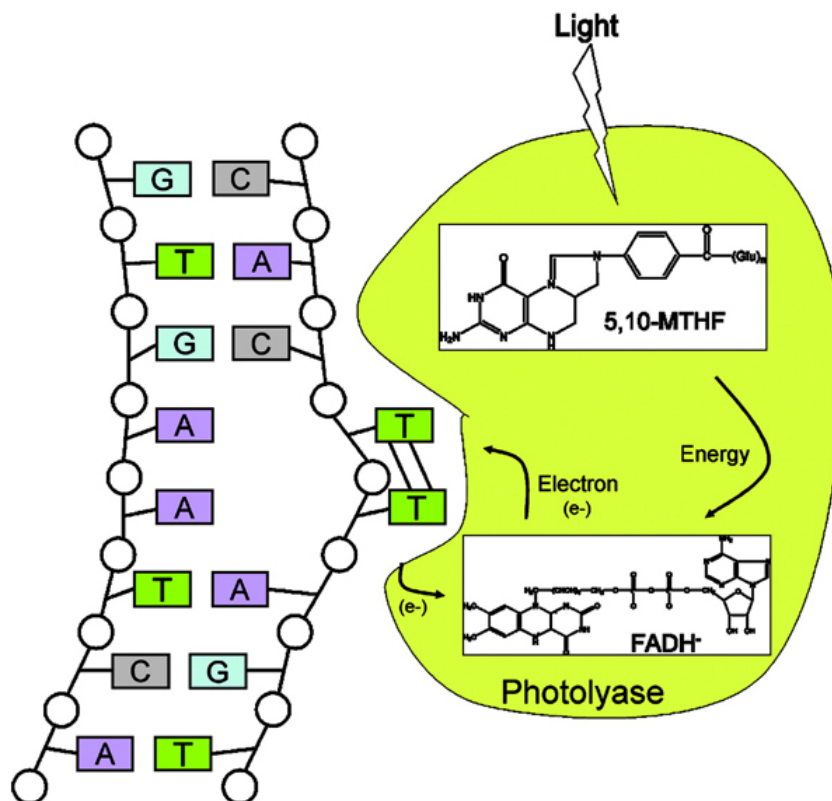


Figure 6 Représentation schématique de la réparation d'un DCP par la photolyase DCP de *E. coli*. (Tirée de Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004)

1.4.2 Réparation par excision de bases (BER)

Le système de BER est utilisé de façon extensive pour plusieurs types de dommages. Pour les dommages oxydatifs, c'est le système le plus commun. Cependant, pour les DCP, seule la T4 endonucléase V, qui est produite par un bactériophage, est connue. Pour les 6-4PP, c'est le néant. Aucune protéine de la BER semble être utilisée pour réparer les photo-dommages chez les eucaryotes.

Le système de BER est initié par une ADN glycosylase qui libère la base endommagée, formant ainsi un site AP. Ce site AP est ensuite réparé par une AP lyase, ou une AP endonucléase associée ou non à la ADN glycosylase. La T4 endonucléase V est une ADN glycosylase 5' couplée à une AP lyase qui reconnaît très spécifiquement les DCP. Elle provient d'un bactériophage et a une taille d'environ 18 kDa. Le principe de la T4 endonucléase V est illustré à la **figure 7**. Comme la T4 endonucléase V clive en 5' du DCP, elle crée une cassure monocaténaire avec une base en surplomb en 5' d'un des fragments générés. En effet, comme la T4 endonucléase V ne clive pas au niveau du double lien covalent qui unit le DCP, les deux pyrimidines restent liées ensemble, même après son passage. Le mécanisme par lequel la base en surplomb est enlevée en contexte cellulaire n'est pas clairement connu.

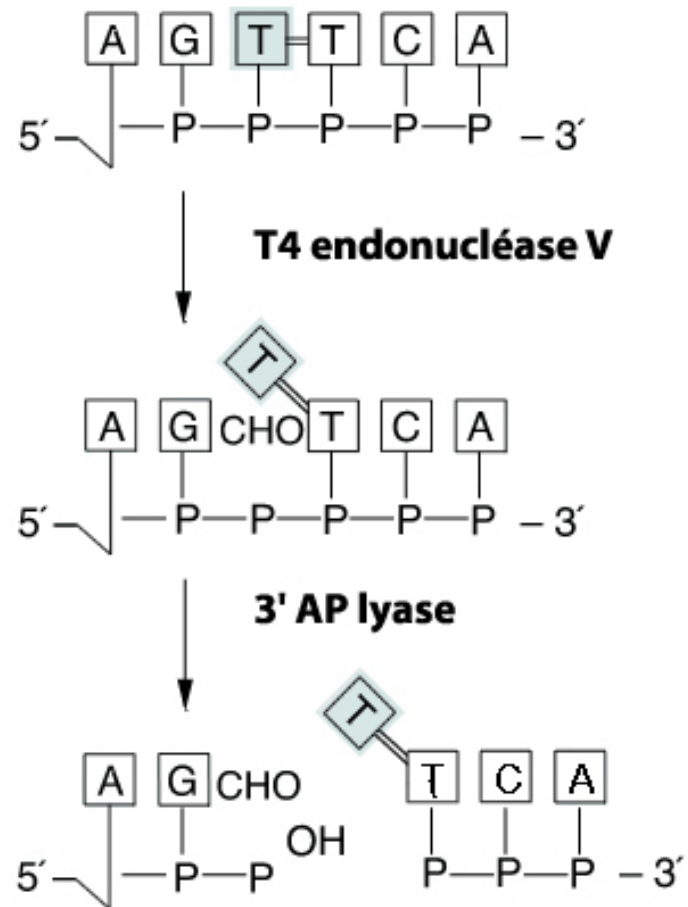


Figure 7 Représentation schématique du principe de réparation d'un DCP par la T4 endonucléase V comme modèle de réparation BER.

1.4.3 Réparation par excision de nucléotides (NER)

La NER est le système par excellence utilisé par la cellule pour réparer les dommages encombrants (« bulky adducts »). Ces dommages sont ceux qui amènent une conformation spécifique de la double hélice d'ADN (distorsion) et qui bloquent les ADN et/ou les ARN polymérase. Le système de NER n'est pas spécifique comme la BER ou la réversion directe, mais utilise un système « universel » et efficace pour réparer une multitude de dommages. Comme les cellules humaines ne contiennent pas de photolyases connues ou de protéines homologues à la T4 endonucléase V, elles utilisent la NER pour éliminer les DCP et les 6-4PP suite à une exposition aux UV.

1.4.3.1 Protéines impliquées dans la NER

Chez l'humain, 6 facteurs sont nécessaires pour reconstituer la NER *in vitro* : XPA, XPC, XPF-ERCC1, XPG, RPA et TFIIH (dans lequel XPD et XPB sont inclus) (Mu, Park et al. 1995; Mu, Hsu et al. 1996; Evans, Moggs et al. 1997). Cependant, plusieurs autres protéines font partie intégrante du système de NER, telles CSB, CSA ... De plus, certaines protéines comme p53 (Ford and Hanawalt 1995; Ford and Hanawalt 1997; Therrien, Drouin et al. 1999), p21 et Rb (Therrien, Drouin et al. 1999; Therrien, Loignon et al. 2001) ainsi que les protéines de réparation des mésappariements (Mellon and Champe 1996; Mellon, Rajpal et al. 1996) influencent l'efficacité de la NER. Chez les procaryotes, seulement 3 protéines (UVRA, UVRB et UVRC) servent à la NER. À ce jour, aucun autre rôle n'a pu leur être attribué. Chez les eucaryotes, l'histoire est un peu plus complexe. En effet, les protéines qui servent à la NER ont souvent des rôles dans d'autres fonctions cellulaires. Par exemple, RPA sert aussi à la réplication, TFIIH est un facteur de transcription et XPF-ERCC1 est reconnu pour avoir un rôle à jouer dans la recombinaison.

1.4.3.2 Étapes de la NER

La NER s'effectue en 3 principales étapes : la reconnaissance du dommage, l'incision de chaque côté de la lésion et le remplissage de la brèche générée. Ces trois étapes sont illustrées dans la **figure 8**.

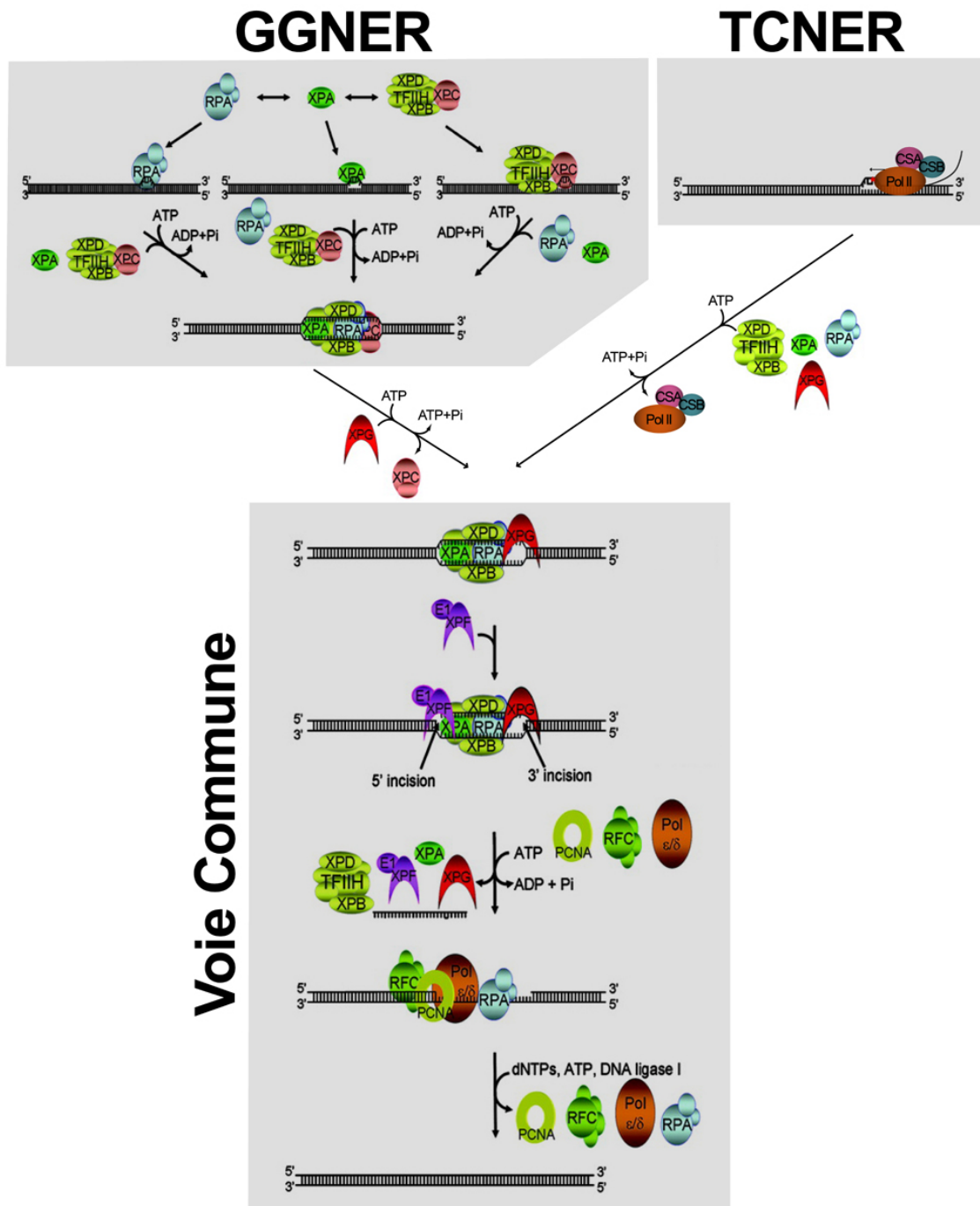


Figure 8 Représentation schématique de la voie de réparation des DCP par NER.

(Tirée de Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004 et modifiée)

1.4.3.2.1 La reconnaissance du dommage

La reconnaissance du dommage peut se faire par deux voies différentes, en fonction de la position du dommage dans le génome. La voie générale de reconnaissance du dommage est la voie de NER génomique globale (GGNER). Cette voie est initiée par une protéine (XPC, XPA et/ou RPA) qui lie l'ADN avec une plus grande affinité pour l'ADN endommagé dans lequel le dommage crée une distorsion. Dans la GGNER, les protéines RPA, XPA et XPC-TFIIH/XPB/XPD reconnaissent le dommage et s'y assemblent dans un ordre aléatoire. Par la suite, XPB et XPD, qui sont respectivement des hélicases 3'→5' et 5'→3', déroulent la double hélice d'environ 20 nucléotides autour de la lésion (Schaeffer, Roy et al. 1993; Roy, Schaeffer et al. 1994; Schaeffer, Moncollin et al. 1994). Dans cette voie d'initiation de la NER, les 6-4PP sont réparés beaucoup plus rapidement que les DCP (Mitchell and Nairn 1989; Mitchell, Brash et al. 1990). Cette réparation préférentielle peut être expliquée par le fait que les 6-4PP provoquent une distorsion beaucoup plus importante de la double hélice d'ADN que les DCP. Par le fait même, les 6-4PP sont théoriquement plus rapidement reconnus par les protéines d'initiation de la GGNER que les DCP.

La seconde voie d'initiation de la NER est la NER couplée à la transcription (TCNER) Elle est utilisée seulement pour les lésions situées sur le brin transcrit de gènes activement transcrits. Cette voie est valable seulement pour les lésions qui bloquent l'ARN polymérase II, comme le font les 6-4PP et les DCP. Lors de la transcription, l'ARN polymérase II est donc bloquée par un DCP ou un 6-4PP et ne peut pas continuer son travail. Les sous-unités CSA et CSB présentes sur l'ARN polymérase II recrutent alors les agents initiateurs de la NER, c'est-à-dire TFIIH/XPB/XPD. Le complexe ainsi formé déplace l'ARN polymérase II et ses sous-unités puis déroule la double hélice d'environ 20 nucléotides autour de la lésion. Contrairement à la GGNER, XPC n'est pas nécessaire à la TCNER (Venema, van Hoffen et al. 1991; van Hoffen, Venema et al. 1995). Dans un gène activement transcrit, la réparation des DCP se fait environ 2 à 5 fois plus rapidement sur le brin transcrit (TCNER) que sur le brin non-transcrit (GGNER) de gènes actifs (Bohr, Smith et al. 1985; Mellon, Spivak et al. 1987; Therrien, Drouin et al. 1999; Therrien, Loignon et al. 2001; Rochette, Bastien et al. 2002).

1.4.3.2.2 Incision de chaque côté de la lésion, remplissage de la brèche et liaison

XPG, qui a une grande affinité pour l'ADN déroulé, se lie à la jonction mono- et bicaténaire en 3' du dommage. Il libère XPC du complexe puis clive en 3' de la lésion. Par la suite, XPF-ERCC1 prend place en 5' de la lésion et clive à la jonction mono- et bicaténaire 5'. Le fragment contenant la lésion est alors libéré avec toutes les protéines qui y étaient liés, sauf RPA. RFC vient alors se lier en 3' de l'amorce d'ADN et facilite l'arrivée de PCNA. Le complexe RFC/PCNA sert de plate-forme pour les ADN polymérases ϵ et δ . Le OH- laissé en 3' par XPF est suffisant pour démarrer la polymérisation de l'ADN par les ADN polymérases ϵ et δ . Une fois la brèche remplie, l'ADN ligase I vient lier le tout. La réparation est alors complétée.

1.4.3.3 Maladies associées à une déficience de la NER

Trois maladies sont associées à une déficience dans le système de réparation NER : le xeroderma pigmentosum (XP), le Syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie (TTD). La plus connue est le XP de groupe A à G, correspondant en une déficience en l'un ou l'autre des groupes de complémentation XP. Les patients XP sont extrêmement sensibles à la lumière ultraviolette et ne peuvent pas s'exposer à la lumière solaire. Ils sont très prédisposés aux cancers de la peau et ont parfois des déficiences neurologiques (Cleaver 1968). Le CS est causé par une déficience en CSB ou en CSA. Les patients atteints du CS n'ont pas de prédisposition au cancer, mais ont des troubles de développement, incluant un retard mental et des anomalies neurologiques. Une élaboration plus complète des phénotypes de ces maladies sort du cadre de cette thèse. Mais pour plus de détails, ces maladies génétiques sont très bien décrites et expliquées dans la revue de Lehmann en 2003 (Lehmann 2003).

1.5 Les UV induisent des mutations

1.5.1 Mutations « signatures » des UV

Suite à une irradiation aux UVB ou aux UVC, 70% des mutations sont des transitions C→T et 10% sont des CC→TT (Miller 1983; Lebkowski, Clancy et al. 1985; McGregor, Chen et al. 1991). Les mutations en tandem CC→TT sont retrouvées presque exclusivement suite à une exposition aux UV, ce qui en fait la mutation « signature » des UV (Hutchinson 1994). Cependant, il est important de noter qu'à la suite de l'oxydation des cytosines, on peut retrouver également des transitions C→T et des doubles CC→TT (Purmal, Kow et al. 1994; Kreutzer and Essigmann 1998). Dans les dimères, les thymines semblent contribuer beaucoup moins à la mutagenèse solaire.

Comme il a été mentionné précédemment, les deux principaux types de dommages induits par les UV sont les DCP et les 6-4PP. Ce sont donc très probablement eux qui amènent la formation des mutations C→T et CC→TT. Ces deux lésions sont reconnues pour être mutagènes, mais une controverse semble persister quant à leur rôle respectif dans la mutagenèse solaire. En fait, certaines études prétendent que les DCP sont plus mutagènes (Protic-Sabljić, Tuteja et al. 1986; Armstrong and Kunz 1992; Carty, Hauser et al. 1993), alors que d'autres disent que les deux lésions contribuent également à la mutagenèse solaire (Brash, Seetharam et al. 1987; Bourre, Benoit et al. 1989; Parris and Kraemer 1993). Certains soutiennent même que les 6-4PP sont les plus en cause des mutations retrouvées suite à une exposition solaire (Zdzienicka, Venema et al. 1992). Cependant, certaines évidences semblent faire pencher la balance vers un rôle plus important des DCP dans la mutagenèse solaire. Une première évidence est le fait que les 6-4PP sont réparés plus rapidement que les DCP (Mitchell and Nairn 1989). De plus, les ADN polymérases et les ARN polymérases sont complètement bloquées par les 6-4PP alors que certaines passent parfois par dessus les DCP (Carty, Lawrence et al. 1996). Également, la fréquence de formation des DCP est 3 fois plus élevée que celle des 6-4PP. Basé sur ces arguments, les DCP semblent donc contribuer de façon plus importante à la mutagenèse solaire.

Cependant, comme peu de groupes de recherche ont étudié les 6-4PP par rapport aux DCP, il serait malhabile de tirer des conclusions définitives sur ces quelques évidences.

Les UVA, qui sont absorbés par l'ADN environ 10^5 fois moins que les UVC (Sutherland and Griffin 1981), sont reconnus pour indirectement causer l'oxydation des bases, amenant principalement la production de 8-oxoG (Kielbassa, Roza et al. 1997; Kvam and Tyrrell 1997; Zhang, Rosenstein et al. 1997; Douki, Perdiz et al. 1999). Les mutations qui résulteraient des 8-oxoG sont des transversions G→T. Ces mutations ne sont pratiquement pas retrouvées suite à une irradiation aux UVA (Drobetsky, Turcotte et al. 1995; Robert, Muel et al. 1996; Sage, Lamolet et al. 1996). Cependant, une quantité importante de transversions T→G est retrouvée suite à l'irradiation aux UVA de cellules de hamster (Drobetsky, Turcotte et al. 1995). Les mécanismes par lesquels les UVA peuvent amener la génération de transversions T→G sont encore inconnus.

1.5.2 Théorie de la mutagenèse somatique

La théorie de la mutagenèse somatique, élaborée par Thilly (Thilly 1983), reprise et améliorée par Holmquist et Gao (Holmquist and Gao 1997), tente de prédire la probabilité qu'un dommage généré par un agent mutagène amène une mutation. Elle est illustrée en **figure 9**. Bien entendu, cette probabilité est théorique et est très difficile, voire impossible, à chiffrer. Elle est dépendante de la fréquence de formation du dommage suite à l'agent mutagène, de la vitesse par laquelle la cellule répare le dommage et de la possibilité que ce dommage devienne une mutation suite à la réplication de l'ADN (potentiel mutagène). Une fréquence élevée de dommages à un nucléotide particulier, une vitesse de réparation lente et un potentiel mutagène élevé du dommage sont des conditions idéales pour la formation d'une mutation. Cette probabilité est aussi dépendante du fait que cette mutation doit être sélectionnée pour amener la tumorigénicité. En effet, seule une très faible portion de notre ADN génomique code pour des gènes et seulement une faible partie de ces gènes sont

importants dans le maintien de l'intégrité cellulaire. La mutation doit survenir au niveau d'un gène qui, lorsque muté, contribuera au développement néoplasique.

Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.3.3), la fréquence de formation des DCP et des 6-4PP dépend de la séquence en nucléotides de l'ADN, de la longueur d'onde d'irradiation, de la structure chromatinienne et de la présence de protéines liées à l'ADN. Il faut aussi tenir compte du fait que, suite à une irradiation aux UV, les DCP sont formés plus fréquemment que les 6-4PP.

La vitesse de réparation est aussi dépendante de plusieurs facteurs. Entre autres, on sait que plus la distorsion causée à l'ADN par le dommage est importante, plus la reconnaissance du dommage se fait rapidement et, par le fait même, plus la réparation est rapide (Travers 1989). La position du dommage dans le génome est aussi importante. En effet, les dommages situés sur le brin transcrit de gènes actifs sont réparés plus rapidement que ceux retrouvés dans le reste du génome. La structure chromatinienne semble également être un facteur influençant la réparation. En fait, la réparation par GGNER est plus lente dans le nucléosome que dans l'ADN de liaison (Wellinger and Thoma 1997). La TCNER ne semble pas influencée par la présence de nucléosomes (Wellinger and Thoma 1997). Dans des cellules XP^{-/-}, où la réparation GGNER s'effectue plus lentement, le nombre de doubles transitions CC→TT est beaucoup plus élevé, comparativement aux cellules normales en NER (Dumaz, Drougard et al. 1993).

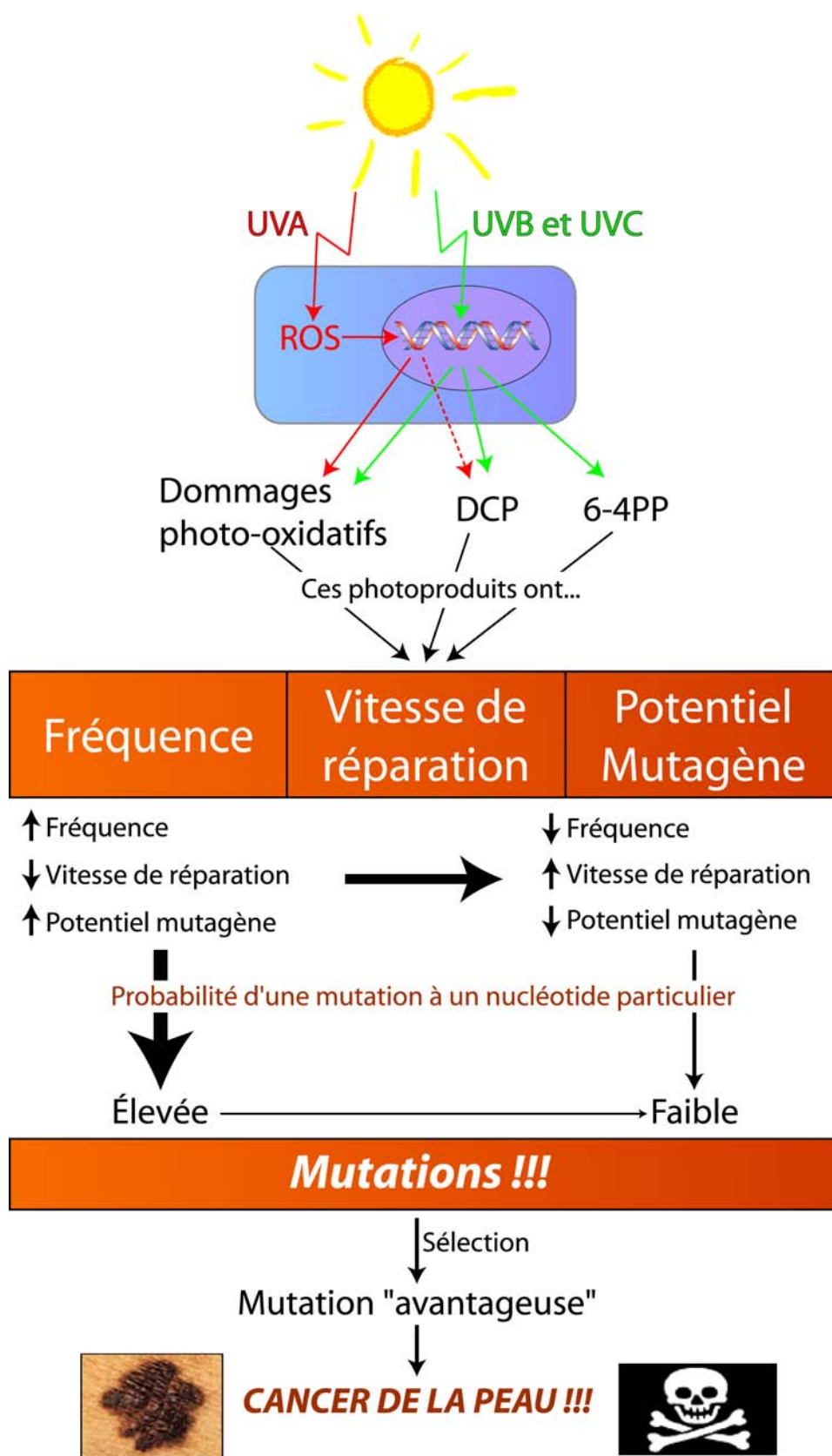


Figure 9 Représentation schématique de la théorie de la mutagenèse somatique.

Le potentiel mutagène est déterminé par la probabilité qu'une ADN polymérase interprète de façon erronée le dommage lors de la synthèse de l'ADN. Un dommage risque moins de causer des problèmes tant qu'il est réparé avant la réplication de l'ADN, qu'il est interprété correctement par les ADN polymérases ou qu'il les bloque complètement. Cependant, lorsque l'ADN polymérase passe au niveau d'un dommage avant que celui-ci ne soit réparé, ce dommage risque d'être mal interprété et une base aberrante peut être incorporée en face du dommage. La « loi A », élaborée par Tessman et al (Tessman, Liu et al. 1992), dit que l'ADN polymérase ϵ insère une adénine en face d'une lésion qui ne peut pas être interprétée. Dans le cas des dommages induits par les UV, ceci explique pourquoi les thymines dans les dimères ne sont pas mutagènes car, normalement, une adénine doit se trouver en face d'une thymine. Si une adénine est incorporée en face d'une cytosine dans un dimère de pyrimidines, il y aura incorporation d'une thymine face à cette adénine lors de la prochaine division de l'ADN. Cette théorie concorde parfaitement avec la formation des transitions C \rightarrow T et des CC \rightarrow TT majoritairement retrouvés suite à une exposition aux UV. La désamination (**Figure 10**) est aussi importante dans le potentiel mutagène des DCP. En fait, la désamination d'une cytosine dans un dimère forme une uracile et si la cytosine est méthylée, elle devient alors une thymine. Suite à cette désamination, l'ADN polymérase qui passe par-dessus le dommage incorpore très spécifiquement une adénine en face de la cytosine désaminée (Gibbs and Lawrence 1993; Jiang and Taylor 1993). La désamination prend de quelques heures à 120 heures (Barak, Cohen-Fix et al. 1995; Peng and Shaw 1996). Plus la cellule prend de temps à réparer, plus les probabilités de désamination des cytosines sont grandes. Chez les patients XP, c'est ce qui expliquerait le taux élevé de doubles transitions CC \rightarrow TT par rapport à ce qui est retrouvé normalement (Dumaz, Drougard et al. 1993).

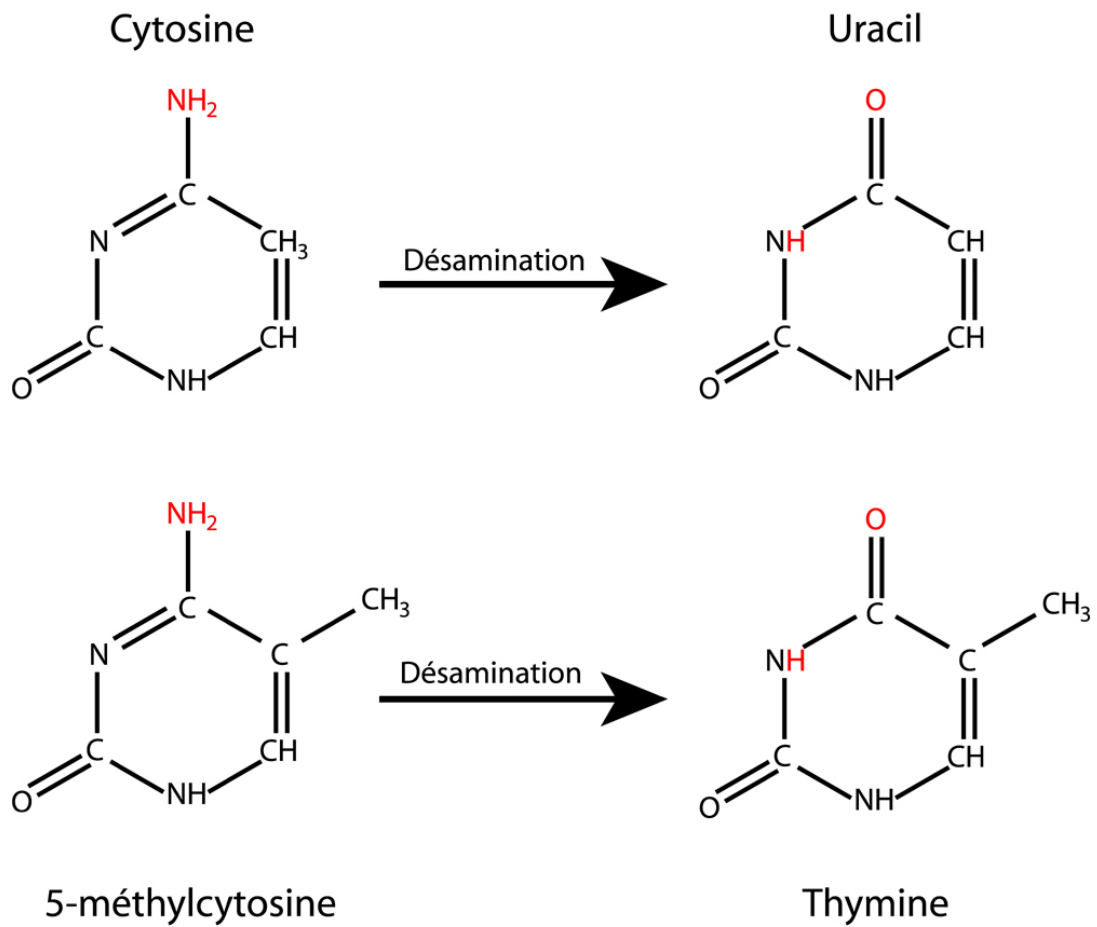


Figure 10 Représentation schématique de la désamination d'une cytosine et d'une 5-méthylcytosine.

1.6 p53 en réponse au stress des UV

En tant que « gardien du génome » et de gène suppresseur de tumeurs, p53 est très impliqué dans tous les systèmes de réponse aux stress cellulaires. Ces mécanismes sont : la réparation de l'ADN (voir section 1.4), l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Le gène *p53* est muté dans plus de 50% de tous les cancers humains. Plus de 90% des SCC diagnostiqués aux États-Unis d'Amérique ont des mutations dans le gène *p53* (Brash, Rudolph et al. 1991; Nataraj, Trent et al. 1995; Brash, Ziegler et al. 1996).

1.6.1 Point de contrôle (« Checkpoint ») G1/S (Figure 11)

Les cellules de la peau se divisent constamment pour régénérer celles perdues, entre autres par la desquamation, par l'usure et par la mort cellulaire. Suite à un stress cellulaire comme les UV du soleil, la cellule arrête de se diviser afin de restaurer son intégrité génomique. Quand la cellule prend un temps d'arrêt à différents stades de la division pour réparer et remettre la cellule en « état de marche », on parle de « checkpoint » ou point de contrôle du cycle cellulaire (Nyberg, Michelson et al. 2002). Il existe des points de contrôle entre toutes les étapes de la mitose. Cependant, je m'attarderai plus sur le point de contrôle à la jonction G1/S. C'est le mieux connu et, comme il survient juste avant la réplication de l'ADN, c'est celui qui nous intéresse le plus.

Le point de contrôle G1/S empêche la cellule d'entrer en phase S (synthèse d'ADN) en inhibant la réplication de l'ADN. Ce point d'arrêt entre la phase G1 et la phase S se nomme point de restriction. Chez les humains, il précède la synthèse de l'ADN d'environ 2 heures. Théoriquement, la cellule reste au point de restriction aussi longtemps que des dommages sont présents au niveau de l'ADN.

Premièrement, le dommage doit être détecté par des protéines qui activeront les effecteurs de l'arrêt G1/S. Suite à une exposition aux UV, les détecteurs de dommages sont RFC, le complexe 9-1-1 mais surtout ATR (Abraham 2001) qui est reconnu pour directement lier l'ADN endommagé par les UV (Unsal-Kacmaz, Makhov et al. 2002). Suite à la détection du dommage, ATR/RFC/9-1-1 phosphorylent Chk1 (Abraham 2001; Zhao and Piwnicka-Worms 2001) et p53 aux sérines/thréonines. Deux voies sont alors activées, une pour initier l'arrêt et l'autre pour maintenir l'arrêt au point de restriction (Bartek and Lukas 2001). L'initiation se fait rapidement par Chk1, qui phosphoryle à son tour la phosphatase Cdc25A. Cdc25A est alors ubiquitinylée et dégradée par protéolyse (Molinari, Mercurio et al. 2000; Falck, Mailand et al. 2001). Le manque de Cdc25A entraîne une accumulation de Cdk2 phosphorylé (donc inactif) qui est incapable de phosphoryler Cdc45 pour initier la réplication. Dans la voie de maintien, la phosphorylation de p53 à sa sérine 15 par ATR et à sa sérine 20 par Chk1 amène son activation et son accumulation en empêchant sa dégradation (Chehab, Malikzay et al. 1999; Kastan and Lim 2000; Ryan, Phillips et al. 2001; Zhang and Xiong 2001). p53 activé stimule alors la production de p21 qui, à son tour, lie Cdk2/CyclineE pour maintenir l'arrêt G1/S. La protéine p21 lie aussi Cdk4/CyclineD pour prévenir la phosphorylation de RB, ce qui l'empêche de se détacher de E2F pour aller activer la transcription (Siede, Friedberg et al. 1994; Paulovich and Hartwell 1995). Le stade de maintien devient actif seulement plusieurs heures après la détection du dommage (Bartek and Lukas 2001).

1.6.2 Apoptose

Lorsque la cellule est trop endommagée par les agents stressants, comme les UV, la cellule peut « décider » que la réparation est trop risquée et qu'il vaut mieux qu'elle se « suicide ». Ce suicide cellulaire est appelé apoptose. À ce niveau, p53 a également un rôle très important à jouer. Si la quantité de dommages est trop importante, p53 active l'apoptose en transactivant la transcription de *Bax*, *Fas/Apo1* ou en régulant à la baisse les gènes suppresseurs de l'apoptose comme *Bcl-2* (Mullauer, Gruber et al. 2001).

En plus de son implication dans la réparation de l'ADN, dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose, p53 inhibe l'angiogénèse via TSP1 et BAI1 pour empêcher le développement de la tumeur et son irrigation sanguine (Dameron, Volpert et al. 1994; Nishimori, Shiratsuchi et al. 1997).

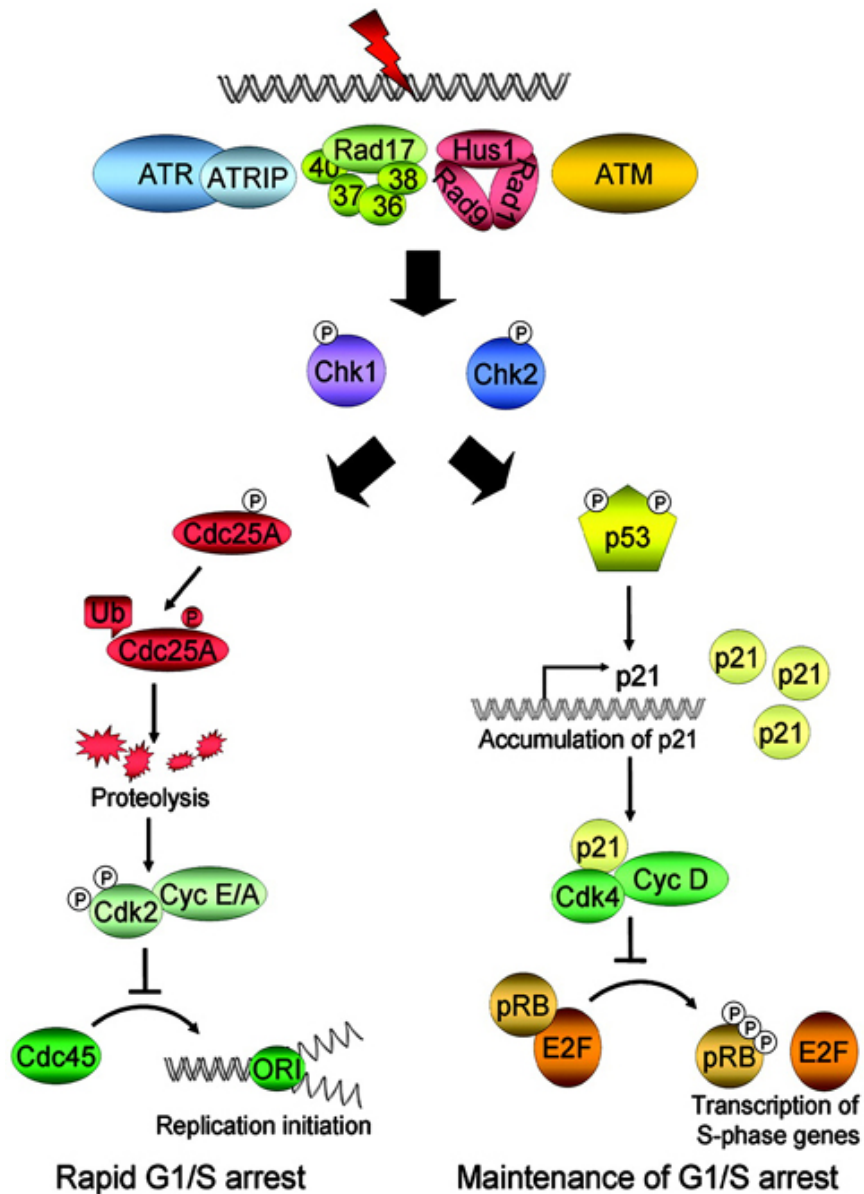


Figure 11 Représentation schématique de la voie d'induction de l'arrêt au point de contrôle G1/S. (Tirée de Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004)

1.6.3 La théorie du « Double Punch » solaire.

Selon la théorie du « double punch » solaire, une cellule cutanée nécessite au moins deux événements solaires pour pouvoir émerger et devenir un cancer de peau (Brash 1997). Après une première exposition solaire, des mutations peuvent être formées dans le génome. Si une de ces mutations se retrouve sur *p53*, le contrôle cellulaire devient aberrant. Il y a alors une absence d'arrêt du cycle cellulaire, absence d'apoptose et il y a un ralentissement de la réparation de l'ADN. La cellule déficiente en *p53* ne meurt pas après une irradiation et les dommages persistent sur l'ADN. Cette cellule ne peut cependant pas se développer si les cellules autour d'elle restent présentes. Il faut, physiquement, de la place pour l'expansion clonale de la tumeur. C'est ce que la seconde exposition au soleil procure. La cellule déficiente en *p53* (précancéreuse) survit à une forte exposition au soleil. Cependant, les cellules qui l'entourent risquent de mourir par apoptose, ce qui libère la place nécessaire pour l'expansion clonale de la cellule précancéreuse. Le cancer de la peau naît!

1.7 Technologie de la Ligation-Mediated PCR (Figure 12)

En 1984, Church et Gilbert ont introduit une technique de séquençage génomique qui ne nécessitait pas de clonage (Church and Gilbert 1984). Suite à un clivage chimique de chaque type de bases spécifiquement par la technique décrite par Maxam et Gilbert (Maxam and Gilbert 1980) et à un marquage radioactif des fragments générés, il devient possible de faire le séquençage spécifique d'une séquence d'ADN génomique précise. Cette technique est très difficile à mettre en œuvre et nécessite une quantité importante d'ADN (20-30 µg d'ADN par type de bases). Par la suite, la notion d'amplification à l'aide d'une ADN polymérase fut ajoutée à la technique initiale pour donner la « ligation-mediated PCR » (LMPCR) (Mueller and Wold 1989; Pfeifer, Steigerwald et al. 1989). La technique LMPCR a été développée pour le séquençage génomique (Pfeifer, Steigerwald et al. 1989), la détection d'empreintes génomiques (« footprint ») *in vivo* (Mueller and Wold 1989) et la détermination des profils de méthylation (Pfeifer, Steigerwald et al. 1989) en utilisant seulement 1 µg d'ADN de départ. Plus précisément, la technique LMPCR permet la cartographie des cassures monocaténaire avec un phosphate en 5' à l'ADN. De ce fait, tout

ce qui peut être converti en cassures monocaténaire peut virtuellement être cartographié par la technique LMPCR. Selon ce principe, la technique LMPCR fut également développée pour l'étude de la cartographie et de la réparation des dommages induits par les UV, tels les DCP (Pfeifer, Drouin et al. 1992), les 6-4PP (Pfeifer, Drouin et al. 1991) et les dommages photo-oxydatifs (Drouin and Holmquist 1994).

Le principe de la technologie LMPCR est illustrée en **Figure 12**. La première étape consiste à convertir la lésion en cassure monocaténaire ayant un phosphate en 5'. Cette étape est cruciale car seules les cassures avec un phosphate à l'extrémité 5' peuvent être cartographiées. Dans le cas des DCP, ils sont clivés très spécifiquement par la T4 endonucléase V (voir section 1.4.2). Comme la T4 endonucléase V ne clive que le lien glycosylique qui lie le DCP au squelette de phosphate de l'ADN, les deux bases pyrimidiniques restent liées et une base reste en surplomb. Cette base empêche la liaison de l'adaptateur et doit être enlevée par photoréversion (voir 1.4.1) à l'aide de la photolyase à DCP. Par la suite, l'ADN est dénaturé et une amorce spécifique de gène et de brin est hybridée. Ceci amène le premier niveau de spécificité de la technique. Une extension de cette amorce permet de générer des bouts francs sur lesquels il est possible de venir lier l'adaptateur. L'adaptateur est asymétrique afin d'empêcher une liaison dans le mauvais sens et la formation de concatémaire. Il résulte de la liaison de l'adaptateur à chacun des bouts francs des fragments d'ADN dont les deux extrémités sont connues. Ce qui permet par la suite de faire une amplification PCR standard avec une amorce spécifique à l'adaptateur et une seconde amorce spécifique du gène et du brin. Cette seconde amorce est légèrement en amont de la première afin d'amener un deuxième niveau de spécificité de la technique LMPCR. L'amplification par PCR produit des fragments amplifiés de longueurs variables qui correspondent aux sites de dommages clivés. Ces fragments sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide 8% et transférés sur une membrane de nylon par électrotransfert. Une sonde marquée au ^{32}P spécifique au brin étudié est ensuite hybridée sur la membrane. La membrane marquée peut être révélée par autoradiographie ou par une plaque « phosphorimager ».

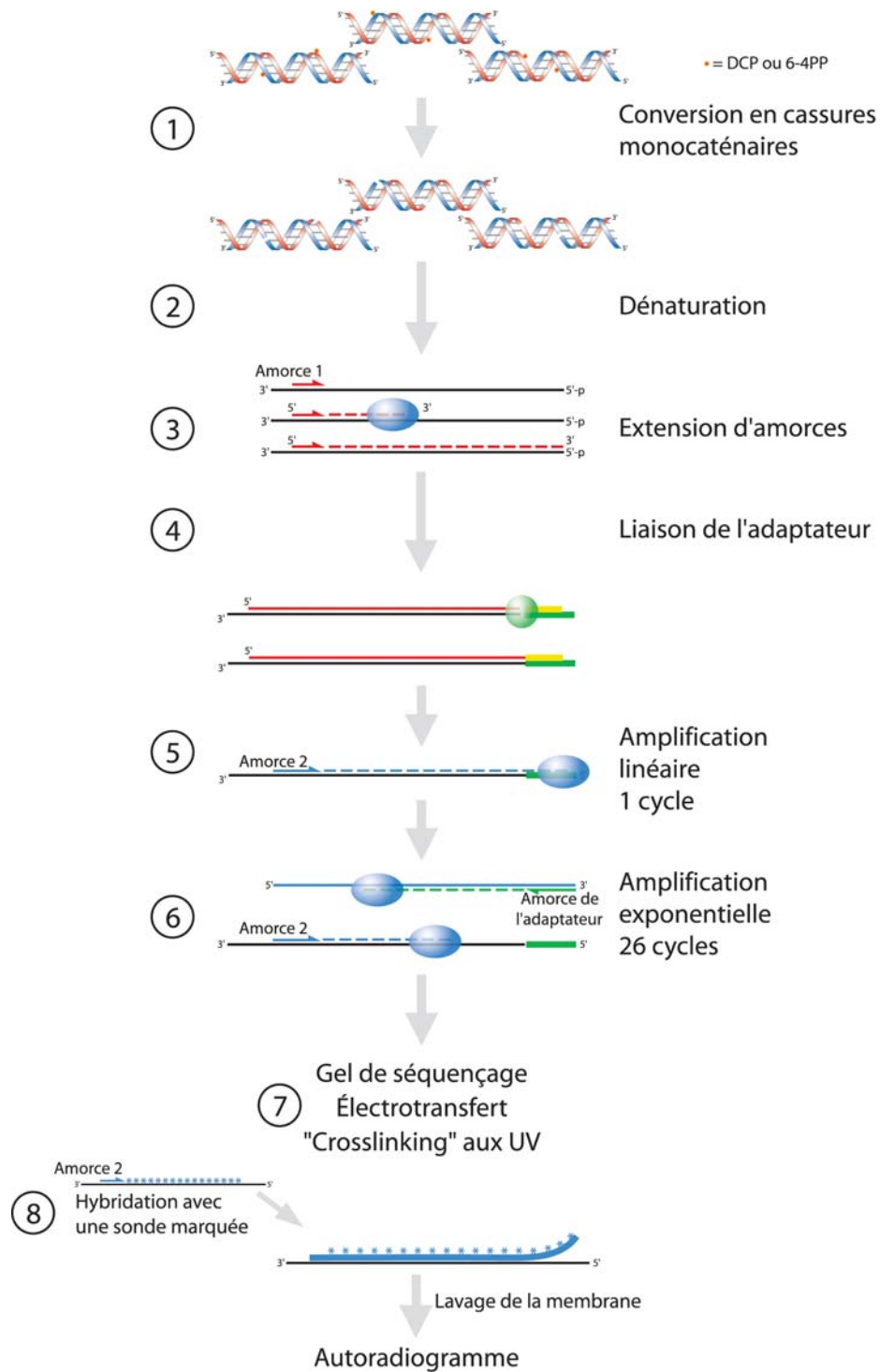


Figure 12 Représentation schématique des différentes étapes de la technique LMPCR

1.8 Contexte et objectifs de recherche

1.8.1 Chapitre 2 : Les UVA comme agent mutagène

Ce sont principalement les UVB qui induisent l'érythème (coups de soleil). En avant-guerre, les gens associaient les brûlures avec les dommages. Les UVB étaient alors considérés comme les seuls nocifs. Les crèmes solaires bloquant les UVB ont ainsi été développées. Grâce à ces crèmes solaires, les gens se sentaient protégés et pouvaient alors passer plusieurs heures au soleil sans voir l'apparition de coup de soleil. Plus tard, les UVB, étant considérés trop nocifs, ont été bannis des salons de bronzage pour être remplacés par les UVA. Les lampes de bronzages, fort populaires, émettaient alors 99,9% d'UVA pour 0,1% d'UVB (Urbach 1993; Gasparro 2000). De ce fait, pendant des décennies, les gens se sont exposés à des doses suraiguës d'UVA.

Tel que présenté dans la section 1.5.1, il est connu que les UVA causent indirectement l'oxydation des guanines, générant des 8-oxoG (Kielbassa, Roza et al. 1997; Kvam and Tyrrell 1997; Zhang, Rosenstein et al. 1997; Douki, Perdiz et al. 1999). Théoriquement, les mutations qui résultent des 8-oxoG sont des transversions G→T. Cependant, ces mutations ne sont pas retrouvées lors d'irradiations de cellules aux UVA (Drobetsky, Turcotte et al. 1995; Robert, Muel et al. 1996; Sage, Lamolet et al. 1996). Ce sont plutôt des transversions T→G qui sont recensées (Drobetsky, Turcotte et al. 1995). Récemment, certaines équipes ont aussi démontré que les UVA amènent la formation de DCP (Douki, Perdiz et al. 1999; Perdiz, Grof et al. 2000). Selon eux, les UVA produisent 3 fois plus de DCP que de 8-oxoG. Mais est-ce que ce sont les DCP induits qui peuvent expliquer les transversions T→G retrouvées suite à une irradiation aux UVA? Comme il a été expliqué dans la section 1.5.1, les mutations signatures des DCP sont des transitions C→T et des doubles transitions CC→TT, non pas des T→G.

Dans le chapitre 2, les objectifs poursuivis sont : 1) De cartographier, grâce à la technique LMPCR, les DCP sur l'exon 2 du gène *aprt* suite à l'irradiation de cellules CHO (hamster) avec des UVA, UVB, UVC ou de la lumière solaire simulée (SSL). 2) De comparer la fréquence des DCP avec le spectre de mutations déjà publié (Drobetsky, Turcotte et al. 1995) de la même région suite aux irradiations aux différentes longueurs d'ondes.

1.8.2 Chapitre 3 : Influence des protéines de la réparation des mésappariements (MMR) dans la NER

Comme nous l'avons vu dans la section 1.4.3.1, différentes protéines peuvent influencer l'efficacité de la NER. Plus précisément, Mellon et al ont montré que les protéines qui servent à réparer les bases mal appariées (MMR) influencent la réparation NER (Mellon and Champe 1996; Mellon, Rajpal et al. 1996). En fait, lorsque les protéines hMLH1 et hMSH2 sont déficientes, la TCNER s'en trouve ralentie (Mellon, Rajpal et al. 1996). Leadon et Avrutskaya avaient confirmé ces résultats en 1997 (Leadon and Avrutskaya 1997). Cependant, ce dernier papier a été retiré, à la demande des auteurs, pour cause de non-reproductibilité des résultats (Leadon and Avrutskaya 2003).

Therrien et al ont étudié la réparation des DCP dans les cellules DLD-1 dans le but de comprendre l'influence de p53 et de p21 sur la NER (Therrien, Loignon et al. 2001). Ces cellules sont déficientes en hMSH6, une protéine de la MMR, mais ont une réparation des DCP normale tant sur le brin transcrit (TCNER) que sur le brin non-transcrit (GGNER). Comment expliquer cette contradiction avec les résultats obtenus par l'équipe du Dr Mellon?

Dans le chapitre 3, les objectifs poursuivis sont : 1) D'étudier la réparation des DCP, par la technique LMPCR, sur les brins transcrits (TCNER) et non-transcrits (GGNER) de gènes actifs suite à une irradiation aux UVB ou aux UVC, en utilisant les mêmes lignées cellulaires d'adénocarcinome colorectal que celles utilisées par Mellon et al (Mellon, Rajpal et al. 1996), 2) De confirmer la déficience ou la compétence en MMR des cellules utilisées en mesurant la survie clonogéniques suite à l'administration de 6-thioguanine, 3) De vérifier la sensibilité aux UVB et aux UVC de ces cellules à l'aide de tests de survie clonogénique, 4) De comparer la vitesse de reprise de la transcription suite à l'irradiation aux UVB des cellules grâce à la technique « mRNA recovery assay ».

1.8.3 Chapitre 4 : Les cellules SW480 : Caractérisation cytogénétique et statut de *p53*

Dans le projet du chapitre 3, nous avons utilisé trois lignées d'adénocarcinome colorectal: deux déficientes en un gène de la MMR (LoVo et HCT116) et une contrôlée compétente en MMR (SW480). Toutes les lignées utilisées dans ce précédent projet n'ont montré aucun ralentissement de la NER, tant sur le brin transcrit (TCNER) que sur le brin non-transcrit (GGNER) de gènes actifs.

Les cellules SW480 sont disponibles commercialement et très utilisées en recherche. Elles sont connues pour présenter deux mutations (codon 273 et 309) au niveau du gène *p53*. Cependant, la distribution de ces mutations dans les allèles de *p53* n'est pas documentée. Habituellement, les mutations dans *p53* ont un effet dominant négatif (Baker, Fearon et al. 1989; Chen, Chen et al. 1990; Milner and Medcalf 1991; Kern, Pietenpol et al. 1992; Srivastava, Wang et al. 1993; Hann and Lane 1995; Dridi, Fetni et al. 2003). Donc, théoriquement, le gène *p53* muté dans les SW480 code pour une protéine non-fonctionnelle.

Comme il a été brièvement abordé dans la section 1.4.3.1, selon plusieurs évidences p53 influence positivement la NER (Ford and Hanawalt 1995; Ford and Hanawalt 1997; Therrien, Drouin et al. 1999). Plus précisément, Ford et Hanawalt ont montré qu'un p53 déficient entraîne un ralentissement de la GGNER, mais pas de la TCNER des DCP (Ford and Hanawalt 1995; Ford and Hanawalt 1997). De son côté, Therrien et al ont montré que la déficience en p53 amène une TCNER et une GGNER des DCP plus lente (Therrien, Drouin et al. 1999). Quoiqu'il en soit, il est incontestable que p53 a un rôle à jouer, à tout le moins dans la GGNER. Donc, comment peut-on concevoir que les SW480, qui sont déficientes en p53, peuvent être normales en NER (TCNER et GGNER)? Le but du chapitre 4 est d'éclaircir cette contradiction et de mieux comprendre la lignée SW480 tant utilisée, mais encore mal caractérisée.

Dans le chapitre 4, les objectifs poursuivis sont de : 1) définir le caryotype des SW480 et le comparer avec les caryotypes publiés précédemment, 2) vérifier l'intégrité du bras court du chromosome 17, où *p53* se situe, 3) confirmer les mutations R273H et P309S dans *p53* et de trouver leur distribution dans les allèles de ce gène, 4) évaluer la quantité de protéine p53 produite par les SW480 et sa distribution dans la cellule, 5) vérifier si la protéine p53 mutée peut induire la production d'un de ses gènes effecteurs suite à un stress comme les UV ou les radiations ionisantes, 6) faire une analyse *in vivo* de la séquence consensus de liaison de la protéine p53 sur le promoteur du gène effecteur *p21*, 7) vérifier si la protéine p53 mutée dans les SW480 peut lier sa séquence consensus *in vitro*.

Chapitre 2 : UVA-Induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells.

(Nucleic Acids Res. 2003 Jun 1;31(11):2786-94)

2.1 Résumé en français

Suite à l'irradiation de cellules d'ovaires de hamsters Chinois (CHO) avec des UVA (340-400 nm), des UVB (295-320 nm), des UVC (254 nm), ou de la lumière solaire simulée (SSL; $\lambda > 295$ nm), la fréquence de formation des dimères cyclobutyliques de pyrimidines a été mesurée à la résolution du nucléotide près grâce à la technique « Ligation-mediated PCR ». Le spectre de dommage résultant de chacune des longueurs d'ondes utilisées a été aligné avec le spectre de mutations correspondant généré avec les mêmes longueurs d'ondes. La distribution des CPD était similaire suite à une irradiation aux UVC, aux UVB ou à la SSL. Plus précisément, la proportion relative des photoproduits formés était approximativement de 28% sur les TT, 26% sur les TC, 16% sur les CT et 30% sur les CC aux trois types de rayonnement. De plus, une corrélation évidente a pu être établie entre les points chauds de formation de CPD et les points chauds de mutations de transitions C→T et double transitions CC→TT, les mutations signatures des UV. Cependant, l'irradiation des CHO aux UVA a donné une fréquence de CPD très différente des autres longueurs d'ondes. En fait, les dipyrimidines TT étaient, de loin, les plus touchés (57%) en comparaison avec les TC (18%), les CT (11%) et les CC (14%) suite à une irradiation aux UVA. Cette distribution des CPD corrèle bien avec la très forte proportion de mutations retrouvées sur les dipyrimidines TT suite à l'irradiation des CHO aux UVA. Nos résultats montrent que les CPD sont les photo-lésions prémutagéniques majeures induites par les UVA dans les cellules de rongeur.

2.2 Article

UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells

Patrick J. Rochette¹, Jean-Philippe Therrien^{1,2}, Régen Drouin¹, Daniel Perdiz³, Nathalie Bastien¹, Elliot A. Drobetsky² and Evelyne Sage^{3,*}

¹ Division of Pathology, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Laval University and Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire, Research Center, Hôpital Saint-François d'Assise, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, QC G1L 3L5, Canada;

² Faculty of Medicine, University of Montreal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, QC H1T 2M4, Canada;

³ CNRS UMR 2027, Institut Curie, Bât. 110, Centre Universitaire, F-91405 Orsay, France

Keywords : cyclobutane pyrimidine dimer; UVA mutagenesis; ligation-mediated PCR; mutation spectrum, solar UV radiation.

* corresponding author : Evelyne Sage,
Institut Curie, Bât. 110,
Centre Universitaire,
F-91405 Orsay Cedex, France
Tel.: +33 1 69 86 71 87;
Fax: +33 1 69 86 94 29;
E-mail : Evelyne.Sage@curie.u-psud.fr

2.2.1 Résumé (anglais)

Ligation-mediated PCR was employed to quantify cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) formation at nucleotide resolution along exon 2 of the *adenine phosphoribosyltransferase (aprt)* locus in Chinese hamster ovary (CHO) cells following irradiation with either UVA (340-400 nm), UVB (295-320 nm), UVC (254 nm), or simulated sunlight (SSL; $\lambda >295$ nm). The resulting DNA damage spectrum for each wavelength region was then aligned with the corresponding mutational spectrum generated previously in the same genetic target. The DNA sequence specificities of CPD formation induced by UVC, UVB, or SSL were very similar, *i.e.*, in each case the overall relative proportion of this photoproduct forming at TT, TC, CT, and CC sites was approximately ~28, ~26, ~16 and ~30%, respectively. Furthermore, a clear correspondence was noted between the precise locations of CPD damage hotspots, and of “UV signature” mutational hotspots consisting primarily of C→T and CC→TT transitions within pyrimidine runs. However, following UVA exposure, in strong contrast to the above situation for UVC, UVB, or SSL, CPDs were generated much more frequently at TT sites than at TC, CT, and CC (57% versus 18, 11 and 14%, respectively). This CPD deposition pattern correlates well with the strikingly high proportion of mutations recovered opposite TT dipyrimidines in UVA-irradiated CHO cells. Our results directly implicate the CPD as a major promutagenic DNA photoproduct induced specifically by UVA in rodent cells.

2.2.2 Introduction

Exposure to sunlight is the major determinant in the multistage development of melanoma and non-melanoma forms of skin cancer (1,2). This can be largely attributed to the induction of highly genotoxic dipyrimidine photoproducts, namely *cis-syn* cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs), which are formed via direct absorption of solar UV photons by DNA. Indeed, sequencing studies have clearly shown that collections of mutated p53 tumor suppressor genes isolated from human and murine skin tumors consistently bear the hallmark “signature” of causation by dipyrimidine photoproducts, i.e., a striking predominance of C→T transitions at dipyrimidine target sites including some tandem CC→TT events, and an accompanying paucity of mutations at A:T base pairs (3,4). In addition, different lines of evidence strongly support a preeminent role specifically for the CPD, which, relative to the 6-4PP, forms in substantially higher yield after sunlight exposure and is repaired much more slowly (5,6). Nonetheless, at least some genotoxic contribution by the 6-4PP (and/or by its Dewar valence photoisomer) should not be ruled out (7).

Long-wavelength UVB (295-320 nm) and UVA (320-400 nm) constitute ~0.3 and ~5.1% of the terrestrial solar spectrum, respectively. UVC (190-280 nm) and short-wavelength UVB (280-295 nm) are virtually completely blocked by the atmosphere and therefore not biologically relevant. The widely employed model mutagen 254-nm UV (hereafter called UVC), being very close to the absorption maximum of DNA ($\lambda=260$ nm), is the most proficient UV wavelength in the generation of dipyrimidine photoproducts. CPDs and 6-4PPs can also be readily formed through direct absorption of UVB photons by DNA, although (in line with the relative DNA absorption potential of UVB) at a yield ~20-100-fold lower than UVC (8,9). UVA is absorbed orders of magnitude (10^5 -fold) more weakly by DNA compared with UVC (10), and is therefore proportionately far less effective in the induction of dipyrimidine photoproducts (see below). Nonetheless, purified UVA has been shown to exhibit significant mutagenic and carcinogenic potential at physiological fluencies (11-14). This is of major concern since levels of human exposure to

UVA have increased significantly in recent decades due to (i) the (previous) widespread use of UVB-specific sunscreens, allowing greatly increased periods of recreational sun tanning by blocking UVB-induced erythema, but without providing UVA protection, and, (ii) the current popularity of high-intensity UVA tanning sources, emitting up to 99.9% and 0.1% of energy in the UVA and UVB ranges respectively (15,16).

Since UVA is so weakly absorbed by DNA, its mutagenic effect has generally not been attributed to dipyrimidine photoproducts, but rather to excitation of non-DNA chromophores leading to the production of reactive oxygen species which, in turn, attack the double helix to yield oxidized bases and DNA strand breaks (11,17,18). In particular, purified UVA induces photooxidation products of guanine, most notably the highly mutagenic adduct 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), through generation of singlet oxygen or via a type I photosensitization reaction (19-22). It should be mentioned that exposure to UVB or broad-spectrum sunlight (but not to UVC) also significantly alters the cellular redox state (23) and induces some 8-oxoGua (22). In a highly characteristic manner, 8-oxoGua would be expected to cause G→T signature mutations; however, such mutations have been only rarely recovered either at target loci in cultured mammalian cells irradiated with either UVB or UVA (13,24,25), or among mutated p53 tumor suppressor genes derived from sunlight-associated skin tumors (26). This latter revelation, together with studies (cited above) demonstrating the powerful promutagenic potential of CPDs in living cells, indicate a minor role at best for oxidative DNA damage in solar mutagenesis. In summary, compared with the well-characterized situation for cells irradiated with UVC, UVB, or broad-spectrum natural sunlight, i.e., where CPDs clearly underlie the vast majority of genetic alterations, the primary promutagenic lesion(s) induced by purified UVA at present remain unclear.

Nonetheless, a number of recent studies have provided new insight into the mechanism of UVA mutagenesis. In particular, the global genomic distributions of various classes of DNA photoproducts were investigated in Chinese hamster ovary (CHO) cells

exposed to different rigorously filtered sources emitting UVC, UVB, UVA, or broad-spectrum simulated sunlight (SSL). CPDs were by far the major photolesion produced by all types of radiation, including by UVA which was shown to generate levels of CPDs at a yield 10^5 -fold lower than UVC (9,22,27), consistent with a mechanism of UVA-induced CPD formation based on direct absorption of UVA photons by DNA (10). In addition, it was shown that the 6-4PP and its Dewar valence photoisomers were readily produced by UVB and SSL, although no such 6-4PP derivatives could be detected following UVA treatment (9). Also, the yield of CPDs was reported to be ~3-folds higher than that of 8-oxoGua upon UVA exposure (22). Finally, using a sensitive genomic sequencing method (ligation-mediated PCR; see below), under conditions where extremely high levels of CPDs were induced, it was unexpectedly revealed that both 6-4PPs and oxidized DNA bases are virtually undetectable in SSL-exposed cultured cells (28). Taken together, these data demonstrate significant variations in DNA damage distribution depending on incident wavelength and indicate, at least on quantitative grounds, that CPDs might constitute an important promutagenic lesion induced by purified UVA.

Despite the studies described immediately above which probed global genomic photoproduct distribution in CHO cells exposed to various components of the solar UV wavelength spectrum, no studies to date have coordinately examined the precise nature of genetic damage induced specifically by UVA in living cells and its relationship to UVA mutagenesis at the DNA sequence level. We therefore employed the ligation-mediated PCR (LMPCR) to compare the frequency of CPD formation at nucleotide resolution along the transcribed strand (TS) and non-transcribed strand (NTS) of exon 2 of the *adenine phosphoribosyltransferase (aprt)* locus in CHO cells irradiated with rigorously-filtered sources emitting either UVA (340-400 nm), UVB (295-320 nm), UVC (254 nm), or broad-spectrum simulated SSL ($\lambda > 295$ nm). For each wavelength region, the resulting spectrum of CPD damage was compared to the corresponding mutational spectrum generated previously in the same genetic target (13). Our results shed new light on the mechanism of UVA mutagenesis in a mammalian chromosomal gene.

2.2.3 Matériel et Méthodes

Cells lines, irradiation conditions and digestion of genomic DNA

CHO cells (strain UVL-9) were grown to 80-90% confluence in 60-mm petri dishes and irradiated on ice in PBS buffer with 254-nm UVC, UVB (295-320 nm), or SSL ($\lambda > 295$ nm) using, respectively, a 254-nm germicidal UVC lamp (G25T8 germicidal lamp, Sankyo Denki, Japan), a fluorescent polychromatic UVB lamp (a series of six 15W tubes, Vilber Lourmat, France), or a 2500 W xenon arc lamp (XBO, OSRAM, Rosny-sous-Bois, France) (9,13). For UVA irradiation, a 5000 W Mutzhas SUPERSUN lamp (Münich, Germany) emitting virtually exclusively in the UVA1 range (340-440 nm) was utilized. The spectral outputs of these lamps, and properties of the UV wavelength-cutoff filters (Schott, Mainz, Germany) employed to remove contaminating wavelengths (necessary only in the case of UVB and SSL), have been previously characterized (29) (Results and Discussion). Following treatment of living cells with each of the four light sources, genomic DNA was immediately extracted, quantified and digested with T4 endonuclease V (kindly provided by Dr Stephen Lloyd, The University of Texas Medical Branch, Galveston, USA) to incise the DNA very efficiently and with high specificity at CPD sites. This treatment produces 5'-pyrimidine overhangs precisely at the termini of incised strands, which were then removed by photoreactivation using *Escherichia coli* CPD photolyase (kindly provided by Dr Tim O'Connor, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, USA) in order to generate 5' ligatable ends (30). Prior to using this T4 endonuclease V/photolyase-digested genomic DNA for DNA sequence level analysis via LMPCR (see immediately below), aliquots were run on an alkaline agarose gel to estimate the global CPD frequency induced by each type of UV treatment (31,32).

LMPCR analysis

The LMPCR technique for analysis of CPD distribution at nucleotide resolution in UV-irradiated cells has been described previously in detail (32). Briefly, following denaturation of the T4 endonuclease V/photolyase-digested DNA, an *aprt*-specific oligonucleotide was annealed downstream of the region to be analyzed, and a set of

genomic cleavage products (terminating precisely at sites where T4 endonuclease V incised the DNA adjacent to CPDs) was generated via primer extension with cloned *Pfu* polymerase (Stratagene, Cedar Creek TX, USA). An asymmetric double-stranded oligonucleotide linker was ligated to the phosphate groups at the fragment termini, thus providing a common sequence on the 5' end of all fragments. The longer oligonucleotide primer of the linker, in conjunction with another *aprt*-specific primer, was then used in a PCR reaction to amplify the gene-specific cleavage products of interest. These products were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels alongside a Maxam-Gilbert sequencing ladder, transferred to nylon membranes, hybridized to a ^{32}P -labeled gene-specific probe and visualized by autoradiography.

Each band on an autoradiogram represents a nucleotide position where a CPD cleavage had occurred, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with a cleaved CPD at that position. All bands corresponding to CPDs at dipyrimidine sites, and yielding a measurable signal above background, were quantified using a Fuji BAS 1000 phosphorimager (Fuji Medical system, Stanford, USA) as described immediately below. Each sample was assayed in duplicate. A screening sequencing gel was initially run to ensure that there was no significant variation in band intensity between samples. The duplicates were then pooled and a “combined” gel was run. Each irradiation experiment was performed in triplicate in two different laboratories using similar light sources and filters. Two series of LMPCR protocols for each primer set have been applied to each DNA sample issued from the various irradiation experiments. The band patterns as well as the quantifications of cleavage products in gels did not differ significantly between individual experiments or manipulators.

To analyze CPD distribution on the NTS of *aprt* exon 2 (spanning positions +199 to +287), the following primers were used: primer arp394 (for primer extension), 5'-TATGTCACCCTCAGTCCATC-3' ($T_m = 56.3^\circ\text{C}$); primer arp377 (for PCR amplification), 5'-GCAGGCTCCCCTCCCTTCCCTTAT-3' ($T_m = 71.4^\circ\text{C}$); primer arp354 (for PCR probe preparation), 5'-CGTGCTGGTCCCCCACTGTG-3' ($T_m = 70.1^\circ\text{C}$).

For analysis of the TS (spanning positions +321 to +211) the following primers were used: primer arp160R (for primer extension), 5'-CAGTCTCGGGGATCTTG-3' ($T_m = 55.3^\circ\text{C}$); primer arp181R (for PCR amplification), 5'-TTGTGGTCTCCGCCCCCTTCCC-3' ($T_m = 77.1^\circ\text{C}$); primer arp192R (for PCR probe preparation), 5'-TTTCCCCGGCCACCAGC-3' ($T_m = 68.3^\circ\text{C}$).

Quantification of band intensity at dipyrimidine sites

Using the phosphorimager software package provided by the manufacturer (Image Gauge V3.0), a rectangle was drawn around each band on the LMPCR autoradiogram corresponding to a dipyrimidine site. The band intensity value corresponding directly to the amount of radioactive material was read within each rectangle as counts per band surface. The amount of radioactive material at every position corresponding to a dipyrimidine site was quantified in irradiated samples as well as in the unirradiated (NoUV) control lane. The relative intensity (in percentage) of each band in a particular lane was calculated as the fraction of counts at that precise position in comparison with the total amount of counts at all bands corresponding to all other dipyrimidine sites in that lane, after correction for background by subtracting the corresponding value in the unirradiated control lane. In other words, the corrected number of counts for a specific band was divided by the total number of counts of all bands in that lane. Where irradiation has been performed at various doses, the mean value was calculated for each dipyrimidine site, since only the global frequency of CPDs varies as a function of dose but not their distribution at individual dipyrimidine sites. The quantification of every autoradiogram was performed blindly by two independent investigators.

2.2.4 Résultats et Discussion

CHO cells were exposed to photons from defined regions of the solar wavelength spectrum, and the frequency of CPD formation along the TS and NTS of *aprt* exon 2 was mapped at nucleotide resolution by LMPCR. For each type of radiation, the various doses employed correspond to those which can be obtained during a few hours of natural sunlight exposure in Paris (France) at summer zenith (27). The UVB (295-320 nm) and SSL ($\lambda > 295$ nm) sources were purified using 2-mm-thick UV wavelength-cutoff filters (Schott WG305 and WG320, respectively) to rigorously exclude any contaminating UVC and far-UVB. The energy emitted by the filtered SSL lamp was composed of ~0.3% UVB, ~6% UVA, ~47% visible light and ~47% infrared. The corresponding values for terrestrial sunlight are 0.3, 5.1, 62.7 and 31.9%, respectively (33). We note that the UVB source contained a UVA component which could not be excluded; however, as previously discussed (13), this very minor component would not be expected to exert any significant effect on the end-points (i.e., DNA damage and mutation) studied here (29). The broadband UVA lamp was employed without any cutoff filters. However, the emission spectrum of this lamp constituted almost entirely of UVA1 radiation (340-400 nm) and does not contain any biologically significant UVB or UVC (i.e., wavelengths below 330 nm contributing $<10^{-6}$ of the total energy output, according to the emission spectrum provided by the manufacturer). Consequently, the UVA-induced CPD frequency distribution described herein can be entirely attributed to the action of UVA photons.

The distributions of CPDs following UVB, SSL and UVC irradiation are quite similar.

Figure 1A shows a typical LMPCR autoradiogram reflecting the CPD frequency distribution at nucleotide resolution along the NTS of *aprt* exon 2 in cells irradiated with 0.03, 0.6, or 3000 kJ/m² of UVC, UVB, or SSL, respectively. Similar raw data (not shown) were obtained for the TS. Relative CPD frequencies at individual nucleotide positions along *aprt* exon 2 were determined by phosphorimager analysis. In the case of UVC, UVB, and SSL, CPDs were detected at all dipyrimidine sites along both strands. It is particularly

noteworthy that the LMPCR band patterns and intensities generated by UVC, UVB, and SSL were very similar (visual inspection of Figure 1A). Indeed, as graphically depicted in the upper portion of Figure 2 and in Figure 3 (corresponding to the NTS and TS, respectively), phosphorimager analysis clearly revealed that initial CPD frequencies induced by each type of radiation along *aprt* exon 2 were generally equivalent when considering individual dipyrimidine target sites. Furthermore, in actually calculating the proportion of CPDs formed at each of the four classes of dipyrimidine sites, it was revealed that, in the case of either UVC, UVB, or SSL, the overall proportions of CPDs forming at TT, TC, CT, and CC sites were ~28, ~26, ~16 and ~30%, respectively (Table 1). This relative CPD frequency distribution is atypical, especially when compared with the general situation for UVC-irradiated total genomic DNA, where the proportions of CPDs at TT, TC, CT, and CC have been estimated at 68, 16, 13 and 3%, respectively (34,35). In addition, although not apparent in the present case, the ratio of CPDs at C-containing dipyrimidines relative to TT dipyrimidines has been shown to increase significantly following exposure to either UVB or SSL as opposed to exposure to UVC (35,36). The apparently peculiar CPD frequency distribution observed along *aprt* exon 2 can be at least partially explained by the relatively small size (100bp) of this genetic target. Most notably in this latter respect, *aprt* exon 2 is very rich in C-containing dipyrimidines together with a paucity in runs of Ts where CPDs are readily formed after UVC (37,38). Specifically, *aprt* exon 2 contains 65 potential dipyrimidine targets in total, i.e., 5 TT, 11 TC, 9 CT, 19 CC on the NTS, and 3 TT, 6 TC, 7 CT, 5 CC on the TS.

The UVA-induced CPD distribution differs from that induced by UVB, SSL and UVC.

The LMPCR autoradiogram in Figure 1B depicts the CPD distribution along the NTS of *aprt* exon 2 following irradiation with increasing doses of UVA, UVB or SSL. In the case of UVB and SSL, CPD frequencies increased as a function of dose at all possible dipyrimidine target sites on both strands (visual inspection of Figure 1B; autoradiogram for the TS not shown). However, the site specificity for DNA damage formation following exposure to rigorously purified UVA was strikingly different relative to UVB or SSL.

Indeed, CPDs were detected at all potential dipyrimidine sites along both strands of *aprt* exon 2 in UVA-exposed cells only at the highest dose, i.e., 4.5 kJ/m² (upper portion of Figs 2 and 3). The UVA doses also generated a lower global CPD frequency than the doses of UVB and SSL, as judged by denaturing agarose gel electrophoresis (data not shown).

UVA-induced CPDs are predominantly formed at thymine-thymine dipyrimidine sites.

The proportion of CPDs formed at each of the four classes of dipyrimidine sites (TT, CC, CT and TC) have been calculated independently of the number of each of these sites in the analyzed sequence (Table 1). Assuming the same number of dipyrimidine sites for each class, the proportion of CPDs formed at TT sites following UVA radiation would be 57%, at least in the sequence context of *aprt* exon 2. Moreover, the increased proportion of CPDs generated at TT sites following irradiation with UVA versus either UVB or SSL is significantly different ($p < 0.0004$ and < 0.00002 ; Fisher's exact test). Using a sensitive HPLC-MS/MS assay, a large majority of CPDs were recovered at TT sites in bulk genomic DNA from CHO cells exposed to UVA, but not to UVB or SSL (88% versus 42 and 48% respectively; T.Douki, J.Cadet and E.Sage, manuscript submitted).

Although DNA absorbs UVA extremely weakly relative to UVC or UVB (10), it was nonetheless previously shown that the global yield of CPDs in genomic DNA isolated from CHO cells treated with UVA is consistent with a mechanism of formation based on direct absorption of UVA photons (330-360 nm) by DNA (9,27). Moreover, based on action spectra and relative spectral effectiveness for CPD induction, it has been demonstrated that photons of longer UVA wavelength can also be implicated in the production of CPDs (19,22). Furthermore, the distribution of CPDs formed by direct absorption of UVA photons is not expected to differ from that of CPDs produced by UVB or SSL. This latter notion, coupled with the strikingly high frequency of CPDs observed here at TT sites uniquely after UVA treatment, strongly suggest that UVA-induced CPDs are formed through means other than (or in addition to) direct absorption by DNA. In

particular, triplet photosensitization would be expected to produce CPDs predominantly at TT sites, to a lesser extent at TC, CT sites and not at all at CC sites, due to the lower energy of the triplet state of thymine in comparison with cytosine. The preferential formation of CPDs at TT sites via photosensitization after UV exposure has been well documented *in vitro* (39-43). Various non-DNA chromophores are able to absorb UVA photons and presumably transfer energy or electrons to other cellular macromolecules (11); however, potential photosensitizers that could be implicated in preferential CPD formation at TT sites in UVA-exposed cells remain to be investigated.

Induction of CPDs at TT sites by UVA radiation correlates with sites of mutation along exon 2 of the CHO *aprt* gene

It is now well established that the probability of mutation fixation at a given nucleotide position in UV-irradiated cells is strongly dependent upon the initial frequency of CPDs and their subsequent rate of removal via nucleotide excision repair (44,45). Therefore, in order to shed further light on the mechanism of solar UV mutagenesis, and of UVA-induced mutagenesis in particular, the CPD damage spectrum generated here for each of UVC, UVB, UVA and SSL was aligned and compared with the corresponding mutational spectrum characterized previously in the same genetic target (13,46,47). These prior studies showed that the vast majority (>90%) of *aprt* mutations induced by either UVC or UVB at the CHO *aprt* locus was of the UV signature type, i.e., C→T transitions at dipyrimidine sites including some tandem CC→TT events, and correspondingly very few mutations at A:T base pairs. UV signature mutations also comprised a majority of genetic alterations induced by SSL at the *aprt* locus, although T→G transversions at TT sites were induced at significantly higher levels (25% of the SSL-induced mutation spectrum) compared with either UVC (5%) or UVB (9%). The relatively high frequency of this unusual type of base substitution in SSL-exposed cells could be attributed to the UVA component of the SSL source, since it was also revealed in the same study that T→G transversions at TT dipyrimidines were represented in strikingly high proportion (37%) at the CHO *aprt* locus following exposure to rigorously purified UVA. It was originally postulated, based on the above study, that UVA-induced mutations might be attributed to

CPDs, since the vast majority of these mutations, including T→G, were targeted to dipyrimidine sites. Furthermore, three highly characteristic CC→TT UV signature tandem mutations, in addition to a significant proportion of C→T transitions at dipyrimidine sites (5 and 22%, respectively), were recovered after UVA treatment.

Figure 2 illustrates the alignment of damage and mutation spectra along the NTS of exon 2 at the CHO *aprt* locus, where >60% of all *aprt* mutations induced by UVC, UVB, UVA or SSL were recovered in the previous study described immediately above. The pyrimidine run spanning nucleotides 238-246 (especially site 241, but also 242-244; nucleotides 238-246 are underlined in Figure 2), and to a lesser extent the one spanning nucleotides 250-254 (only position 253), constitute the hottest sites for mutation induction following exposure to UVC, UVB or SSL. Furthermore, these pyrimidine runs are clearly the sites that are most frequently damaged following exposure to any of the three types of radiation. CPDs were also very frequently formed at positions 202-206; however this pyrimidine run is located within an intron, i.e., where mutations may not yield a selectable *aprt* phenotype. At positions 241-242 and 253, following UVA irradiation, GC → AT and tandem CC → TT mutations were also recovered where CPDs formed, but to a much lesser extent relative to UVC, UVB or SSL.

All UVA-induced CPD damage hotspots occur at TT sites and correlate well with UVA-induced mutation hotspots. For example, the dipyrimidine site TT 243-244, where the majority of UVA-induced T→G mutations were recovered, represents a very strong hotspot for CPD formation specifically after UVA exposure. In addition, TT 276-277 which was more frequently damaged by UVA than by other types of radiation, was also more frequently mutated by UVA and SSL, and only T→G mutations were recovered (13). Although the UVA-induced CPD hotspot at TT 199-200 is located in an intron, one tandem TT → GG mutation was observed after UVA, strongly suggesting a CPD as the premutagenic lesion. In contrast, the TT site 251-252 which is a hotspot for UVA-induced

CPDs is not mutated by UVA. However a T → G base substitution at the 5' position of the TT would not modify the amino acid residue, making this an unselectable mutation. Such a change at the 3' position of the TT would change a serine into alanine, but may not lead to a mutated phenotype. In any case, among hundreds of mutations at the *aprt* locus generated by exposure to diverse DNA damaging agents, no mutations have ever been recovered at TT 251-252 (48).

The overall data provide strong support for the increasingly well-established notion that CPDs underlie the vast majority of mutations generated by natural sunlight exposure, and directly implicate CPDs as a preeminent premutagenic photoproduct induced by rigorously purified UVA, at least in CHO cells. In all likelihood, 6-4PPs do not play a significant role in UVA-induced mutagenesis, because neither the 6-4PP nor its Dewar valence photoisomer are detectable following UVA exposure (9). Also, investigators have shown that among the plethora of oxidized DNA bases characterized to date, UVA generates mainly 8-oxoGua and very few oxidized pyrimidines (19,22,49). The highly mutagenic 8-oxoGua usually induces G→T transversions and not T→G transversions (50). Very few, if any G→T transversions have been recovered after UVA irradiation (13,24). Finally, since reactive oxygen species are produced by UVA, and consequently by sunlight (11), a role for the highly mutagenic oxidative intermediate 8-oxodGTP in the generation of T→G transversions cannot be discounted. However, incorporation of 8-oxodGTP is not expected to be sequence specific, nor to be responsible for the induction of tandem TT→GG mutations, as we have observed at the CHO *aprt* locus. Further support for the notion that CPDs at TT sites can induce T→G transversions comes from the fact that UVC irradiation has been shown to frequently generate such transversions at the *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hprt)* locus in hamster cells (51).

Although the relatively high proportion of CPDs at TT sites appears to provide a clear basis for the striking predominance of T→G transversions at the CHO *aprt* locus

following irradiation with UVA, we emphasize that this would not appear to underlie the significant increase in T→G mutations also observed after SSL irradiation. Indeed in the current study, unlike the striking situation for UVA, no difference in levels of TT CPDs for were observed for cells exposed to SSL versus UVC or UVB. At present, we have no explanation for this apparent discrepancy. We speculate that, in addition to influencing initial CPD formation, UVA wavelengths may also differentially affect other determinants of mutation fixation relative to the case for UVC or UVB, e.g., by decreasing or increasing the rate of repair and/or of translesion synthesis, respectively, particularly at TT sites.

In conclusion, our data strongly support the notion of the CPD as a major premutagenic lesion in UVA-induced mutagenesis. We would like to emphasize that UVA-induced CPDs at TT sites, presumably formed by photosensitization, could be responsible for T→G transversions in rodent cells. Assuming that these observations can be applied to human skin cancer, our data provide strong molecular impetus for advising the use of sunscreens that contain UVA- as well as UVB-blocking agents. Furthermore, extensive exposure to high intensity UVA tanning lamps could represent a risk for skin cancer through significant TT CPD formation.

2.2.5 Remerciements

We are grateful to Dr R Stephen Lloyd and Tim O'Connor for supplying T4 endonuclease V and photolyase, respectively. This work was supported by grants (held separately by E.A.D. and R.D.) from the National Cancer Institute of Canada (NCIC) (with funds from the Canadian Cancer Society and the Terry Fox Run), and from the Institut Curie (Genotoxicology program) and by Centre National de la Recherche Scientifique (held by E.S.). E.A.D. and R.D. are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.-P.T. is the recipient of a postdoctoral fellowship from the NCIC. P.J.R. holds student fellowships from the Hôpital St-François d'Assise Research Center and from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). D.P. is the recipient of a PhD fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

2.2.6 Références

1. Setlow, R. B. (1974) The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 71, 3363-3366.
2. Black, H. S., deGruijl, F. R., Forbes, P. D., Cleaver, J. E., Ananthaswamy, H. N., deFabo, E. C., Ullrich, S. E. and Tyrrell, R. M. (1997) Photocarcinogenesis: an overview. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 40, 29-47.
3. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. and Ponten, J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 10124-10128.
4. Ananthaswamy, H. N., Fourtanier, A., Evans, R. L., Tison, S., Medaisko, C., Ullrich, S. E. and Kripke, M. L. (1998) p53 Mutations in hairless SKH-hr1 mouse skin tumors induced by a solar simulator. *Photochem. Photobiol.*, 67, 227-232.
5. Mullenders, L. H., Hazekamp-van Dokkum, A. M., Kalle, W. H., Vrieling, H., Zdzienicka, M. Z. and van Zeeland, A. A. (1993) UV-induced photolesions, their repair and mutations. *Mutat. Res.*, 299, 271-276.
6. You, Y. H., Lee, D. H., Yoon, J. H., Nakajima, S., Yasui, A. and Pfeifer, G. P. (2001) Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 44688-44694.
7. Gibbs, P., Horsfall, M., Borden, A., Kibley, B. J. and Lawrence, C. W. (1993) Understanding spectra of UV-induced mutations : studies with individual photoproducts. In Shima, A. e. a. (ed.), *Frontiers of Photobiology*. Elsevier Science Publishers, pp. 357-362.
8. Mitchell, D. L., Jen, J. and Cleaver, J. E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet- B light. *Photochem. Photobiol.*, 54, 741-746.
9. Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E. and Sage, E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 275, 26732-26742.
10. Sutherland, J. C. and Griffin, K. P. (1981) Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm. *Radiat. Res.*, 86, 399-409.
11. Tyrrell, R. M. and Keyse, S. M. (1990) New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 4, 349-361.
12. van Weelden, H., van der Putte, S. C., Toonstra, J. and van der Leun, J. C. (1990) UVA-induced tumours in pigmented hairless mice and the carcinogenic risks of tanning with UVA. *Arch. Dermatol. Res.*, 282, 289-294.

13. Drobetsky, E. A., Turcotte, J. and Chateauneuf, A. (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, 2350-2354.
14. Setlow, R. B. (1999) Spectral regions contributing to melanoma: a personal view. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 4, 46-49.
15. Urbach, F. (1993) Environmental risk factors for skin cancer. *Recent Results Cancer Res.*, 128, 243-262.
16. Gasparro, F. P. (2000) Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ. Health Perspect.*, 108 Suppl 1, 71-78.
17. Peak, M. J. and Peak, J. G. (1990) Hydroxyl radical quenching agents protect against DNA breakage caused by both 365-nm UVA and by gamma radiation. *Photochem. Photobiol.*, 51, 649-652.
18. Ravanat, J. L., Douki, T. and Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 63, 88-102.
19. Kielbassa, C., Roza, L. and Epe, B. (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18, 811-816.
20. Kvam, E. and Tyrrell, R. M. (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*, 18, 2379-2384.
21. Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Mitchell, D. M. and Wei, H. (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem. Photobiol.*, 65, 119-124.
22. Douki, T., Perdiz, D., Grof, P., Kuluncsics, Z., Moustacchi, E., Cadet, J. and Sage, E. (1999) Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem. Photobiol.*, 70, 184-190.
23. Tyrrell, R. M. (1996) Oxidant, antioxidant status and photocarcinogenesis: the role of gene activation. *Photochem. Photobiol.*, 63, 380-383.
24. Robert, C., Muel, B., Benoit, A., Dubertret, L., Sarasin, A. and Sary, A. (1996) Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line. *J. Invest. Dermatol.*, 106, 721-728.
25. Sage, E., Lamolet, B., Brulay, E., Moustacchi, E., Chateauneuf, A. and Drobetsky, E. A. (1996) Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, 176-180.
26. Dumaz, N., Sary, A., Soussi, T., Daya-Grosjean, L. and Sarasin, A. (1994) Can we predict solar ultraviolet radiation as the causal event in human tumours by analysing the mutation spectra of the p53 gene? *Mutat. Res.*, 307, 375-386.

27. Kuluncsics, Z., Perdiz, D., Brulay, E., Muel, B. and Sage, E. (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 49, 71-80.
28. Yoon, J. H., Lee, C. S., O'Connor, T. R., Yasui, A. and Pfeifer, G. P. (2000) The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J. Mol. Biol.*, 299, 681-693.
29. Grof, P., Ronto, G. and Sage, E. (2002) A computational study of physical and biological characterization of common UV sources and filters, and their relevance for substituting sunlight. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 68, 53-59.
30. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D. and Holmquist, G. P. (1992) Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 1798-1804.
31. Drouin, R., Gao, S. and Holmquist, G. P. (1996) Agarose Gel Electrophoresis for DNA Damage Analysis. In Pfeifer, G. P. (ed.) *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Plenum Press, New York, Vol. Chap. 3, pp. 37-43.
32. Drouin, R., Therrien, J. P., Angers, M. and Ouellet, S. (2001) In vivo DNA analysis. *Methods Mol. Biol.*, 148, 175-219.
33. Piver, W. T. (1991) Global atmospheric changes. *Environ. Health Perspect.*, 96, 131-137.
34. Setlow, R. B. and Carrier, W. L. (1966) Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J. Mol. Biol.*, 17, 237-254.
35. Mitchell, D. L., Jen, J. and Cleaver, J. E. (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.*, 20, 225-229.
36. Sage, E. (1999) DNA damage and mutations induced by solar UV radiation. In Baumstark-Khan C. et al. (eds.) *Fundamentals for the Assessment of Risks from Environmental Radiation*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 115-126.
37. Sage, E., Cramb, E. and Glickman, B. W. (1992) The distribution of UV damage in the lacI gene of Escherichia coli: correlation with mutation spectrum. *Mutat. Res.*, 269, 285-299.
38. Sage, E. (1993) Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem. Photobiol.*, 57, 163-174.
39. Lamola, A. A. (1968) Excited state precursors of thymine photodimers. *Photochem. Photobiol.*, 8, 619-632.

40. Charlier, M. and Helene, C. (1972) Photochemical reactions of aromatic ketones with nucleic acids and their components. 3. Chain breakage and thymine dimerization in benzophenone photosensitized DNA. *Photochem. Photobiol.*, 15, 527-536.
41. Moysan, A., Viari, A., Vigny, P., Voituriez, L., Cadet, J., Moustacchi, E. and Sage, E. (1991) Formation of cyclobutane thymine dimers photosensitized by pyridopsoralens: quantitative and qualitative distribution within DNA. *Biochemistry*, 30, 7080-7088.
42. Chouini-Lalanne, N., Defais, M. and Paillous, N. (1998) Nonsteroidal antiinflammatory drug-photosensitized formation of pyrimidine dimer in DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 55, 441-446.
43. Sauvaigo, S., Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Ravanat, J. L. and Cadet, J. (2001) Analysis of fluoroquinolone-mediated photosensitization of 2'-deoxyguanosine, calf thymus and cellular DNA: determination of type-I, type-II and triplet-triplet energy transfer mechanism contribution. *Photochem. Photobiol.*, 73, 230-237.
44. Holmquist, G. P. and Gao, S. (1997) Somatic mutation theory, DNA repair rates, and the molecular epidemiology of p53 mutations. *Mutat. Res.*, 386, 69-101.
45. Holmquist, G. P. and Drouin, R. (1998) Cyclobutane dimer frequency and their repair rates drive tumor mutation frequency in p53 genes. In Hönigsmann, H., Knobler, R. M., Trautigner, F., and Jori, G. (eds.) *Landmarks in photobiology*. OEMF spa, Milan, Italy, pp. 396-398.
46. Drobetsky, E. A., Grosovsky, A. J. and Glickman, B. W. (1987) The specificity of UV-induced mutations at an endogenous locus in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 84, 9103-9107.
47. Drobetsky, E. A., Moustacchi, E., Glickman, B. W. and Sage, E. (1994) The mutational specificity of simulated sunlight at the *aprt* locus in rodent cells. *Carcinogenesis*, 15, 1577-1583.
48. de Boer, J. G., Drobetsky, E. A., Grosovsky, A. J., Mazur, M. and Glickman, B. W. (1989) The Chinese hamster *aprt* gene as a mutational target. Its sequence and an analysis of direct and inverted repeats. *Mutat. Res.*, 226, 239-244.
49. Pouget, J. P., Douki, T., Richard, M. J. and Cadet, J. (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 541-549.
50. Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A. P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349, 431-434.
51. Menichini, P., Vrieling, H. and van Zeeland, A. A. (1991) Strand-Specific mutation spectra in repair-proficient and repair-deficient hamster cells. *Mutat. Res.*, 251, 143-155.

2.2.7 Table I

TABLE 1 : The relative proportions* of CPDs formed at the four classes of dipyrimidine sites, along both strands of the exon 2 of the *aprt* gene in CHO cells exposed to UVA, UVB, UVC radiation and SSL

	UVA	UVB	SSL	UVC
TT	57%	27%	29%	26%
TC	18%	26%	28%	24%
CT	11%	17%	17%	15%
CC	14%	30%	26%	35%

* Following quantification of autoradiograms, the frequency of CPDs formed at a particular class of dipyrimidine sites was divided by the number of dipyrimidine sites in this class contained in exon 2 of the *aprt*, including transcribed and non-transcribed strands (8 TT, 17 TC, 16 CT, and 24 CC sites). The relative proportion of CPDs formed at the four different classes of dipyrimidine sites was then normalized to 100%.

2.2.8 Légendes des figures

Figure 1. Induction of CPDs by UVA, UVB, UVC radiation and SSL, at nucleotide resolution, in exon 2 of the *aprt* gene of CHO cells. Cells were either unirradiated (NoUV) or irradiated as indicated and CPD formation was analyzed by LMPCR along the NTS of *aprt* gene exon 2. The doses for UVB, SSL and UVC induced approximately equal global CPD frequencies as determined by alkaline denaturing agarose gel electrophoresis of T4 endonuclease V-treated genomic DNA (data not shown). The arrows on the right side of the autoradiograms indicate dipyrimidine sites quantified with phosphorimager. The first four lanes from the left on each autoradiogram exhibit LMPCR of DNA treated in standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. **(A)** The three lanes to the right of the Maxam-Gilbert sequencing ladder represent LMPCR of DNA isolated from cells irradiated with 0.03 kJ/m² of UVC, 0.6 kJ/m² of UVB or 3000 kJ/m² of SSL, respectively. **(B)** The nine lanes to the right of the Maxam-Gilbert sequencing ladder represent LMPCR of DNA isolated from cells irradiated with (from left to right, respectively): 4500, 3000, 1500 kJ/m² of UVA, 3.75, 1.20, 0.60 kJ/m² of UVB, 7500, 5000, 2500 kJ/m² of SSL.

Figure 2. Distribution of CPDs and mutations induced by UVA, UVB, UVC radiation and SSL in exon 2 of the *aprt* gene of CHO cells. CPDs were mapped along the NTS of exon 2. Quantification of CPDs was performed as described in Materials and Methods. The upper part of the figure represents the relative frequencies of CPD formation at every dipyrimidine site. In the lower part of the figure, mutations were reported by Drobetsky *et al* (13), and mapped along the sequence independently of the strand where the premutagenic lesions at the origin of the base changes are expected. The relative frequency of mutations at each site was calculated as the ratio of the number of mutants recovered at a particular site to the total number of mutants occurring along the exon 2 of *aprt* gene after irradiation. All events were considered in the calculation and double mutations were counted as one change at each of the two positions. The underlined nucleotides correspond to positions 238-246.

Figure 3. Distribution of CPDs induced by UVA, UVB, UVC radiation and SSL in exon 2 of the *aprt* gene of CHO cells. CPDs were mapped along the TS. Quantification of CPDs was performed as described in Materials and Methods.

Figure 1A

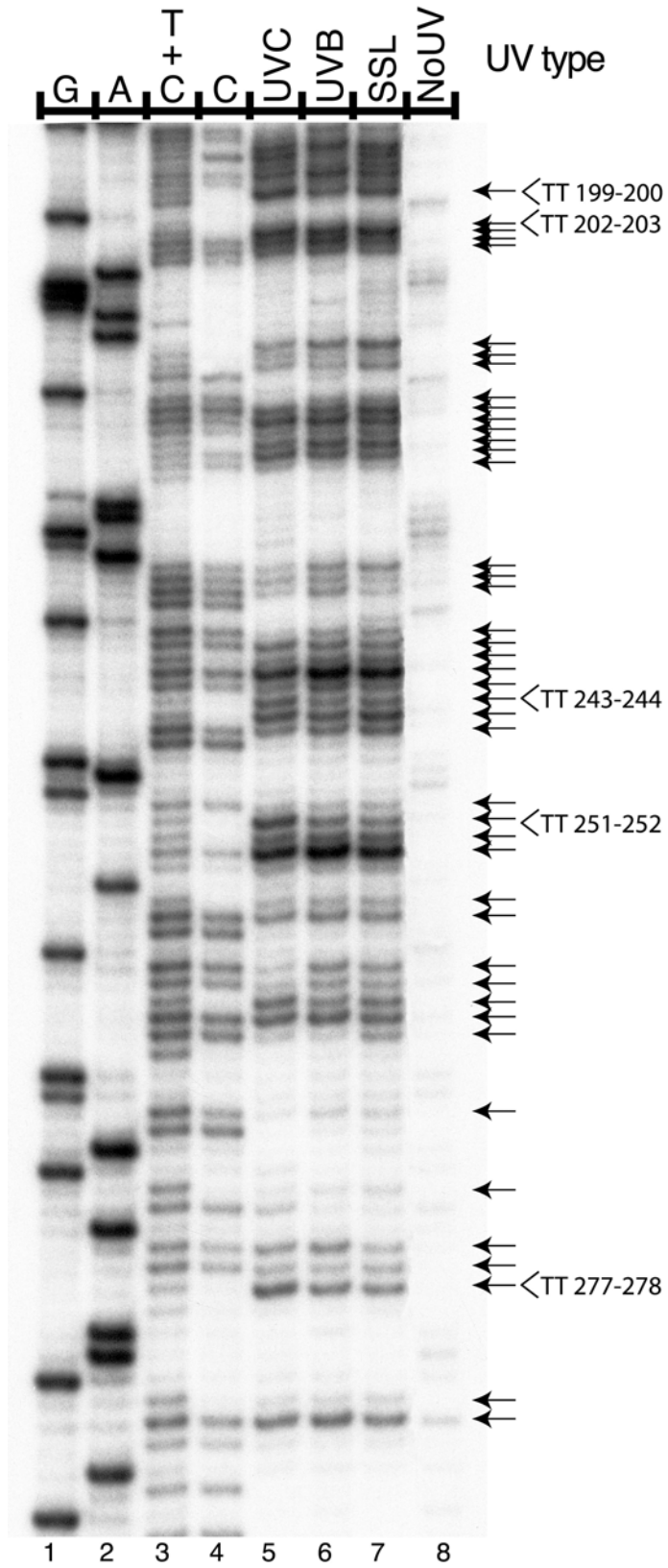


Figure 1B

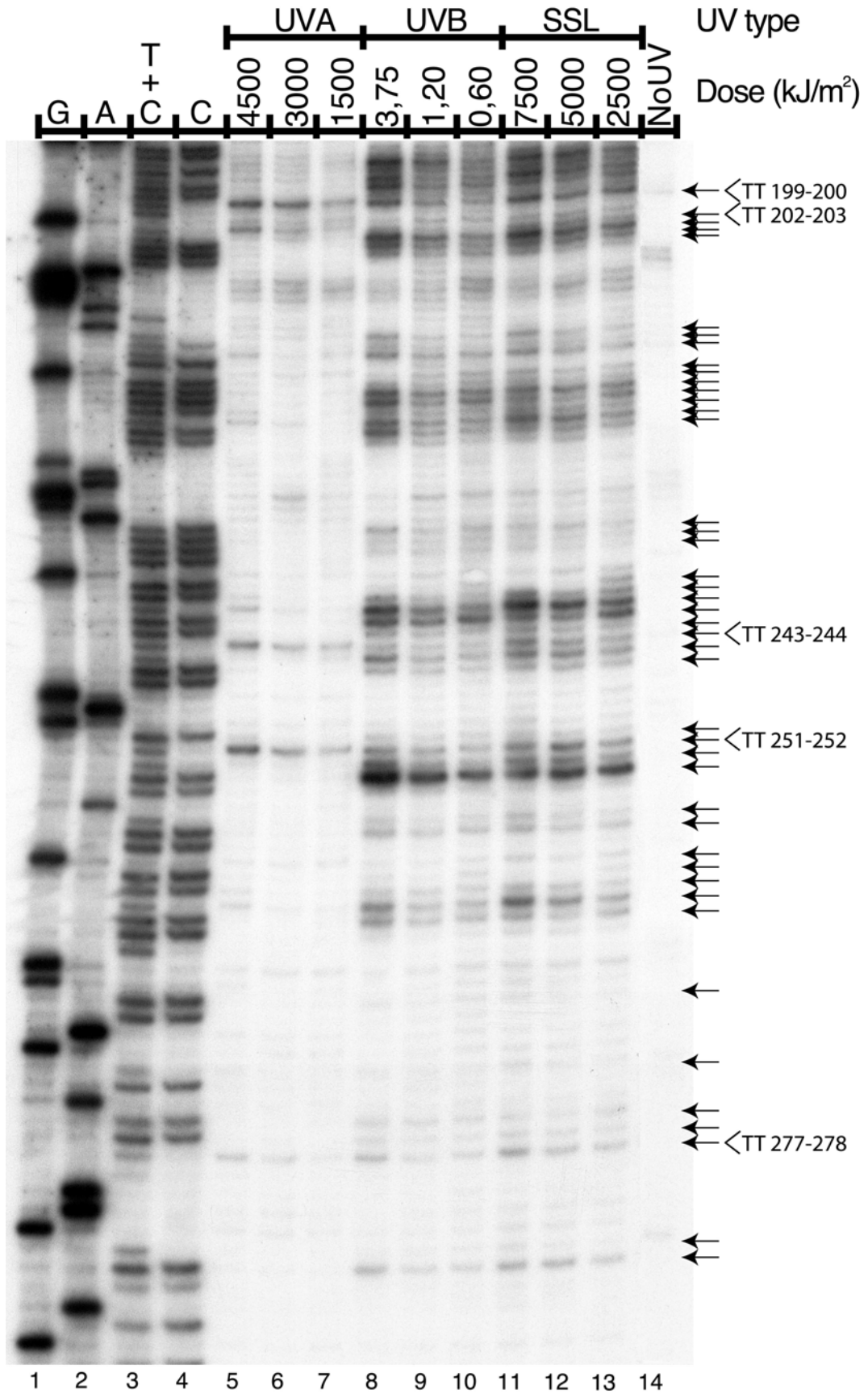


Figure 2

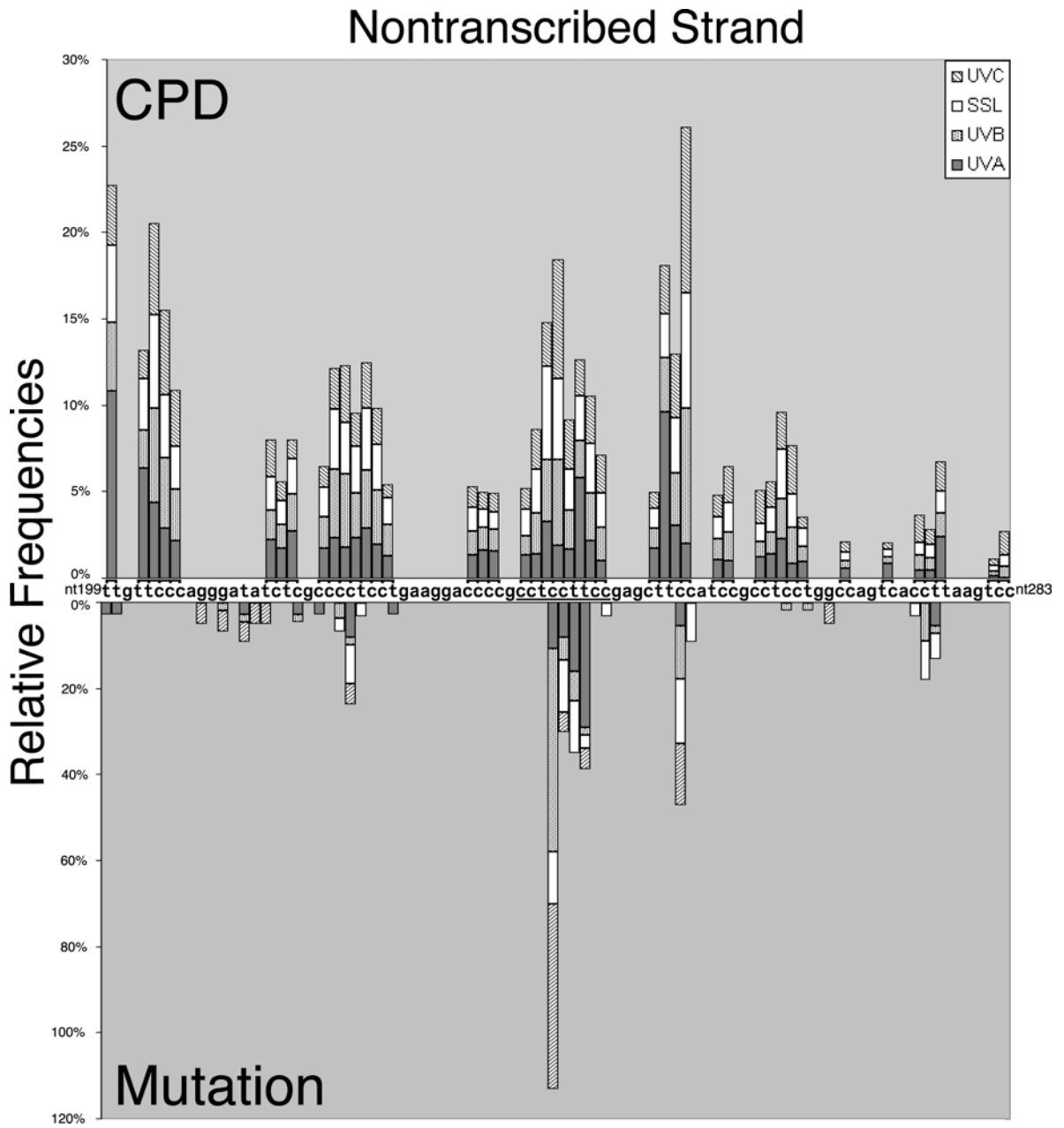
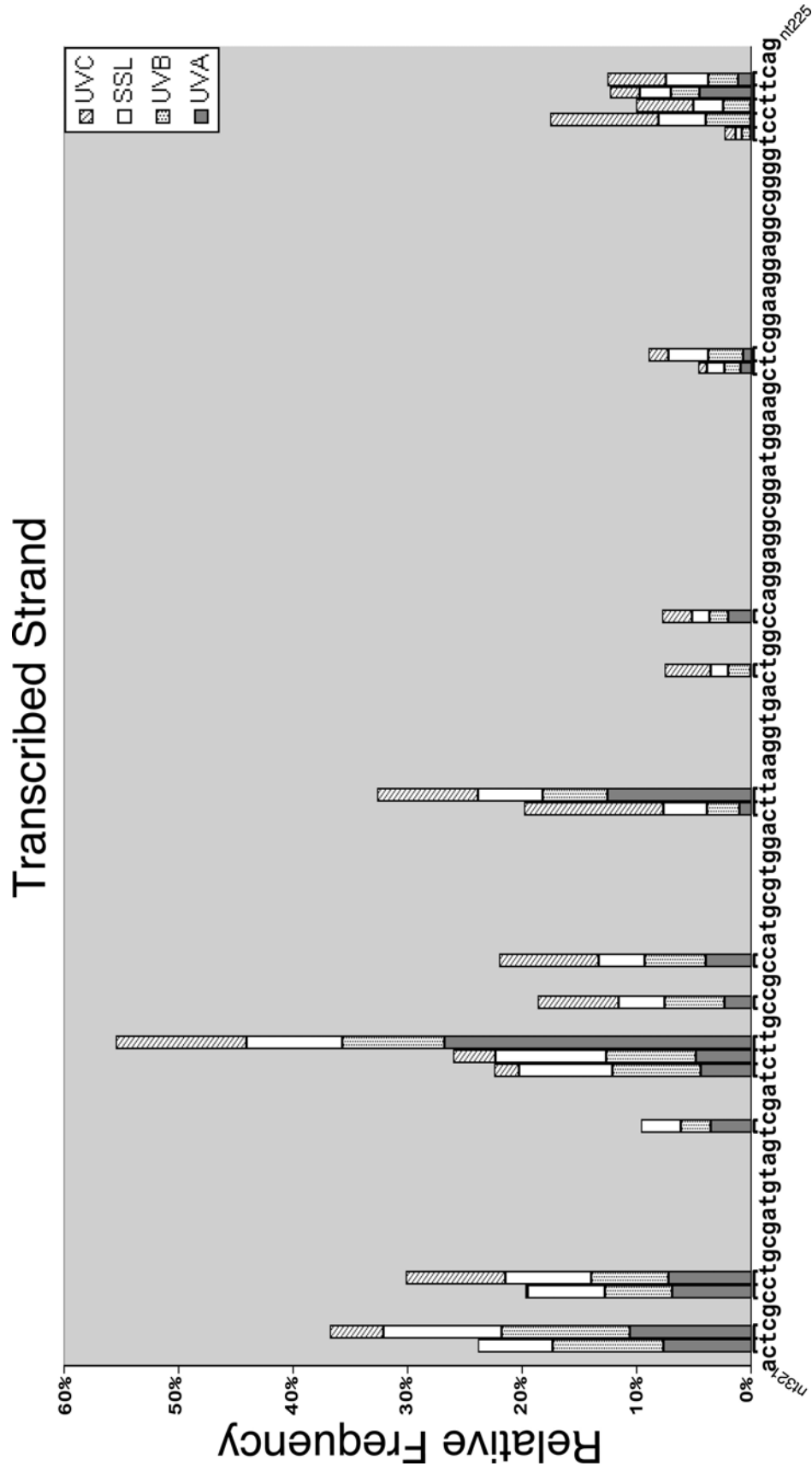


Figure 3



**Chapitre 3 : Human cells bearing homozygous mutations
in the DNA mismatch repair genes *hMLH1* or *hMSH2*
are fully proficient in transcription-coupled nucleotide
excision repair**

(Oncogene. 2002 Aug 22;21(37):5743-52)

3.1 Résumé en français

Les dommages générés sur le brin transcrit des gènes actifs doivent être réparés très rapidement afin de préserver la stabilité génomique. Quand le dommage amène une distorsion de la double hélice d'ADN et qu'il bloque le passage des polymérase à ARN, comme c'est le cas pour les CPD induits par les UV, il est réparé par la NER couplée à la transcription (TCNER). Le système de réparation des mésappariements de bases (MMR) constitue également un mécanisme de prévention des mutations en réparant les bases mal appariées générées lors de la réplication de l'ADN. Il a été publié précédemment que des cellules d'adénocarcinome colorectal déficientes en MMR via des mutations dans *hMLH1* (LoVo) et *hMSH2* (HCT116) avaient un ralentissement de leur TCNER des CPD induits par les UV. Cette observation laissait supposer qu'il y a un lien direct entre les acteurs de la MMR et la TCNER dans les cellules humaines. Dans cet article, nous avons utilisé la technique « ligation-mediated PCR » pour étudier la réparation NER, sur le brin transcrit (TCNER) et sur le brin non-transcrit (GGNER) de gènes actifs, des CPD induits par les UV. Il a été clairement démontré que les cellules déficientes en MMR (LoVo et HCT116) avaient une vitesse de réparation NER beaucoup plus rapide sur le brin transcrit que sur le brin non-transcrit de gènes actifs, ce qui démontre une TCNER normale. La NER dans les LoVo et les HCT116 était aussi rapide que dans les cellules non déficientes en MMR (SW480 et HCT116+Chr3). De plus, les cellules déficientes en MMR avaient une sensibilité aux UV et une reprise de la synthèse de l'ARN suite aux UV égale aux cellules non-déficientes en MMR. Ces résultats démontrent que les cellules d'adénocarcinome colorectal déficientes en *hMLH1* et *hMSH2* gardent une compétence intacte en TCNER.

3.2 Article

Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes *hMLH1* or *hMSH2* are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair

Patrick J. Rochette*, Nathalie Bastien*, Bruce C. McKay†, Jean-Philippe Therrien‡, Elliot A. Drobetsky*¶, and Régen Drouin*¶

* Division of Pathology, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Laval University and Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire, Research Centre, Hôpital St-François d'Assise, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, PQ, Canada, G1L 3L5.

† Center for Cancer Therapeutics, Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, Ontario, Canada.

‡ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, PQ, Canada H1T 2M4.

¶ To whom reprint requests should be addressed. E-mail:

elliott.drobetsky@umontreal.ca

regen.drouin@crsfa.ulaval.ca

Running Title: Transcription-coupled repair in *hMLH1*- and *hMSH2*-deficient cells

Key words: Transcription-coupled nucleotide excision repair; DNA mismatch repair; ligation mediated PCR; cyclobutane pyrimidine dimer

Corresponding Author: Dr. Elliot A. Drobetsky

Centre de Recherche Guy-Bernier,

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415 boulevard de l'Assomption,

Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4,

Tel. (514) 252-3400, ext. 4665; Fax (514)-252-3430

E-mail: elliott.drobetsky@umontreal.ca

3.2.1 Résumé (anglais)

The transcription-coupled nucleotide excision repair (TCNER) pathway maintains genomic stability by rapidly eliminating helix-distorting DNA adducts, such as UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), specifically from the transcribed strands of active genes. DNA mismatch repair (MMR) constitutes yet another critical antimutagenic pathway that removes mispaired bases generated during semiconservative replication. It was previously reported that the human colon adenocarcinoma strains HCT116 and LoVo (bearing homozygous mutations in the MMR genes *hMLH1* and *hMSH2*, respectively), besides manifesting hallmark phenotypes associated with defective DNA mismatch correction, are also completely deficient in TCNER of UV-induced CPDs. This revealed a direct mechanistic link between MMR and TCNER in human cells, although subsequent studies have either supported, or argued against, the validity of this important notion. Here, the ligation-mediated polymerase chain reaction was used to show at nucleotide resolution that MMR-deficient HCT116 and LoVo retain the ability to excise UV-induced CPDs much more rapidly from the transcribed vs the nontranscribed strands of active genes. Moreover, relative to DNA repair-proficient counterparts, MMR-deficient cells were not more sensitive to the cytotoxic effects of UV, and displayed equal ability to recover mRNA synthesis following UV challenge. These results conclusively demonstrate that *hMLH1*- and *hMSH2*-deficient human colon adenocarcinoma cells are fully proficient in TCNER.

3.2.2 Introduction

In human cells, several highly conserved DNA repair pathways have evolved that are essential for the maintenance of genomic stability and the prevention of malignant transformation. For example, DNA mismatch repair (MMR) corrects single-base mismatches and small mismatched loops that result from DNA polymerase infidelity during semiconservative replication (Aquilina and Bignami, 2001). MMR deficiency engenders microsatellite instability associated with greatly elevated cellular mutation rates (Bhattacharyya *et al.*, 1994; Fishel *et al.*, 1993; Reitmair *et al.*, 1997), and germline mutations in MMR genes underlie a majority of hereditary nonpolyposis colon cancers in humans (Peltomaki, 2001). Nucleotide excision repair (NER), recognizes and removes “bulky” (helix-distorting) DNA adducts induced by diverse environmental agents. These include highly-genotoxic solar UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), which play a preeminent role in the initiation of sunlight-associated skin cancers (Brash *et al.*, 1991). NER is comprised of two strongly overlapping subpathways that differ only in the initial (lesion-recognition) step: (i) global NER (GNER), a relatively slow process that removes bulky DNA lesions from the genome overall (including from the nontranscribed strands of active genes); and (ii) transcription-coupled NER (TCNER) which brings about more rapid repair of such lesions that are located uniquely on the transcribed strands of active genes (de Laat *et al.*, 1999). *Xeroderma pigmentosum* (XP) patients, who are universally characterized by deficiency either in GNER alone, or in both GNER and TCNER, display extreme cutaneous photosensitivity that is accompanied by a dramatic (2000-fold) increase in the frequency of sunlight-induced skin cancers (Kraemer *et al.*, 1984). On the other hand, individuals afflicted with Cockayne syndrome (CS) are defective only in TCNER (Venema *et al.*, 1990), and, except for cutaneous photosensitivity, manifest a much different phenotype than XP patients, i.e., growth failure, developmental defects, and no predisposition to skin cancer (Berneburg and Lehmann, 2001; Nance and Berry, 1992).

Although *a priori* MMR and NER might be considered as entirely distinct, evidence has emerged that demonstrates an evolutionarily conserved mechanistic link between these pathways. Firstly, using a strand-specific Southern blot-based assay that quantifies the excision of UV-induced CPDs at the level of the gene, it was initially reported that MMR-deficient *E. coli* which are mutated in particular bacterial homologues (*MutS* or *MutL*) of human MMR genes are unable to carry out TCNER of UV-induced CPDs at the lactose operon (Mellon and Champe, 1996). Secondly, in the same experimental manner, MMR-deficient HCT116 and LoVo human colon adenocarcinoma cells (carrying homozygous mutations in the MMR genes *hMLH1* and *hMSH2*, respectively) were shown to be completely defective in TCNER at the active *dihydrofolate reductase* (*DHFR*) locus (Mellon *et al.*, 1996). Thirdly, in strong support of the above, but using a different type of strand-specific DNA repair assay that measures the post-excision (gap-filling) steps of NER, it was subsequently demonstrated (i) that both *hMLH1*- and *hMSH2*-deficient human adenocarcinoma cells are impaired in TCNER of UV-induced CPDs at the active *metallothionein* locus (Leadon and Avrutskaya, 1997), and (ii) that *hMSH2*- (but not *hMLH1*-) deficient cells (Leadon and Avrutskaya, 1997) as well as MMR-deficient yeast (Leadon and Avrutskaya, 1998) are defective in transcription-coupled repair of oxidative DNA damage (presumably via base excision repair rather than nucleotide excision repair). Finally, a number of *in vitro* studies, *e.g.*, including those based on the yeast *S. Cerevisiae* (Bertrand *et al.*, 1998; Fleck *et al.*, 1999; Kirkpatrick and Petes, 1997) as well as human cells (Wang *et al.*, 1999), have revealed physical and functional interactions between components of the MMR and NER pathways.

Notwithstanding the investigations cited above, convincing evidence has also emerged that is in disaccord with any notion of a role for MMR proteins in TCNER. Indeed, it was shown in a cell-free system that the MutS and MutL polypeptides may not be required for efficient transcription-coupled repair in *E. coli* (Selby and Sancar, 1995). This *in vitro* study in *E. coli* was strongly supported by direct investigations of DNA repair rates in living mammalian cells, which utilized essentially the same type of DNA strand-specific assay that had previously been used (Mellon *et al.*, 1996) to actually demonstrate a role for

MMR proteins in TCNER. Specifically, it was revealed by these investigations that: (i) *MLH1*- and *MSH2*-deficient *S. Cerevisiae* (Sweder *et al.*, 1996) as well as *MSH2*-deficient murine embryonic fibroblasts (Sonneveld *et al.*, 2001) are able to remove CPDs much more rapidly from the transcribed *vs* the nontranscribed strands of active genes and are therefore proficient in TCNER; and (ii) that *hMLH1*-deficient HCT116 cells are fully competent in TCNER of CPDs at the *DHFR* locus (Adimoolam *et al.*, 2001). Finally, using a different DNA repair assay (i.e., the ligation-mediated polymerase chain reaction; see below) that measures CPD removal at nucleotide resolution, it was shown that *hMLH6*-deficient human DLD1 colon adenocarcinoma cells are capable of removing UV-induced CPDs significantly faster from the transcribed *vs* the nontranscribed strand of the *c-jun* proto-oncogene (Therrien *et al.*, 2001).

The possibility that components of the MMR pathway are essential for TCNER has critical implications for our understanding of cellular DNA repair mechanisms, thus requiring that the apparent controversy surrounding this possibility be conclusively resolved. To this end, we used the highly sensitive ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) to determine the rate of CPD removal at nucleotide resolution along the transcribed *vs* the nontranscribed strands of active genes in UV-exposed human colon adenocarcinoma cell strains that differ in MMR status. In addition, the capacity of MMR-proficient *vs* -deficient strains to accomplish TCNER of CPDs was correlated with cellular sensitivity to the cytotoxic effects of UV, and with the ability of these strains to recover mRNA synthesis following UV treatment.

3.2.3 Matériel et Méthodes

Cell strains and UV irradiation conditions

The MMR-deficient human colon adenocarcinoma strain HCT116 bearing a homozygous mutation in *hMLH1*, and its derivative HCT116-chr3 wherein wild-type *hMLH1* expression has been restored *via* chromosome 3 transfer (Koi *et al.*, 1994), were kindly provided by Dr Thomas Kunkel (National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA). Before initiation of the experiments described herein, fluorescence *in situ* hybridization was used to verify either the presence or the absence of an extra chromosome 3 in these latter strains (data not shown). *hMSH2*-proficient SW480 and *hMSH2*-deficient LoVo colon adenocarcinoma cells were purchased from the American Type Culture Collection. TCNER-deficient CS-B (strain GM01629) and XP-A (strain GM05509) immortalized skin fibroblasts, and TCNER-proficient XP-C immortalized skin fibroblasts (strain GM00671), were obtained from the Coriell Cell Repository. HCT116, HCT116-chr3 and SW480 cell lines were maintained in McCoy's 5A medium supplemented with 10% fetal bovine serum, plus 1% penicillin/streptomycin. The LoVo cell line was cultured in DMEM Nut-mix F-12w/Gut-1 supplemented with 10% fetal bovine serum plus 1% antibiotics. The CS-B, XP-A and XP-C skin fibroblasts were cultured in MEM supplemented with Earl's salts, 15% fetal bovine serum plus glutamine, MEM vitamins, MEM essential amino acids, non-essential amino acids and 1% antibiotics. Cells were irradiated with either UVB (290-320 nm) or 254 nm UV at room temperature after replacing the medium with sterile 0.9% NaCl. The UVB source consisted of two fluorescent tubes (FS20T12/ UVB/BP, Phillips) delivering a dose rate of 3.39 J/m²/s, which was filtered through a sheet of cellulose acetate to eliminate wavelengths below 290 nm (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch; Eastman-Kodak Co.) A Philips G25T8 germicidal lamp was used to irradiate cells with 254 nm UV at a fluence of 0.2 J/m²/s.

Ligation-mediated polymerase chain reaction

The LMPCR protocol has been described previously in detail (Angers *et al.*, 2001; Drouin *et al.*, 2001). Briefly, cells growing on 150 mm petri dishes were irradiated either with 400 J/m² of UVB or with 15 J/m² of 254 nm UV and allowed to repair for various times in freshly prepared culture medium. After harvesting of cells, genomic DNA was extracted and digested with T4 endonuclease V to incise the DNA at CPD sites. The resulting 5'-pyrimidine overhangs were then removed by photoreactivation using *E. coli* photolyase, in order to generate ligatable ends. A gene-specific oligonucleotide was annealed downstream of the break site, and the set of genomic cleavage products extended using cloned *Pfu* *exo*⁻ DNA polymerase. An asymmetric double-stranded linker was then ligated to the phosphate groups at the fragment termini, providing a common sequence on the 5'-end of all fragments. A linker-specific primer, in conjunction with another gene-specific primer, was used in a PCR reaction to amplify the cleavage products of interest. These products were subjected to electrophoresis on 8% polyacrylamide gels alongside a Maxam and Gilbert sequencing ladder, transferred to nylon membranes, hybridized to a ³²P-labeled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. Each experimental condition was assayed in duplicate. A screening sequencing gel was initially run using a portion of the DNA to ensure that there was no significant variation between samples. The two samples were then pooled on a combined gel, and the resulting autoradiogram analysed using a Fuji BAS 1000 phosphorimager (Fuji Medical Systems, Stamford, CT, USA). Each band represents a nucleotide position where a break was induced by CPD cleavage, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position. To assess proficiency in GNER and TCNER, relative repair rates for each strain were determined along the transcribed and nontranscribed strands of the *c-jun* proto-oncogene and of the *p53* tumor suppressor gene. The LMPCR primer sets used for studying repair at the *c-jun* and *p53* loci have been described previously (Rozek and Pfeifer, 1993; Tornaletti *et al.*, 1993). These primer sets, and the corresponding nucleotide positions that can be analysed using each, are: (i) to study the transcribed strand of *c-jun*, primers sets JE (positions +7 - +203), JS (+313 - +503) and JX (+1930 - +2010); (ii) to study the nontranscribed strand of *c-jun*, primer sets JB (-310 - -125), JD (-210 - -19) and JY (+2009 - +2192); (iii) to study the transcribed strand of *p53*, primer sets 5-1 (+12234 - +12450), 6-

1 (+12485 - +12675) and 8-1 (+13626 - +13820); (iv) to study the nontranscribed strand of p53, primer sets 5-4 (+12170 - +12370) and 8-4 (+13552 - +13745).

Clonogenic survival assays

Exponentially growing human colon adenocarcinoma cells on 60 mm dishes were treated with various doses of 254 nm UV, UVB, or 6-thioguanine (6-tg). Cells were then trypsinized, counted with a haemocytometer, diluted appropriately and seeded on 100 mm dishes. After 12-16 days, colonies were counted following staining with 50% v/v methanol containing 0.5% w/v methylene blue.

mRNA synthesis

Transcription was quantitatively assessed as previously described (McKay and Ljungman, 1999). Briefly, total cellular DNA was labeled with [¹⁴C]thymidine for approximately 48 h prior to UVB-irradiation. At various times following UVB- or mock-irradiation, cells were incubated for 30 min in the presence of [³H]uridine. The Straight A's mRNA isolation system (Novagen, Madison, WI, USA) was used to isolate the polyadenylated RNA fraction from whole cell lysates. Incorporation of [³H]uridine and [¹⁴C]thymidine were determined with a scintillation counter and [³H] counts were normalized to [¹⁴C] counts to control for differences in cell number. mRNA synthesis is expressed as the proportion of [³H] incorporated in UV-treated compared to control samples.

3.2.4 Résultats et Discussion

We employed the ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) to directly evaluate strand-specific CPD removal at individual nucleotide positions along the active *c-jun* and *p53* loci in the following sets of human colon adenocarcinoma strains: *hMLH1*-deficient HCT116, and HCT116-chr3, i.e., a derivative of HCT116 wherein wild-type *hMLH1* expression has been restored *via* chromosome 3 transfer (Koi *et al.*, 1994); and (ii) *hMSH2*-deficient LoVo and the *hMSH2*-proficient counterpart SW480. The MMR status of each strain was verified by determining cellular sensitivity to the purine analogue 6-tg. It has been demonstrated that MMR-deficient human strains display resistance to 6-tg relative to MMR-proficient counterparts (Glaab *et al.*, 1998). Consistent with this hallmark phenotype of MMR deficiency, we found that both SW480 and HCT116-chr3 were significantly 6-tg sensitive relative to either LoVo or HCT116 (Figure 1).

LMPCR is a highly sensitive genomic sequencing method that has been adapted to determine DNA repair rates at nucleotide resolution along the transcribed and nontranscribed strands of chromosomal genes in living cells (Gao *et al.*, 1994; Therrien *et al.*, 1999; Tornaletti and Pfeifer, 1994). This technique allows precise quantification of any DNA adducts which can be converted either chemically or enzymatically to a ligatable strand break. The excision rate of UV-induced CPDs can be conveniently analysed by LMPCR, because these photolesions are efficiently cleaved with high specificity by the enzyme T₄ endonuclease V, followed by digestion with DNA photolyase to create ligatable 5' ends precisely adjacent to the damaged site.

Figures 2a and 3 display representative LMPCR autoradiograms that reflect the rate of CPD removal along portions of the transcribed and nontranscribed strands, respectively, of *c-jun* in *hMLH1*-deficient HCT116 *vs* its *hMLH1*-proficient derivative HCT116-chr3 following irradiation with 400 J/m² of UVB. In addition, representative autoradiograms are shown in Figures 4 and 5 for repair of the transcribed and nontranscribed strands,

respectively, of the *p53* tumor suppressor gene in *hMSH2*-proficient SW480 vs *hMSH2*-deficient LoVo. Figure 6 depicts LMPCR autoradiograms showing CPD removal along the transcribed vs the nontranscribed strand of *c-jun* in CS-B cells. For both DNA strands of a particular target gene in each strain, at least 33 dipyrimidine sites were chosen randomly from the corresponding autoradiogram, and from other autoradiograms spanning different portions of the transcribed or nontranscribed strands of either *c-jun* or *p53* (raw LMPCR data other than Figures 2-6 not shown; refer to Table 1 for a complete summary of all DNA repair rate determinations derived in the current study). For each randomly chosen site, the fraction of CPDs remaining as a function of time (i.e., at 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 and 32 h post UVB-irradiation) was quantified using a phosphorimager, and displayed graphically (as illustrated for a single representative site in Figure 2b). The times required to achieve 50% repair for each site along a particular strand were then extrapolated, pooled, and averaged (Table 1). We emphasize that although 50% repair times for individual sites along the transcribed or the nontranscribed strand of *p53* and *c-jun* were combined to derive the final (averaged) 50% repair times, each target gene, when considered individually, rendered essentially the same conclusion as the combined results.

The LMPCR data reveal that CPD repair rates along the nontranscribed strand in HCT116 and HCT116-chr3 were similar, i.e., 50% repair times of 19.7 and 17.1 h, respectively (Figure 3; Table 1). Moreover, these 50% repair times, which reflect the overall rate of GNER, are clearly much (3-4-fold) slower than CPD repair rates for the transcribed strand where 50% repair was achieved after approximately 5.3 h in each strain (Table 1 and visual comparison of Figures 2a and 3). These results demonstrate that HCT116 and HCT116-chr3 are equally proficient in TCNER of UV-induced CPDs, despite the well-characterized difference in MMR status. It is also evident that MMR-deficient LoVo cells are as capable as MMR-proficient SW480 or HCT116-chr3 cells at removing CPDs much more rapidly from the transcribed vs. the nontranscribed strand of the *c-jun* and *p53* genes following UVB irradiation. Indeed, 50% repair times along the transcribed and nontranscribed strand for LoVo (3.9 and 22.6 h, respectively) and for SW480 (4.3 and 21.2 h, respectively) very closely reflected the situation described above for HCT116 and

HCT116-chr3. (Table 1 and visual comparison of Figures 4 and 5). In addition, the identical conclusions with respect to TCNER proficiency in MMR-deficient *vs.* -proficient cells could be drawn when the four human colon adenocarcinoma strains used here were irradiated with 15 J/m² of 254 nm UV rather than with 400 J/m² of UVB (Table 1). This comparison between UVB and 254 nm UV is crucial, since previous investigations (cited earlier) on the role of MMR proteins in NER employed only 254 nm UV which is not present in terrestrial sunlight due to absorption by stratospheric ozone, and which elicits substantially different responses than environmentally-relevant UVB with respect to both genotoxicity and patterns of gene activation (Drobetsky *et al.*, 1995; Tyrrell, 1996; You *et al.*, 1999). Finally, as expected, we found that TCNER of UV-induced CPDs at the *p53* locus was virtually completely abolished in CS-B skin fibroblasts (Figure 6, Table 1), which are known to be completely deficient only in TCNER (Venema *et al.*, 1990). This latter control ensures that the LMPCR assay is fully capable of revealing the extent of strand-specific repair at nucleotide resolution in human cells.

We then sought to extend our LMPCR repair rate data by evaluating other critical endpoints associated with cellular DNA repair status. Specifically, deficiency in the TCNER pathway *per se*, as exemplified by the situation for CS fibroblasts, is associated with greatly increased sensitivity to the cytotoxic effects of UV (Andrews *et al.*, 1978). Thus, if MMR-deficient cells would be completely deficient in TCNER, these cells, relative to MMR-proficient counterparts, would also be expected to manifest reduced colony forming ability after UV treatment. We therefore investigated clonogenic survival in MMR-deficient *vs.* -proficient human adenocarcinoma strains after irradiation with both UVB and 254 nm UV over a range of doses. In contrast to a previous study (Mellon *et al.*, 1996), but in accord with a number of others (Adimoolam *et al.*, 2001; Afzal *et al.*, 1995; Leadon and Avrutskaya, 1997; O'Driscoll *et al.*, 1999), we observed that MMR-proficient human cells do not manifest enhanced ability to survive UV challenge relative to MMR-deficient counterparts (Figure 7). In fact, after irradiation with either 254 nm UV or UVB, we found that the MMR-proficient strain HCT116-chr3 was marginally more sensitive to cell killing compared to either of the MMR-deficient counterparts LoVo or HCT116. These clonogenic

survival data are entirely consistent with our LMPCR results showing that MMR status does not reduce the efficiency of TCNER.

Moreover, the capacity of a given cell strain to recover mRNA synthesis following UV treatment should in large part reflect its ability to remove transcription-blocking CPD via the TCNER pathway. Indeed, TCNER-deficient CS-B fibroblasts are defective in the recovery mRNA synthesis following UV irradiation relative to normal fibroblasts, or to XP complementation group C fibroblasts that are deficient only in GNER (Ljungman and Zhang, 1996; Mayne and Lehmann, 1982). As such, we assessed the ability of HCT116 and HCT116-*chr3* to synthesize nascent polyadenylated RNA after UVB irradiation. Exposure to 50 J/m² of UVB led to an immediate decrease in mRNA synthesis for each strain, but transcription recovered fully in both cell types within 6 h (Figure 8a). Moreover no significant differences in the recovery of mRNA synthesis in HCT116 or HCT116-*chr3* were detected following exposure to a broad range of UVB doses (Figure 8b). Therefore, HCT116 and HCT116-*chr3* display equivalent capacity to recover mRNA synthesis following UVB irradiation under all conditions examined. As expected, transcription was severely compromised 6 h following exposure to 50 or 100 J/m² UVB in CS-B and XP-A cells (both deficient in TCNER), while normal and XP-C fibroblasts (both proficient in TCNER) had recovered transcription under these conditions (Figure 8c). Thus, it is clear that HCT116 and HCT116-*chr3* display equivalent capacity to recover mRNA synthesis following UVB irradiation, providing further strong supporting evidence that each of these strains is equally proficient in clearing CPD from actively transcribed DNA sequences.

We have no firm explanation as to why our own results are in complete disaccord with those cited earlier of some other laboratories that employed the same human colon adenocarcinoma strains to investigate the role of MMR proteins in TCNER following exposure to UV. One possibility could relate to the different DNA repair assays used in each case. As mentioned above, prior investigations employed strand-specific Southern blot-based DNA repair assays that measure either CPD recognition/excision (Mellon and

Champe, 1996; Mellon *et al.* 1996) or NER gapfilling (Leadon and Avrutskaya, 1997) at the level of the gene, while the current study exploited a PCR-based assay that measures CPD recognition/excision at nucleotide resolution. Another formal possibility for the discrepant results could be that different target genes were studied, i.e., *DHFR* and *metallothionein* previously, vs *c-jun* and *p53* here. In any case, despite any studies indicating physical and/or functional interactions between the MMR and NER pathways, our own data on CPD repair rates, UV cytotoxicity, and the recovery of mRNA synthesis after UV treatment, taken together, provide conclusive evidence that the hMLH1-and hMSH2 proteins are not functionally implicated in the TCNER pathway in human cells.

3.2.5 Abréviations

CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; CS, Cockayne syndrome; GNER, global nucleotide excision repair; DHFR, dihydrofolate reductase; LMPCR, ligation-mediated polymerase chain reaction; MMR, DNA mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; NTS, nontranscribed strand; TCNER, transcription-coupled nucleotide excision repair; TS, transcribed strand; XP, Xeroderma pigmentosum

3.2.6 Remerciements

This work was supported by grants (held separately by EA Drobetsky, R Drouin and BC McKay) from the National Cancer Institute of Canada (NCIC) (with funds from the Canadian Cancer Society and the Terry Fox Run), and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (held by EA Drobetsky). EA Drobetsky and R Drouin are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J-P Therrien is the recipient of a postdoctoral fellowship from the NCIC. PJ Rochette holds student fellowships from the Hôpital St-François d'Assise Research Center and from the CIHR. We are grateful to Nancy Dallaire and Frederike-Maude Brien for valuable technical assistance, to Dr R Stephen Lloyd for supplying T4 endonuclease V, and Drs Mats Ljungman and Tom Glover for the hTERT immortalized fibroblasts.

3.2.7 Références

- Adimoolam S, Lin CX and Ford JM. (2001). *J. Biol. Chem.*, **30**, 25813-25822.
- Afzal V, Feeney L, Thomas GH, Volpe JP and Cleaver, JE. (1995). *Mutagenesis*, **10**, 457-462.
- Andrews AD, Barrett SF, Yoder FW and Robbins JH. (1978). *J. Invest. Dermatol.*, **70**, 237-239.
- Angers M, Cloutier J-F, Castonguay A and Drouin R. (2001). *Nucleic Acids Res.*, **29**, e83.
- Aquilina G and Bignami M. (2001). *J. Cell Physiol.*, **187**, 145-154.
- Berneburg M and Lehmann AR. (2001). *Adv. Genet.*, **43**, 71-102.
- Bertrand P, Tishkoff DX, Filosi N, Dasgupta R and Kolodner RD. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14278-14283.
- Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J and Meuth M. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 6319-6323.
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ and Ponten J. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10124-10128.
- de Laat WL, Jaspers NG and Hoeijmakers JH. (1999). *Genes Dev.*, **13**, 768-785.
- Drobetsky EA, Turcotte J and Chateauneuf A. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2350-2354.
- Drouin R, Therrien J-P, Angers M and Ouellet S. (2001). *Methods in Molecular Biology: DNA-Protein Interactions, Principles and Protocols*. Moss T (ed). Totowa, NJ: Humana Press, pp. 175-219.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M and Kolodner R. (1993). *Cell*, **75**, 1027-1038.
- Fleck O, Lehmann E, Schar P and Kohli J. (1999). *Nat. Genet.*, **21**, 314-317.
- Gao S, Drouin R and Holmquist GP. (1994). *Science*, **263**, 1438-1440.
- Glaab WE, Risinger JI, Umar A, Barret JC, Kunkel TA, and Tindall KR. (1998). *Carcinogenesis*, **19**, 1931-1937.
- Kirkpatrick DT and Petes TD. (1997). *Nature*, **387**, 929-931.
- Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA and Boland CR. (1994). *Cancer Res.*, **54**, 4308-4312.

- Kraemer KH, Lee MM and Scotto J. (1984). *Carcinogenesis*, **5**, 511-514.
- Leadon SA and Avrutskaya AV. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 3784-3791.
- Leadon SA and Avrutskaya AV. (1998). *Mutat. Res.*, **407**, 177-187.
- Ljungman M and Zhang F. (1996). *Oncogene*, **13**, 823-831.
- Mayne LV and Lehmann AR. (1982). *Cancer Res.*, **42**, 1473-1478.
- McKay BC and Ljungman M. (1999). *Neoplasia*, **1**, 276-284.
- Mellon I and Champe GN. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1292-1297.
- Mellon I, Rajpal DK, Koi M, Boland CR and Champe GN. (1996). *Science*, **272**, 557-560.
- Nance MA and Berry SA. (1992). *Am. J. Med. Genet.*, **42**, 68-84.
- O'Driscoll M, Martinelli S, Ciotta C and Karran P. (1999). *Carcinogenesis*, **20**, 799-804.
- Peltomaki P. (2001). *Mutat. Res.*, **488**, 77-85.
- Reitmair AH, Risley R, Bristow RG, Wilson T, Ganesh A, Jang A, Peacock J, Benchimol S, Hill RP, Mak TW, Fishel R and Meuth M. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 3765-3771.
- Rozek D and Pfeifer GP. (1993). *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5490-5499.
- Selby CP and Sancar A. (1995). *J. Biol. Chem.*, **270**, 4890-4895.
- Sonneveld E, Vrieling H, Mullenders LH and van Hoffen A. (2001). *Oncogene*, **20**, 538-541.
- Sweder KS, Verhage RA, Crowley DJ, Crouse GF, Brouwer J and Hanawalt PC. (1996). *Genetics*, **143**, 1127-1135.
- Therrien J-P, Drouin R, Baril C and Drobetsky EA. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 15038-15043.
- Therrien J-P, Loignon M, Drouin R and Drobetsky EA. (2001). *Cancer Res.*, **61**, 3781-3786.
- Tornaletti S and Pfeifer GP. (1994). *Science*, **263**, 1436-1438.
- Tornaletti S, Rozek D and Pfeifer GP. (1993). *Oncogene*, **8**, 2051-2057.
- Tyrrell RM. (1996). *Bioessays*, **18**, 139-148.
- Venema J, Mullenders LH, Natarajan AT, van Zeeland AA and Mayne LV. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4707-4711.

Wang H, Lawrence CW, Li GM and Hays JB. (1999). *J. Biol. Chem.*, **274**, 16894-16900.

You YH, Li C and Pfeifer GP. (1999). *J. Mol. Biol.*, **293**, 493-503.

3.2.8 Table 1

Table 1 Strand-specific repair of cyclobutane pyrimidine dimers in immortalized CS-B skin fibroblasts, and in HCT116, HCT116-chr3, LoVo, and SW480 adenocarcinoma cells, irradiated with UVB or 254 nm UV^a.

UV type		Strand	Average 50% repair time (h)	No. of sites analysed	Ratio NTS/TS	
UVB (400 J/m ²)	CS-B	TS ^b	19.7 (6-32)	46	1.1	
		NTS	21.7 (10-32)	23		
	HCT116	TS	5.4 (1-10)	46	3.67	
		NTS	19.7 (6-32)	33		
	HCT116-chr3	TS	5.3 (2-9)	46	3.25	
		NTS	17.1 (6-32)	33		
	LoVo	TS	4.0 (2-10)	38	5.84	
		NTS	22.6 (14-32)	46		
	SW480	TS	4.3 (1-10)	38	4.94	
		NTS	21.2 (12-30)	46		
	254 nm (15 J/m ²)	HCT116	TS	5.2 (2-12)	22	4.72
			NTS	24.7 (8-32)	20	
HCT116-chr3		TS	4.9 (2-10)	22	5.01	
		NTS	24.4 (12-32)	20		
LoVo		TS	4.9 (3-8)	24	4.32	
		NTS	21.1 (10-32)	22		
SW480		TS	5.0 (2-9)	24	4.13	
		NTS	20.6 (10-32)	22		

a For each strain, the average time required to achieved 50% repair was extrapolated from individual repair rate determinations for 22 to 46 dipyrimidine sites from various portions spanning the *c-jun* and/or *p53* target genes. For example, see the first entry where the average 50% repair time for the transcribed strand of CS-B cells (19.67 hr) was calculated by pooling repair rate calculations from 46 sites along *c-jun* and *p53* using the indicated primer sets (See Materials and methods for the nucleotide positions corresponding to the primer sets specific for either *c-jun* or *p53*). For each strain, the values in parentheses beside the average 50% repair times represent the slowest and fastest 50% repair times, to indicate the site-to-site variation in repair rates.

b TS, Transcribed strand; NTS, Nontranscribed strand

3.2.9 Légendes des figures

Figure 1 Levels of 6-thioguanine resistance in MMR-proficient *vs* -deficient human colon adenocarcinoma cells. The relative survival after treatment with various doses of 6-tg was calculated as the mean number of surviving colonies for treated relative to mock-treated cells. Each time point represents the average of at least three independent experiments.

▲ LoVo ; △ SW480 ; ● HCT116 ; ○ HCT116-chr3

Figure 2 (a) LMPCR autoradiograms depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the transcribed strand of the human *c-jun* proto-oncogene (nucleotides +374 - +314) in MMR-deficient HCT116 (left side) and MMR-proficient HCT116-chr3 (right side). The first four lanes from the left illustrate LMPCR of genomic DNA treated in Maxam-Gilbert cleavage reactions. The following twenty lanes (except lanes 14 and 24) show LMPCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells that had undergone repair for the indicated times (h). Lanes 14 and 24 show LMPCR of unirradiated DNA treated with T4 endonuclease V/photolyase. The arrows indicate dipyrimidine sites that were quantified using a Fuji BAS 1000 phosphorimager, equipped with the Image Gauge V3.0 program. The open arrow indicates a representative dipyrimidine site (located within 5'-ACTCTG-3', nucleotides +364 to +359; site indicated in bold) for which **(b)** the relative repair rate has been graphically illustrated below the autoradiogram

Figure 3 LMPCR autoradiograms depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the nontranscribed strand of the human *c-jun* proto-oncogene (nucleotides -207 - -73) in MMR-deficient HCT116 (left side) and MMR-proficient HCT116-chr3 (right side)

Figure 4 LMPCR autoradiograms depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the transcribed strand of the human p53 gene (nucleotides +12601 - +12507) in MMR-deficient LoVo cells (left side) and MMR-proficient SW480 (right side)

Figure 5 LMPCR autoradiograms depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the nontranscribed strand of the human p53 gene (nucleotides +12214 - +12323) in MMR-deficient LoVo cells (left side) and MMR-proficient SW480 (right side)

Figure 6 LMPCR autoradiograms depicting repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along a portion of the transcribed (left side) (nucleotides +12445 - +12293) and nontranscribed (right side) (nucleotides +12174 - +12313) strands of the human p53 gene in TCNER-deficient CS-B skin fibroblasts

Figure 7 UV-induced cytotoxicity in human colon adenocarcinoma strains differing in MMR status. The survival after treatment with various doses of UVB or of 254 nm UV is expressed as the mean number of surviving colonies for irradiated cells relative to mock-irradiated controls. Each time point represents the average of at least three independent experiments. ▲ LoVo ; □ SW480 ; ● HCT116 ; ○ HCT116-chr3

Figure 8 The effect of mismatch repair status on the recovery of mRNA synthesis following UVB-irradiation. (a) Incorporation of [³H]uridine into the polyadenylated fraction of RNA was assessed in HCT116 (hollow bars) and HCT116-chr3 cells (solid bars) either immediately following, or 6 hours after, exposure to 50 J/m² of UVB. mRNA synthesis is expressed as the per cent incorporation of [³H]uridine compared to mock irradiated controls. (b) mRNA synthesis was determined 6 h following irradiation of HCT116 cells (hollow bars) and HCT116-chr3 (solid bars) as a function of UVB dose (0-450 J/m² UVB). (c) mRNA synthesis was determined 6 h following irradiation of normal (hollow bars), XP-C (stippled bars), CS-B (cross hatched bars) and XP-A fibroblasts (solid bars) as a function of UVB dose (0, 50 or 100 J/m² UVB). Each value in (a - c) represents the mean (+ s.e.m.) of three to eight determinations

Figure 1

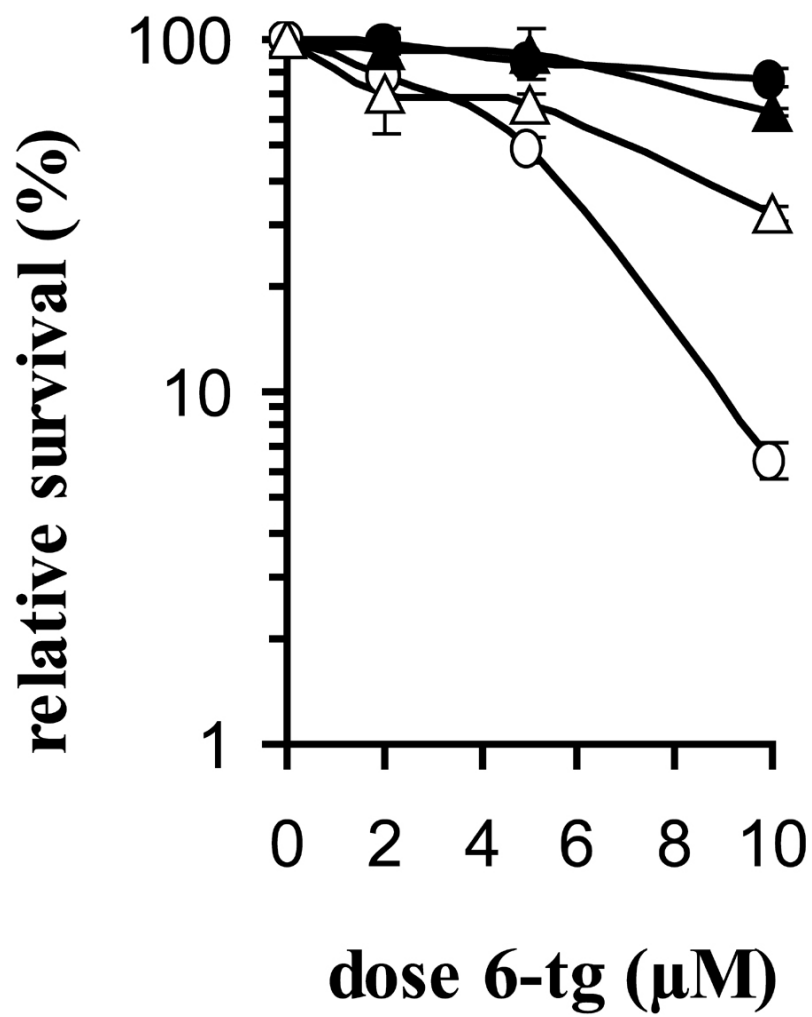


Figure 2

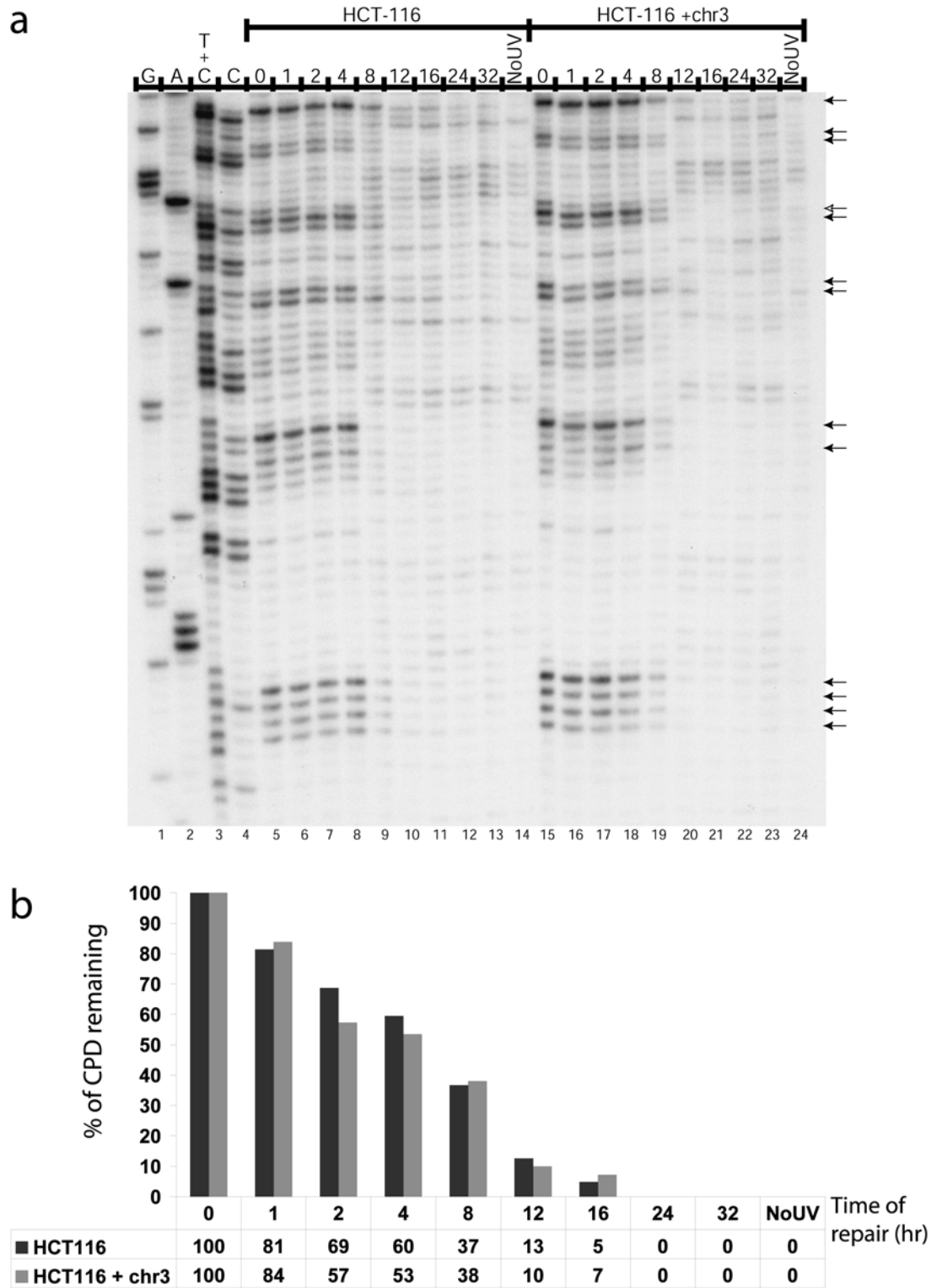


Figure 3

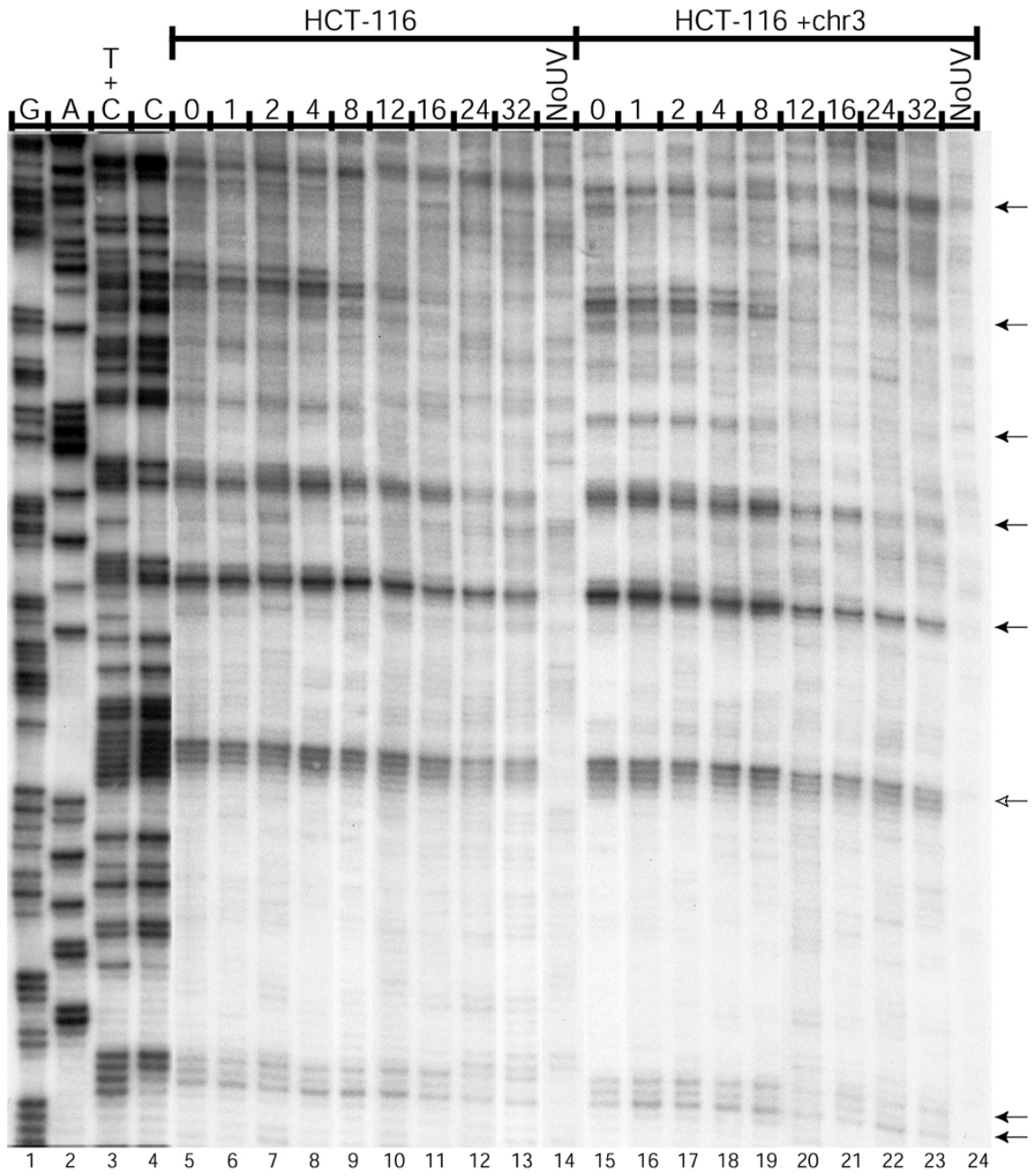


Figure 4

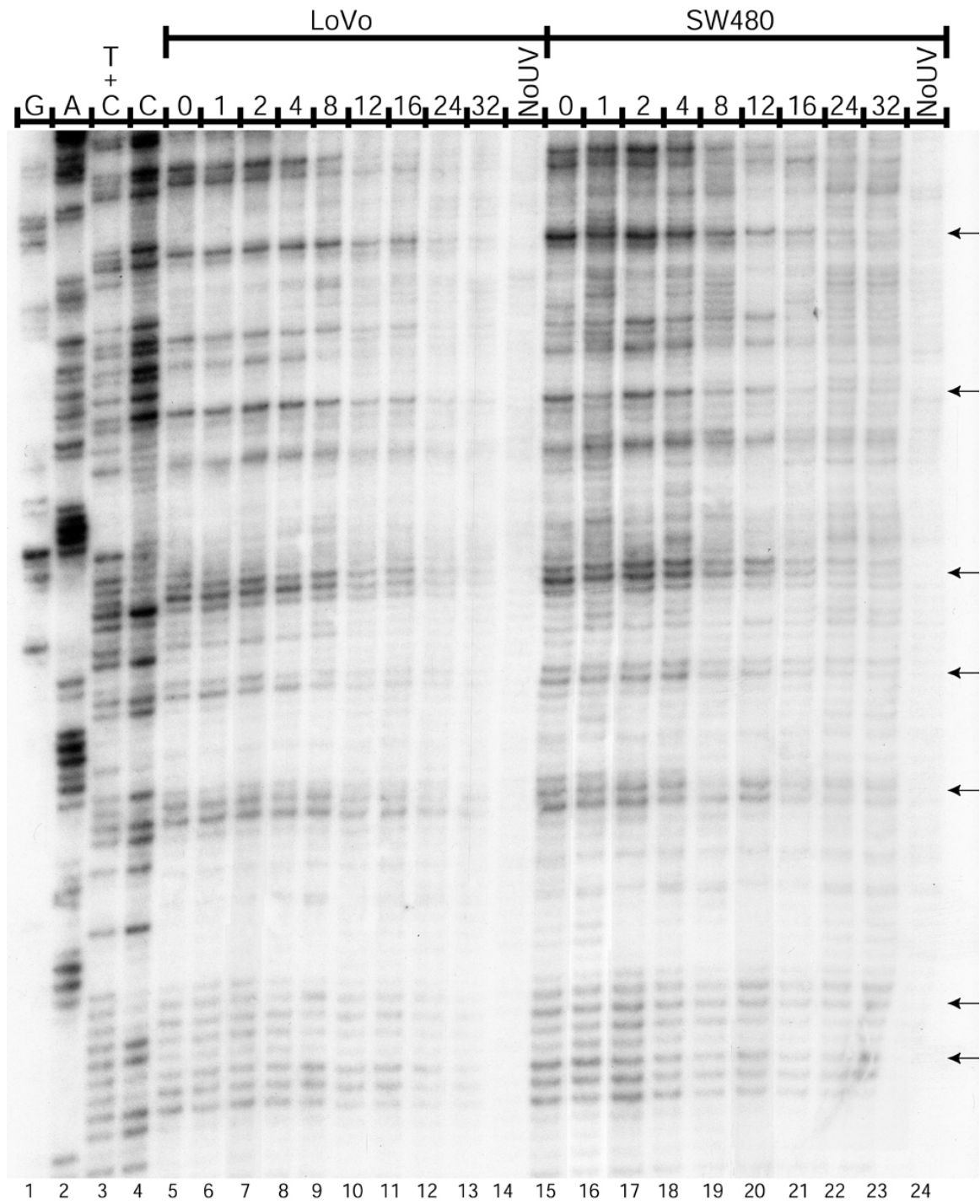


Figure 5

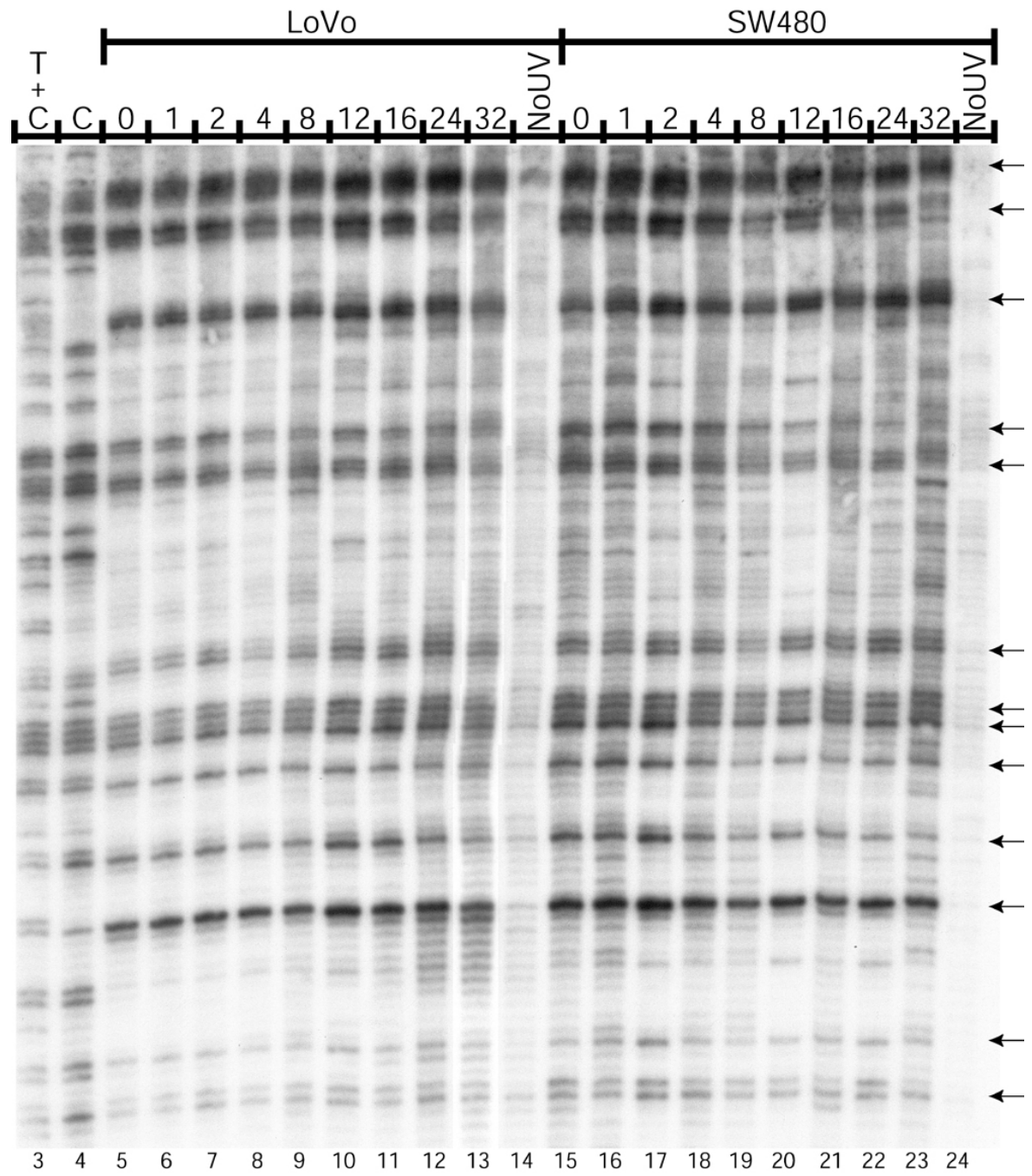


Figure 7

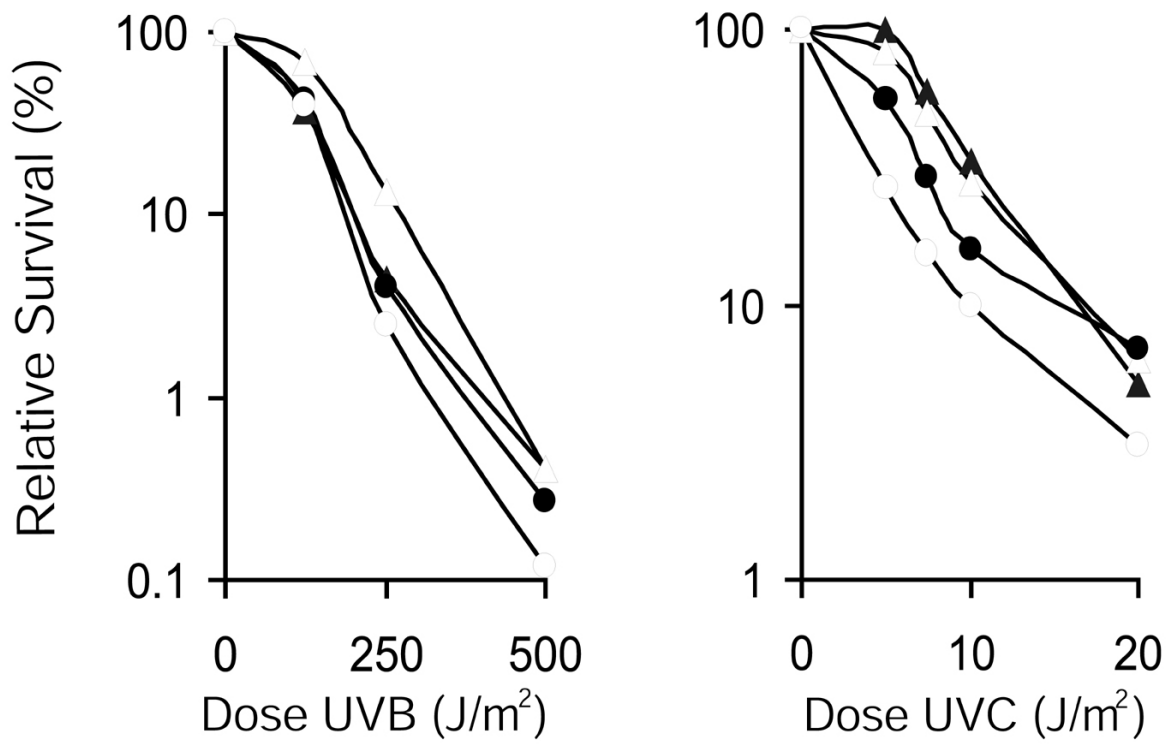
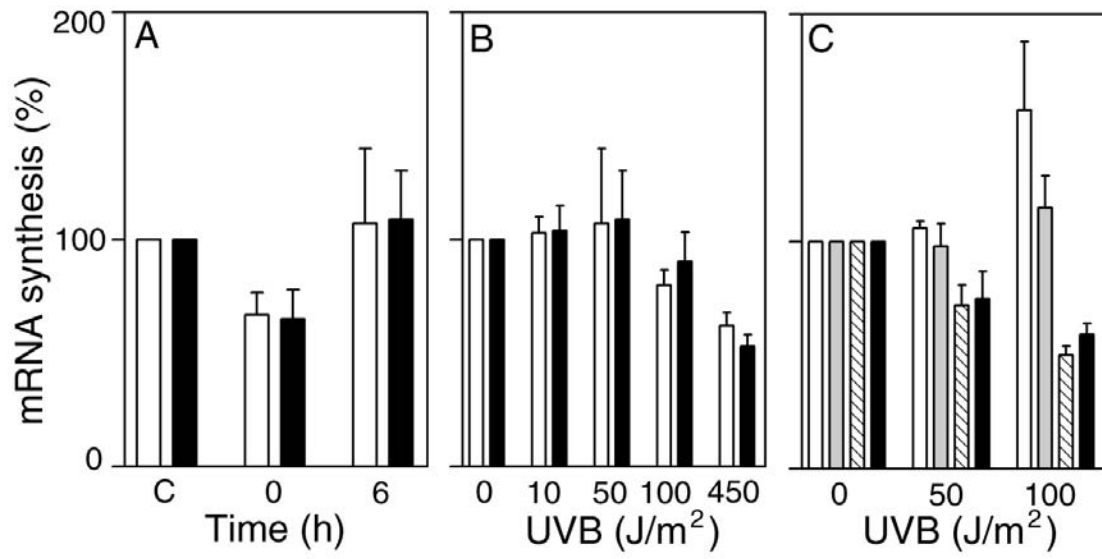


Figure 8



Chapitre 4 : SW480, a double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions

(Soumis à la revue « Journal of Molecular Biology », le 1^{er} décembre 2004)

4.1 Résumé en français

À la suite de différents stress cellulaires, p53 trans-active une variété de gènes impliqués dans la régulation des mécanismes de réponse au stress comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'angiogenèse. De plus, p53 est reconnu pour être essentiel au bon fonctionnement de la réparation par excision de nucléotides (NER) d'adduits encombrants comme ceux générés par les ultraviolets (UV) du soleil. Nous avons démontré précédemment que les SW480, une lignée d'adénocarcinome colorectal double-mutante pour p53, réparent les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPD) par NER à une vitesse normale. Cette étude tente de comprendre les mécanismes moléculaires de ce phénotype inattendu. Une caractérisation cytogénétique a montré que les SW480 sont stables au niveau chromosomique. Elle peut donc être comparée avec la SW480 utilisée par les autres groupes de recherches. À l'aide de la « Fluorescence *in situ* hybridization » (FISH), nous avons montré que plus de 98% des noyaux interphasiques des SW480 contenaient trois copies du gène *p53*. Ces trois copies de *p53* contiennent deux mutations (R273H et P309S) produisant une protéine double-mutante à un niveau 20x supérieur à ce qui est retrouvé dans des cellules normales en p53. Par « electrophoretic mobility shift assay » (EMSA), nous avons démontré que la protéine p53 double-mutante a une capacité de liaison à sa séquence consensus comparable à une protéine p53 normale. L'analyse de l'expression de *p21^{Cip1/WAF1}* et du « footprint » *in vivo* du promoteur de *p21^{Cip1/WAF1}* par « ligation-mediated PCR » (LMPCR) ont montré que p53 était nécessaire, suite à un stress (tel les UV ou les radiations ionisantes), pour induire l'activation de *p21^{Cip1/WAF1}*. En contrepartie, la protéine p53 double-mutante dans les SW480 semble activer constitutivement *p21^{Cip1/WAF1}* en absence de stress via un mécanisme inconnu. Un phénomène semblable pourrait expliquer comment un p53 double-mutant, tel que retrouvé dans les SW480, peut activer les gènes de la NER et amener ainsi une réparation normale des CPD. Nous concluons que, en général, les résultats obtenus avec les SW480 en les considérant déficientes en p53 doivent être interprétés avec prudence.

4.2 Article

SW480, a p53 double-mutant cell line retains proficiency for some p53 functions.

Patrick J Rochette^{1,2}, Nathalie Bastien^{1,2}, Josée Lavoie^{1,*}, Sylvain L Guérin³ and Régen Drouin^{1,2}

1 Division of Pathology, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Laval University and Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire, Research Center, Hôpital St-François d'Assise, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ), Québec, Canada G1L 3L5.

2 Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, and Service of Medical Genetics, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, 3001, 12th Ave North, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4.

3 Laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire et Oncologique, Research Center of the Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL), CHUQ, Ste-Foy, Québec, Canada G1V 4G2.

* Present address: McMaster University, Medical Physics and Applied Radiation Sciences Unit, Hamilton, Ontario, Canada

Submitted to: Journal of Molecular Biology

Dr. Peter Wright, Editor-in-Chief,

Dept of Molecular Biology, The Scripps Research Institute,

10550 N. Torrey Pines Rd,

LaJolla, CA 92037, U.S.A.

E-mail: JMB@scripps.edu

Running title : SW480, a p53 double-mutant cell line

KeyWords : p53, SW480 cell line, p21^{Cip1/WAF1}, chromosome anomalies, DNA repair

All correspondence should be addressed to:

Dr. Régen Drouin

Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS),

Hospital Fleurimont,

3001, 12th Avenue North

Sherbrooke, Quebec

Canada J1H 5N4.

Tel.: (819) 820-6827

Fax: (819) 564-5217

Email: Regen.Drouin@USherbrooke.ca

4.2.1 Résumé (anglais)

During certain types of cellular stress, the p53 tumor suppressor protein binds to DNA and transactivates a variety of genes that regulate critical responses including apoptosis, cell cycle checkpoints, differentiation, and angiogenesis. In addition, functional p53 is known to be required for efficient nucleotide excision repair (NER) of bulky DNA adducts generated through exposure to environmental mutagens such as UV light. Nonetheless, we previously showed that the model *p53*-mutated human adenocarcinoma strain SW480 is proficient in the removal of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) via NER. We undertook the present study to begin probing the molecular basis for this unexpected repair phenotype. Cytogenetic analysis indicated that SW480 is stable at the chromosomal level, i.e., manifests a karyotypic profile very similar to that revealed for this line as far back as 14 years ago. After fluorescence *in situ* hybridization (FISH), using a probe complementary to the *p53* gene, we found that 98% of the SW480 interphase nuclei contains three copies of the gene, later revealed to be localized on intact short arms of three chromosomes 17. DNA sequence analysis further showed that all three *p53* copies in SW480 carry two point mutations (R273H and P309S), and levels of the corresponding mutated p53 protein are about 20-fold higher than in the closely-related *p53* wild-type strain LoVo. Using an electrophoretic mobility shift assay (EMSA), we demonstrated that R273H/P309S p53 is able to bind with wild-type affinity to its consensus DNA sequence *in vitro*. Analysis of p21^{Cip1/WAF1} expression and *in vivo* footprinting by ligation-mediated PCR (LMPCR) showed that, in wild-type LoVo cells, an exposure to cellular stress (eg., UV or ionizing radiation) is necessary for p53 activation of the p21^{Cip1/WAF1} promoter. In contrast, the R273H/P309S-mutated p53 protein in SW480 constitutively activates p21^{Cip1/WAF1} in the absence of stress through an unknown mechanism. A similar phenomenon whereby mutated *p53* in SW480 is able to induce NER-related proteins might explain the normal DNA repair phenotype previously observed in this strain. For now we conclude that, in general, results obtained using SW480 as a p53-deficient cell line should be interpreted very cautiously.

4.2.2 Introduction

The p53 protein was first described as a protein associating with the Simian Virus 40 DNA tumor virus large T antigen.^{1,2} In the same year, p53 was also described as a transformation-related protein.³ The p53 protein has the classical architecture of a sequence-specific transcription factor and is composed of three basic domains, i.e. an acidic N-terminus containing a transactivation domain, an hydrophobic central core that binds to specific DNA sequence, and a basic C-terminus oligomerization and regulation domains. The *p53* gene is frequently mutated in sporadic cancer (UMD-p53 database at <http://p53.curie.fr>).⁴ Most of the mutations identified to date cluster in the DNA-binding domain, indicating that this particular function is crucial for the capacity of p53 to act as a tumor suppressor gene (UMD-p53 database at <http://p53.curie.fr>).⁴ P53-deficient mice are highly susceptible to tumor development, although p53 deficiency does not affect normal development.⁵

Different types of cellular stimuli such as ionizing radiation, UV light, carcinogens (polycyclic aromatic hydrocarbons, mycotoxins, cadmium), oxidative/nitrosative stresses (H₂O₂, nitric oxide donors), cytotoxic drugs (such as platinum compounds, alkylating agents, methotrexate, and mytomicin C) and other agents can activate p53.⁶ Once activated, p53 mediates coordinated antiproliferative influences, including effects on the cell cycle, apoptosis, differentiation, and angiogenesis.⁷ As a genome guardian, p53 activates a cell cycle block in response to DNA damage in order to allow time for cells to repair the damage. This block is mediated via p21^{Cip1/WAF1}, RB and other cell cycle effectors. If the extent of damage is too great, p53 will induce apoptosis. Otherwise, p53 will activate DNA repair. More precisely, p53 accelerates nucleotide excision repair (NER) of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD). Ford and Hanawalt showed, in 1995 and 1997, that a deficiency in p53 leads to a delay in the repair of the entire genome (GGNER), but not in the repair of the transcribed strand of active genes (TCNER).^{8,9} On the other hand, in 1999, Therrien et al showed that a p53 deficiency induces a delay in the repair of both TCNER and GGNER.¹⁰

In a previous study, we compared repair of UV-induced CPD in the SW480 cell line and the LoVo cell line, derived from a colorectal adenocarcinoma.¹¹ The SW480 cell line was derived from a Duke's colon adenocarcinoma that was removed from a 50-year-old male patient.¹² The cell line was submitted to the American Type Culture Collection (ATCC) at passage 91 by Leibovitz in November, 1978. SW480 is one of the best characterized of the large number of established colon cancer cell lines. Indeed, in addition to the basic characterization described in the original paper¹², numerous biochemical and genetic properties of this cell line have been reported. These include the production of plasminogen activator and inhibitors¹³, of transforming growth factor β (TGF- β) and its receptor¹⁴, and of platelet-derived growth factor (PDGF)¹⁵, the ability to bind collagen via non-integrin-like receptors¹⁶, a point mutation in codon 12 of the *c-K-ras* gene¹⁷, *c-myc* amplification¹⁸, loss of the *APC* gene on chromosome 5¹⁹ and point mutations in codons 273 and 309 of the *p53* gene²⁰. In addition to these characteristics, we found that SW480 cells can remove UV-induced CPD at rates comparable to those of other tumor cell lines (HCT116 and LoVo) on both the transcribed and non-transcribed strands (TS and NTS, respectively) of active genes.^{11,21} These results clearly indicate that SW480 cells are proficient for both NER pathways, i.e. TCNER and GGNER. A study recently conducted by Lee et al. using exactly the same cell lines, but totally different experimental approaches, reached the same conclusion concerning repair of CPD in SW480 cells.²¹

Mutations in *p53* generally have a dominant negative effect regarding the function of the p53 protein.²²⁻²⁸ The SW480 are considered functionally p53-deficient because there are two point mutations (R273H and P309S) in the gene resulting in an abnormal p53 protein. Indeed, these two missense mutations change the amino acid arginine for histidine at the codon 273 and the amino acid proline for serine at codon 309. Many studies supported this p53 deficient phenotype and many investigators are still using the SW480 cell line as a p53-deficient cell line.²⁹⁻³⁶ However, as mentioned above, p53 is essential for at least GGNER and perhaps also for TCNER. Therefore, the normal repair rates observed

in the SW480 are in contradiction with a p53 deficiency. How can a p53-deficient cell line be p53-proficient for NER? Are there other functions that this mutant p53 can fulfill? In this work, we first characterized SW480 at the cytogenetic level to determine whether these cells are chromosomally stable. We also determined the *p53* mutation status in the SW480 cell line. Finally, we investigated if this double-mutant p53 protein can perform at least some of the normal functions of wild-type p53.

4.2.3 Matériel et Méthodes

Cells and culture conditions

SW480 (CCL-228) and LoVo (CCL-229) colon adenocarcinoma cell lines were purchased from the ATCC (Manassas, VA, USA). SW480 cells were maintained in McCoy's 5A medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), plus 1% antibiotics (penicillin/streptomycin). The LoVo cell line was cultured in DMEM Nut-mix F-12w/Gut-1 supplemented with 10% FBS plus 1% antibiotics. LF041 (a gift of Dr. Tainsky, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS plus 1% antibiotics. LF041 cells have lost one p53 allele and carry a frameshift mutation at codon 184 in the remaining copy, so that they are totally p53 deficient.

G-Band Karyotype (GTG banding)

Metaphase spreads were prepared from exponentially growing cells that had been treated with 0.25 µg/µL of Colcemid (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) for 15 minutes. The cells were then harvested, treated with sodium citrate 0.75% for 21 minutes and fixed using a mixture of methanol and acetic acid (3:1 v/v). Slides were G-banded using Trypsin and Giemsa staining.⁶³ Karyotypes were prepared using Ikaros (MetaSystems, Altlußheim, Germany) software and then the chromosome anomalies were recorded according to the standard International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995.⁶⁴

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

We performed FISH on metaphases and interphase nuclei using commercially available probes for p53 (17p13.1) (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) and Smith-Magenis (17p11.2) combined to Miller-Dieker loci (17p13.3) (Cytocell Technologies, Cambridge, UK). The FISH procedure was performed according to the manufacturer's

protocol, except for the denaturation step that was carried out at 76°C for 7 minutes. The image analysis system ISIS (MetaSystems, Altussheim, Germany) was used to document the results.

Primed *in situ* labeling (PRINS)

In combination with FISH when used to investigate the p53 status, a PRINS reaction was carried out to detect chromosome 17 centromere according to our standard protocol.^{65,66} Oligonucleotide primers specific for the chromosome 17 centromere (5' ACT TGA ACT TTG AAA GGA AAG TTC AAC TCG GGG AT)⁶⁷ were custom synthesized by the Laval University facilities. For each slide, the PRINS reaction solution was made by mixing 4 µL of each 2.5 µM dATP, dCTP and dGTP, 4 µL of 0.25 µM dTTP (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Québec, Canada), 1 µL of 1 mM Bio-11-dUTP (Enzo, New York, NY, USA), 4 µL of 2.5 µM primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (Roche Molecular Biochemicals), 5 µL of 10X PCR buffer (Roche Molecular Biochemicals) and distilled water for a total volume of 50 µL. After slides were denatured in 70% Formamide/2X SSC at 71°C for two minutes, dehydrated in a cold (-20°C) ethanol series and air-dried, they were transferred to a flat block for microscope slides of the thermocycler (PTC-100, MJ Research, Scarborough, Ontario, Canada) at 62.5°C for three minutes. The PRINS reaction solution was then added to each slide. The primer annealing and extension was performed at 62.5°C for five minutes and then at 72°C for five minutes. The reaction was stopped by immersing the slides in PBS 1X. For signal detection, the slides were mounted with 50 µL of blocking buffer (4X SSC/5% skimmed milk) for five minutes. After draining the blocking buffer of the slides, 50 µL of 1% fluorescein-avidin DCS (Vector Laboratories) in the blocking buffer was applied onto the slide. The slides were incubated in a moist chamber at 37°C for one hour and then washed in washing buffer (4X SSC/1% tween) five minutes at room temperature and counterstained with DAPI.

Multicolor-Fluorescence *in situ* Hybridization (m-FISH) Karyotype

Slides for m-FISH were prepared as for G-Banding karyotype. The m-FISH procedure was performed using commercially available probes (MetaSystems, Altussheim, Germany) according to the protocol of the manufacturer. Analysis was done on an Olympus (equipped with filters for DAPI, FITC, Texas Red, Cy3, Cy5, and DEAC) using ISIS software (MetaSystems, Altussheim, Germany).

Restriction enzyme assay

The principle of the assay used in this work is illustrated in Figure 3(a). Briefly, by PCR amplification, we generated a 304-bp DNA fragment that includes codons 273 and 309 of the p53 gene. The following primers were used for this amplification: “5’ CTG CCT CTT GCT TCT CTT TTC C” and “5’ GGT TTC TTC TTT GGC TGG GG”. This 304-bp DNA fragment was then cleaved with either the NSP I (New England BioLabs), or HpyCH4 III restriction enzymes (New England BioLabs), or both enzymes. NSP I cleaves the DNA fragment only if the transition mutation G→A is present in codon 273 to give two fragments (70 and 234 bp) whereas HpyCH4 III cleaves the same DNA fragment only if the transition mutation C→T is present in codon 309 to give two fragments (≈43 and ≈263 bp). If both enzymes are used and both mutations are presents, three fragments are generated, i.e. ≈43, 70, and ≈192 bp. The DNA fragments are separated on a non-denaturing agarose gel

Western blots

For Western blot analyses of p53 and p21^{Cip1/WAF1}, protein extracts were prepared, separated by SDS-PAGE, transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore), and reacted with either mouse anti-p53 (OP43L, clone D0-1) antibodies (Ab) (Oncogene Research, Darmstadt, Germany) at a final concentration of 0.1 µg/mL, or mouse anti-p21^{Cip1/WAF1} Ab (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) diluted at 1/500. A horse

anti-mouse IgG Ab coupled to horseradish peroxidase (Vector Labs, Burlington, Ontario, Canada) was applied and after washes detected with a Western Blot Chemiluminescence Reagent kit from NEN (Montreal, Quebec, Canada).

For p21^{Cip1/WAF1} induction, prior to the preparation of protein extracts, cells were irradiated with either 400 J/m² of UVB or 20 Grays of ionizing radiation and harvested at different time periods (0 to 24 hours). The UVB source consisted of two fluorescent tubes (FS20T12/UVB/BP, Phillips) delivering a dose rate of 3.39 J/m²/second, which was filtered through a sheet of cellulose acetate to eliminate wavelengths below 290 nm (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch; Eastman-Kodak Co.).

Immunofluorescence

Cultured cells were grown directly on slides. They were then fixed with paraformaldehyde 4% 20 minutes at room temperature and with methanol for six minutes at 4°C. For signal detection, blocking agent (5% BSA in PBS) was applied on slides for one hour. For p53 detection, we used a mouse anti-p53 (OP43L, clone D0-1) Ab (Oncogene Research, Darmstadt, Germany) diluted 1/100 in 1% BSA for one hour at room temperature. To reveal the anti-p53, an anti-mouse Ig-Fluorescein (Roche Applied Science) diluted 1/100 in 1% BSA was used. Slides were counterstained with DAPI.

Ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR)

Prior to the LMPCR procedure, cells were exposed to 20 Grays of ionizing radiation and harvested after different time periods post-stimulation (from 0 to 8 hours). The LMPCR procedure was conducted as previously published.⁶⁸⁻⁷¹ The upper strand of the p21^{Cip1/WAF1} promoter including the consensus p53 binding site located approximately at -2.2 kb upstream from the transcription initiation site was analyzed using primer p21-4 (5'AGG

TTT ACC TGG GGT CTT TA) and primer p21-5 (5' GGG GTC TTT AGA GGT CTC CTG TCT CCT A).⁴¹ Footprints were revealed using 750 J/m² of UVC. The procedure for UV footprinting has been previously described.^{68,72} Sequence markers (G, A, T+C and C) were obtained by cleavage of DNA from normal lymphoblasts using standard Maxam-Gilbert cleavage reactions (Drouin, 2001 #43) and further amplified by LMPCR.

Electrophoretic Mobility SuperShift Assay (Supershift EMSA)

Crude nuclear extracts were prepared as described previously (^{73,74}) and conserved in small aliquots at -80°C until use. Supershift experiments in EMSA were carried out using a 26-bp DNA fragment that bears two consensus binding sites for p53 (underlined) (5' AGC TTA GGC ATG TCT AGG CAT GTC TA) and 5' end-labeled prior to its use as labeled probe. Approximately 3 x 10⁴ cpm labeled DNA was incubated with crude nuclear extracts in the presence of 500 ng of poly(dI-dC)·poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech) in buffer D (5mM HEPES (pH 7.9), 10% glycerol (v/v), 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.125 mM phenyl methosulfonyl fluoride). When indicated, 2.5 µL (corresponding to 250 ng) of an anti-p53 (OP03L, clone Pab421) Ab (Oncogene Research, Darmstadt, Germany) directed against C-terminal (epitope within amino-acids 371 and 380) portion of the p53 protein was added to the reaction mixture. The mix was incubated 15 minutes at room temperature and the DNA/protein/anti-p53 Ab complexes separated by gel electrophoresis through 4% polyacrylamide gels against Tris glycine buffer as described.⁷⁵ Formation of DNA/protein/anti-p53 Ab complexes was revealed following autoradiography at -80°C.

4.2.4 Résultats

Cytogenetic characterization of the SW480 cell line

In contrast with the ATCC statement that the SW480 cell line is hypotriploid, we observed that the cell line is hyperdiploid with a modal number of 56 chromosomes (range: 52 – 58), established from counting 60 metaphase spreads. The combination of the multicolor fluorescence *in situ* hybridization (m-FISH) technique and the G-bands by trypsin using Giemsa staining (GTG) banding technique led to the complete identification of all rearranged chromosomes (Figure 1(a) and (b)). Sixteen clonal chromosome alterations were found in almost all cells analyzed (numbered “1” to “16” in Table 1). Despite the male origin of the cell line, no Y chromosome was found, whereas two X chromosomes were present. In 39 of the 40 metaphases analyzed by GTG banding and m-FISH, three normal copies of the chromosome 17 were present.

Copy number of p53 gene and integrity of the short arm of chromosome 17

Different *in situ* labeling reactions were performed in order to assess the integrity of the short arm of the chromosomes 17. First, a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) study using a probe specific for *p53* (17p13.1) was performed in combination with primed *in situ* labeling (PRINS) using a chromosome 17 centromere primer on SW480 metaphase preparations (Figure 2). In 698 nuclei analyzed, 97.6% of the nuclei showed three hybridization signals corresponding to the *p53* gene. In every metaphase analyzed, one *p53* signal co-localized with a centromeric signal on each chromosome 17. Moreover, DNA probes specific for the Smith-Magenis syndrome (17p11.2) locus and the Miller-Dieker (17p13.3) syndrome locus were hybridized using the FISH technique on the metaphase preparations (data not shown). No abnormal hybridization signal pattern was observed, indicating that the short arm in the three copies of the chromosome 17 is probably structurally intact.

The mutation status of the three p53 alleles

The DNA sequence of the p53 gene from SW480 cells and normal human male lymphoblasts was determined by direct sequencing (Figure 3(a)). SW480 is homozygous for both predicted missense mutations at codon 273 and 309 of *p53* gene. A G→A transition in codon 273 leading to an amino acid change from arginine to histidine in the p53 protein was found. At codon 309, a C→T transition codes for a serine instead of a proline in the p53 protein of SW480 cells.

To confirm the sequencing results and the presence of both mutations in all three copies of the gene, an assay using restriction enzymes was designed (Figure 3(b)). A 304-bp DNA fragment that includes codons 273 and 309 of the *p53* gene was generated by PCR amplification. This 304-bp DNA fragment was then cleaved with either NSP I or HpyCH4 III or both restriction enzymes. The restriction enzymes will cleave the PCR amplified DNA fragment containing codons 273 and 309 only if the mutations R273H for NSP I and P309S for HpyCH4 III are present. As expected, an amplified DNA fragment from normal human lymphoblasts was not cleaved by NSP1, HpyCH4 III or by the combination of both enzymes (figure 3(c)). The DNA fragment from SW480 was cleaved by NSP1, HpyCH4 III and by the combination of both enzymes. No intact 304-bp DNA fragment was produced by any of the three restriction enzyme combinations, confirming that there is no wild-type copy of the *p53* gene in SW480 cells. In addition, using both enzymes, no restriction fragments of 234-bp or 262-bp were present, indicating that all three copies of *p53* present in the SW480 cell line contain both mutations, in agreement with our sequencing results.

Expression and distribution of the p53 protein

The amount of double-mutant p53 protein in SW480 was determined using western blotting and compared with LoVo and LF041 (Figure 4). LoVo cells originate from a colorectal cancer, like SW480, but express normal, wild-type *p53* alleles and were therefore used as a positive control. In contrast, LF041 cells, which were used as a negative control, are totally deficient in p53 expression resulting from the loss of one allele of *p53* and a

frameshift mutation at codon 184 in the remaining copy. As depicted in Figure 4, approximately 1.5 μg of total protein extract from SW480 was sufficient to produce the same signal as 30 μg of protein extract from LoVo cells. Thus, the level of p53 in the SW480 cell line is 20-fold higher than in p53 wild-type LoVo cells. No p53 could be detected in the LF041 cell line.

An immunofluorescence reaction using an anti-p53 antibody (Ab) was carried out on SW480, LoVo and LF041 cells to evaluate the p53 content in individual cells (Figure 5). No p53 was detected in LF041 cells (Figure 5 (e) and (f)). As observed by western blot analysis (Figure 4), the level of the p53 protein in SW480 cells is much higher than in LoVo. However, a very heterogeneous cellular distribution and concentration of the p53 protein was observed in SW480 cells. Some cells showed a highly nuclear p53 distribution whereas in other cells the protein was mainly localized in the cytoplasm. The amount of p53 observed by western blotting or by immunofluorescence was considered the basal level as no damaging agents (UV or ionizing radiation) were used.

The double-mutant p53 protein can induce p21^{Cip1/WAF1} expression

Usually, cells that undergo G1 arrest after exposure to stress (such as UV radiation) show an increase in p21^{Cip1/WAF1} expression that is due, at least in part, to a p53-dependent induction.³⁷⁻⁴⁰ Two consensus p53-binding sites have been described in the p21^{Cip1/WAF1} promoter and are thought to participate in its induction.^{40,41} We therefore examined whether the double-mutant p53 protein could stimulate p21^{Cip1/WAF1} expression in SW480 cells. Western blot analyses using Ab specific for p21^{Cip1/WAF1} were conducted on proteins extracted from SW480, LoVo and LF041 cells after specific stimulation with damaging agents, such as UV light (Figure 6) and ionizing radiation (data not shown) at different periods of time. As shown in Figure 6, the level of p21^{Cip1/WAF1} protein increased to reach a peak 12 to 24 hours post-UV irradiation in LoVo cells (p53 +/+). As expected, in LF041 cells (p53 -/-), the stimulation with the damaging agent did not induce the long-term

production of p21^{Cip1/WAF1} protein; however, a small induction of p21^{Cip1/WAF1} protein in LF041 cells at 3 and 6 hours post-stimulation was observed. This signal is believed to result from the p53-independent stimulation of p21 which, in the case of UV irradiation is known to be weaker and is not maintained as long as the p53-dependent induction.⁴² Interestingly, in SW480, no stimulation was required to reach a level of p21^{Cip1/WAF1} protein as high as that detected in LoVo cells after 24 hours. Therefore, the level of p21^{Cip1/WAF1} in SW480 cells appears to be constitutively high.

***In vivo* DNA analysis of the p21^{Cip1/WAF1} gene promoter**

In order to better understand the regulatory mechanism that account for the constitutively high level of p21^{Cip1/WAF1} protein in SW480 cells, we conducted an *in vivo* DNA-protein interaction analysis by ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) along the promoter sequence of the *p21^{Cip1/WAF1}* gene (Figure 7). In SW480 cells, a positive footprint (asterisk in Figure 7) was observed without exposure to ionizing radiation. A positive footprint occurs when the signal generated by the footprinting agent at a precise site is higher in DNA damaged in a cellular context versus in naked DNA (identified as “t” in Figure 7). A positive footprint results from particular secondary DNA structures leading to a hypersensitivity of a specific DNA region for the footprinting agent. However, in LoVo cells (*p53*^{+/+}), between 2 and 4 hours following induction by ionizing radiation are necessary for the footprint to appear in the p21^{Cip1/WAF1} gene promoter. This footprint is not present in the LF041 cell line (*p53*-null), suggesting that it is related to p53. This correlates with western blot analysis showing that in SW480 cells there is a high basal expression of p21^{Cip1/WAF1} independent of the ionizing radiation treatment.

Binding of the double-mutant p53 protein to its consensus DNA sequence

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments were conducted *in vitro* to address whether the double-mutant p53 protein can indeed bind to p53 target sites. Total protein extracts from SW480, LoVo and LF041 were incubated with a 5'-end labeled,

double-stranded oligonucleotide bearing the consensus sequence recognized by p53⁴³ with or without addition of a monoclonal Ab directed against the p53 protein (Figure 8). Usually, no Ab is required in order to promote formation of DNA-protein complexes in EMSA. However, human p53 has been reported to bind its DNA target site only weakly, but the further addition of a monoclonal Ab directed against an epitope near the C-terminus has been shown to activate the cryptic DNA binding activity of p53 stoichiometrically.⁴⁴ Without addition of this specific p53 Ab, it would be very difficult to demonstrate the binding of this nuclear protein to its putative target sites by EMSA.

Incubation of 20 µg total protein extract from p53 proficient LoVo cells with the p53 labeled probe led to the formation of a supershifted complex upon addition of the p53 Ab (Figure 8). When compared to the intensity of the p53-related signal, the intensity of the p53-independent signal can be considered strong. However, the most intense signal was generated by the non-bound radioactivity (free probe). To achieve a good separation of the high-molecular weight p53 complex from the p53-independent band, we ran the gel for a longer time and the free radioactivity ran out of the gel (Figure 8). These results indicate that p53 protein from LoVo cells is in an appropriate configuration to bind its putative target sites in DNA. When the extract from SW480 cells was used, only 5 µg of total proteins were required to yield a p53 supershifted complex of a strength similar to that obtained with 20 µg proteins from LoVo cells. As expected, no supershift is observed in LF041, the p53-null cells. We therefore conclude that the double-mutant p53 protein from SW480 cells is expressed to a level higher than that seen in LoVo cells and that it binds DNA as efficiently as in wild-type p53 expressing cells.

4.2.5 Discussion

P53 act as a stress sensor. After cell damaging, p53 activates different cellular mechanisms, including DNA repair. The colorectal adenocarcinoma SW480 cells, are normal regarding the repair of UV-induced CPD in spite of the fact that they bear two point mutations in their *p53* gene (R273H and P309S). The SW480 cell line has numerous chromosomal alterations and possesses 3 chromosomes 17 in which 3 copies of a double-mutated *p53* is present. The resulting double-mutated protein is over-expressed in those cells and still retained its ability to bind his consensus sequence *in vitro*. The p21 protein, an effector of p53 after a cellular stress, is constitutively expressed in SW480. A positive footprint is always present on the promoter of *p21* in living SW480 cells.

Cytogenetic characterization of the SW480 cell line

Modal chromosome number and chromosome anomalies found by m-FISH and G-banded karyotyping are consistent with those found by other investigators (see Table 1), showing that SW480 chromosomal alterations are genetically stable, thus arguing that our cell line is very similar to the SW480 used by other investigators. The m-FISH analysis allowed us to identify precisely the inter-chromosomal rearrangements, whereas the GTG-banding analysis enabled us to detect some intra-chromosomal anomalies. Some rearrangements remained unclear, and other anomalies were not detected by previous studies.⁴⁵⁻⁴⁸ We believe this might be due to the complexity of the rearrangements and by the fact that these authors used only one technique to solve the SW480 karyotype, i.e. spectral karyotyping (SKY)⁴⁸ or GTG banding⁴⁵⁻⁴⁷. We used the combination of m-FISH and GTG banding on chromosomes, leading to a complete identification of all aberrations (Figure 1(a) and (b)). For example, anomaly “2” (inv(2)(q23;q34)) was previously identified as t(2;18)(q21;q11)⁴⁵, t(2;1)(q37;q13)⁴⁶ or t(2;3)(q24;q21)⁴⁷. This anomaly could not have been identified only by the SKY technique.⁴⁸ Also, the t(10;12)(p13;q12) found by Gagos⁴⁷ and the t(10;3)(p13;q21) described by Melcher⁴⁸ are now known to be a t(3;10;12)(3qter→3q21::12?::10p15→10q26::10q24→10qter). Finally, an alteration on chromosome 19 was found by Yaseen et al⁴⁵, Tomita et al⁴⁶ and Gagos et al⁴⁷, but they

could not identify the origin of the translocated material. Melcher et al⁴⁸ first identified the rearrangement as a complex four ways translocation (t(19;8;19;5)). After FISH using specific chromosome painting (data not shown), m-FISH and G-banding, we are finally able to describe the derivative as a t(5;8;19)(19pter→19q13.1::8?::19q13.2→19q13.3::5q34→5qter).

Copy number and mutation status of p53 on the short arm of chromosome 17

The *p53* gene is located on the short arm of chromosome 17 (17p13.1). Three copies of the normal chromosome 17 were found in almost all metaphase spreads analyzed by m-FISH and GTG. Using a combination of FISH and PRINS technique, we showed that 97.6% of all SW480 cells contain three copies of the *p53* gene that each mapped to the short arm of one chromosome 17. The SW480 cell line is known to bear mutations in codons 273 and 309 of the *p53* gene. Prior to the present study, it has not been known whether these two mutations are present on two separate alleles, resulting in to a compound heterozygote, or whether all three alleles bear both mutations.

Based upon the sequencing and a restriction enzyme assay, we found that all three *p53* alleles in SW480 contain both mutations at codons 273 and 309. No wild-type allele was present in SW480 cells. An hypothesis that may explain these two mutations on each of the three alleles is that during the tumorigenic process, one normal allele was eliminated while the double-mutated allele was triplicated. This probably conferred a proliferative advantage.

Expression and distribution of p53 protein

The high level of p53 protein we observed in SW480 cells is consistent with previous observations.⁴⁹ Under normal conditions, the amount of p53 protein is maintained at low levels by protein degradation in order to prevent apoptosis and cell cycle arrest.⁵⁰

Following a cellular stress, this degradation is reduced and the amount of p53 increases.⁵¹⁻⁵⁴ Certain mutations in the p53 protein is prevented from degradation and the level is constitutively high.⁵⁵⁻⁵⁷

Immunofluorescence analyses provided further evidence that there is indeed much more of the double-mutant p53 protein in SW480 cells than in wild-type LoVo cells. These experiments also revealed that the distribution of p53 in individual cells is very heterogeneous in the SW480 cell line. Some cells showed a very high nuclear concentration of p53 while others had a very high cytoplasmic concentration. In normal proliferating cells, the p53 protein is shuttled between the nucleus and the cytoplasm.⁵⁸ After a stress, like exposure of the cells to UV light, p53 is stabilized and accumulates in the nucleus.⁵⁹

The double-mutant p53 protein can induce p21^{Cip1/WAF1} expression

Although SW480 cells bear R273H and P309S mutations in the *p53* gene, they display a normal excision repair of CPD in the context of an adenocarcinoma cell line.^{11,21} The P309S mutation is not documented and was never found alone in cancer. This mutation might be of a lesser significance as it is not in any important or conserved domain of *p53*. On the other hand, the R273H mutation is of particular interest, since codon 273 of *p53* is one of the most frequently mutated codon in cancer (UMD-p53 database at <http://p53.curie.fr>). This codon belongs to the sequence-specific DNA binding domain (codons 102 to 292). The R273H mutant *p53* is known to adopt the native conformation of the protein and still possesses a residual transcriptional activation.⁶⁰ By an *in vitro* technique, Johnsson et al have shown that the stability of the DNA/*p53*-codon 273 mutated protein complex can be compared with that of the wild-type p53 protein.⁶¹ Furthermore, our group has shown that as for p53 wild-type LoVo cells, a tetraploid G1 arrest was observed after exposure of the cells to the mitotic inhibitor nocodazole in R273H mutant clone.²⁸ Other mutant clones (R175H and V143A) analyzed failed to undergo this G1 arrest.²⁸ Also,

p21^{Cip1/WAF1} induction and hypophosphorylation of pRB was revealed after the exposure to nocodazole in wild-type LoVo and R273H mutant clone.²⁸

As mentioned earlier, p21^{Cip1/WAF1} is known to be a critical downstream effector in the p53-specific pathway after a stress.³⁷⁻⁴⁰ To verify the functionality of the p53 double-mutant protein in SW480, we investigated the capacity of the p53 double-mutant to activate the transcription of p21^{Cip1/WAF1} following induction by a UV stress.

***In vivo* DNA analysis of the promoter region of the p21^{Cip1/WAF1} gene and its recognition by the mutated p53 protein**

In LoVo cells, a positive footprint appeared from 2 to 8 hours post-stimulation by ionizing radiation. In SW480 cells, the same positive footprint was always present at all post-irradiation times (0 to 8 hours). A strong positive footprint (signal *in vivo* higher than the corresponding signal *in vitro*) usually corresponds to a special structure in DNA that hyper-sensitizes the region to damaging agents. This footprint is located about 18 nucleotides outside the consensus binding sequence of p53 on the p21^{Cip1/WAF1} promoter and could not be detected by *in vivo* DNaseI footprinting (data not shown). It is noteworthy that p53 is very difficult to footprint on the promoter of its effector genes. Only one group has been able to footprint p53 on different genes by using a cell line (the ML1 cell line) that overexpresses p53 and is very sensitive to induction of p53 in response to ionizing radiations.⁴¹ The footprint shown on Figure 7 can only be interpreted as a particular secondary structure of DNA, indirectly related to the functions of p53 on p21^{Cip1/WAF1}. However, considering that the footprinting of p53 on its effector gene is particularly difficult to show, it is not because we did not find a footprint that there is no interaction between p53 and the p21^{Cip1/WAF1} promoter. Considering that the *in vivo* footprint is not present in LF041 cells, we can conclude that it is linked to p53.

Through EMSA experiments, we provided evidence that the p53 double-mutant expressed in SW480 cells indeed can bind the p53 consensus sequence *in vitro* as efficiently as wild type p53.

These results are in agreement with the p21^{Cip1/WAF1} western blotting analyses. We speculate that the level of p21^{Cip1/WAF1} protein is always high in SW480 cells primarily because there is always a high level of active proteins acting on the promoter of p21^{Cip1/WAF1}. This constitutive activity of the p53 protein on the promoter of p21^{Cip1/WAF1} gene leads to a constitutive stimulation in the production of the p21^{Cip1/WAF1} protein. The high level of p21^{Cip1/WAF1} protein should stop the cycling of the SW480 cells. Since the SW480 cells keep cycling at a relatively high rate, we can speculate that the SW480 cells developed a way to get round this block.

Another mechanism may explain the activation of p21^{Cip1/WAF1} by p53. As reported by Zhan et al, in 1998, p53 can act via protein/protein interaction to activate its effector genes. For example, p53 did not bind directly to the GADD45 promoter, but interacted with WT1 which in turns strongly activates GADD45 through binding to the DNA.⁶² In our case, the mutated p53 protein, like wild-type p53, may bind another protein which in turn activates p21^{Cip1/WAF1}, or other genes of the DNA repair system, as a transcription factor. This hypothesis is reinforced by the fact that the two mutations found in the p53 protein expressed by SW480 cells (R273H and P309S) are not in the protein binding domain of p53. More work has to be done to elucidate this phenomenon.

A recently published paper²¹ studying the repair rate of CPD on UV-irradiated plasmids transfected into adenocarcinoma cell lines showed that, in contrast to the LoVo cell line, no prior stimulation with UV radiation is necessary to enhance NER in the SW480. This means that the mutated p53 in SW480 cells does not require to be stimulated by stressing agents to generate an effect on DNA repair, in contrast to wild-type p53 cell

lines. This is in concordance with the high level of p21 protein found in SW480 cells in the absence of ionizing radiation or UV stimulation. This level could only be reached 12-24 hours post-stimulation in LoVo cells, therefore suggesting that the mechanism by which the double-mutated p53 in SW480 is able to enhance p21 levels without stimulation is probably the same as that used to stimulate DNA repair of UV-induced CPD.

It will be important to elucidate the mechanism by which this mutated p53 protein can induce its effector genes as the SW480 cell line has often been used as a cellular model that expresses a mutated, non-functional p53 protein (ex: ²⁹⁻³⁶ ...), which clearly is not the case . The present study shows that a cell line expressing a mutated p53 protein is not necessarily a non-functional p53 cell line. The mechanism by which this double-mutated p53 retains at least some of its functions. Consequently, results obtained using the SW480 as a p53-deficient cell line should be interpreted very cautiously.

4.2.6 Abréviations

Ab	:	Antibody
ATCC	:	American Type Culture Collection
bp	:	Base Pair
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CPD	:	Cyclobutane Pyrimidine Dimers
EMSA	:	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FBS	:	Fetal Bovine Serum
FISH	:	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
GGNER	:	Global-Genomic NER
GTG	:	G-bands by Trypsin using Giemsa staining
LMPCR	:	Ligation-Mediated PCR
m-FISH	:	Multicolor Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
NER	:	Nucleotide Excision Repair
NTS	:	Non-Transcribed Strand
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PRINS	:	Primed <i>In Situ</i> labeling
RB	:	Retinoblastoma
SKY	:	Spectral Karyotyping
T4 endoV	:	T4 UV endonuclease V
TCNER	:	Transcription-Coupled NER
TS	:	Transcribed Strand
UVB	:	Ultraviolet of type B
UVC	:	Ultraviolet of type C
XPC	:	Xeroderma pigmentosum complementation group C

4.2.7 Remerciements

The authors are grateful to M. Marc Bronsard for valuable technical assistance and to Dr. Darel Hunting for critical review of the manuscript. The authors are also grateful to Dr R. Stephen Lloyd and Dr Tim R. O'Connor for supplying T4 endonuclease V and photolyase, respectively. This work was supported by a grant from the National Cancer Institute of Canada (NCIC) (with funds from the Canadian Cancer Society and the Terry Fox Run) to R.D. P.J.R. holds a Doctoral Research Award from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Hospital St-François d'Assise Research Center contributed to this award. R.D. and S.L.G. are research scholars (Senior and National levels, respectively) from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). R.D. holds a Canada Research Chair in « Genetics, Mutagenesis and Cancer ».

4.2.8 Références

1. Lane, D. P. & Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-3.
2. Linzer, D. I. & Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
3. DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W. & Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2420-4.
4. Hainaut, P. & Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137.
5. Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. & Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-21.
6. Pluquet, O. & Hainaut, P. (2001). Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* 174, 1-15.
7. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-10.
8. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8876-80.
9. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997). Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem* 272, 28073-80.
10. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C. & Drobetsky, E. A. (1999). Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15038-43.
11. Rochette, P. J., Bastien, N., McKay, B. C., Therrien, J. P., Drobetsky, E. A. & Drouin, R. (2002). Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes hMLH1 or hMSH2 are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Oncogene* 21, 5743-52.
12. Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C. & Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-9.

13. Quax, P. H., van Leeuwen, R. T., Verspaget, H. W. & Verheijen, J. H. (1990). Protein and messenger RNA levels of plasminogen activators and inhibitors analyzed in 22 human tumor cell lines. *Cancer Res* 50, 1488-94.
14. Coffey, R. J., Jr., Goustin, A. S., Soderquist, A. M., Shipley, G. D., Wolfshohl, J., Carpenter, G. & Moses, H. L. (1987). Transforming growth factor alpha and beta expression in human colon cancer lines: implications for an autocrine model. *Cancer Res* 47, 4590-4.
15. Anzano, M. A., Rieman, D., Prichett, W., Bowen-Pope, D. F. & Greig, R. (1989). Growth factor production by human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res* 49, 2898-904.
16. Pignatelli, M. & Bodmer, W. F. (1989). Integrin-receptor-mediated differentiation and growth inhibition are enhanced by transforming growth factor-beta in colorectal tumour cells grown in collagen gel. *Int J Cancer* 44, 518-23.
17. Capon, D. J., Seeburg, P. H., McGrath, J. P., Hayflick, J. S., Edman, U., Levinson, A. D. & Goeddel, D. V. (1983). Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 304, 507-13.
18. Suarez, H. G., Nardeux, P. C., Andeol, Y. & Sarasin, A. (1987). Multiple activated oncogenes in human tumors. *Oncogene Res* 1, 201-7.
19. Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P. & et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342, 705-8.
20. Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. & Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253, 665-9.
21. Lee, D. F., Drouin, R., Pitsikas, P. & Rainbow, A. J. (2004). Detection of an involvement of the human mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells. *Cancer Res* 64, 3865-70.
22. Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y. & et al. (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-21.
23. Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R. & Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-80.
24. Milner, J. & Medcalf, E. A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65, 765-74.

25. Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1992). Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256, 827-30.
26. Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y. A., Hao, Z. M. & Chang, E. H. (1993). Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res* 53, 4452-5.
27. Hann, B. C. & Lane, D. P. (1995). The dominating effect of mutant p53. *Nat Genet* 9, 221-2.
28. Dridi, W., Fetni, R., Lavoie, J., Poupon, M. F. & Drouin, R. (2003). The dominant-negative effect of p53 mutants and p21 induction in tetraploid G1 arrest depends on the type of p53 mutation and the nature of the stimulus. *Cancer Genet Cytogenet* 143, 39-49.
29. Sharma, S., Schwarte-Waldhoff, I., Oberhuber, H. & Schafer, R. (1993). Functional interaction of wild-type and mutant p53 transfected into human tumor cell lines carrying activated ras genes. *Cell Growth Differ* 4, 861-9.
30. Price, B. D. & Youmell, M. B. (1996). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res* 56, 246-50.
31. Wang, C., Eshleman, J., Lutterbaugh, J., Bin, Y., Willson, J. & Markowitz, S. (1996). Spontaneous apoptosis in human colon tumor cell lines and the relation of wt p53 to apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 109, 537-41.
32. Yang, B., Stambrook, P. J. & Markowitz, S. D. (1996). Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest. *Clin Cancer Res* 2, 1639-47.
33. Yoshikawa, R., Kusunoki, M., Yanagi, H., Noda, M., Furuyama, J. I., Yamamura, T. & Hashimoto-Tamaoki, T. (2001). Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res* 61, 1029-37.
34. Lin-Lee, Y. C., Tatebe, S., Savaraj, N., Ishikawa, T. & Tien Kuo, M. (2001). Differential sensitivities of the MRP gene family and gamma-glutamylcysteine synthetase to prooxidants in human colorectal carcinoma cell lines with different p53 status. *Biochem Pharmacol* 61, 555-63.
35. Liu, L., Nakatsuru, Y. & Gerson, S. L. (2002). Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res* 8, 2985-91.
36. Matsubashi, N., Saio, M., Matsuo, A., Sugiyama, Y. & Saji, S. (2004). p53 dependence and apoptosis in response to FP treatment with p53-transfected colon cancer cell lines by use of thin layer collagen gel. *Oncol Rep* 12, 357-61.

37. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8, 2540-51.
38. Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-23.
39. Bae, I., Fan, S., Bhatia, K., Kohn, K. W., Fornace, A. J., Jr. & O'Connor, P. M. (1995). Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Res* 55, 2387-93.
40. el-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., Hamilton, S. R. & et al. (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 55, 2910-9.
41. Chin, P. L., Momand, J. & Pfeifer, G. P. (1997). In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 15, 87-99.
42. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J. & Drobetsky, E. A. (1997). A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res* 57, 3390-4.
43. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1, 45-9.
44. Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A. & Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-86.
45. Yaseen, N. Y., Watmore, A. E., Potter, A. M., Potter, C. W., Jacob, G. & Rees, R. C. (1990). Chromosome studies in eleven colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44, 83-97.
46. Tomita, N., Jiang, W., Hibshoosh, H., Warburton, D., Kahn, S. M. & Weinstein, I. B. (1992). Isolation and characterization of a highly malignant variant of the SW480 human colon cancer cell line. *Cancer Res* 52, 6840-7.
47. Gagos, S., Hopwood, V. L., Iliopoulos, D., Kostakis, A., Karayannakos, P., Yatzides, H., Skalkeas, G. D. & Pathak, S. (1995). Chromosomal markers associated with metastasis in two colon cancer cell lines established from the same patient. *Anticancer Res* 15, 369-78.
48. Melcher, R., Steinlein, C., Feichtinger, W., Muller, C. R., Menzel, T., Luhrs, H., Scheppach, W. & Schmid, M. (2000). Spectral karyotyping of the human colon cancer cell lines SW480 and SW620. *Cytogenet Cell Genet* 88, 145-52.

49. Rodrigues, N. R., Rowan, A., Smith, M. E., Kerr, I. B., Bodmer, W. F., Gannon, J. V. & Lane, D. P. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7555-9.
50. Blagosklonny, M. V. (1997). Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 15, 1889-93.
51. Maltzman, W. & Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4, 1689-94.
52. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-11.
53. Fritsche, M., Haessler, C. & Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8, 307-18.
54. Liu, M., Dhanwada, K. R., Birt, D. F., Hecht, S. & Pelling, J. C. (1994). Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* 15, 1089-92.
55. Jenkins, J. R., Rudge, K., Chumakov, P. & Currie, G. A. (1985). The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis. *Nature* 317, 816-8.
56. Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J. & Lane, D. P. (1990). Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 5, 893-9.
57. Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D. & Harris, A. L. (1990). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335, 675-9.
58. Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U. & Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 14, 1407-17.
59. Lain, S., Xirodimas, D. & Lane, D. P. (1999). Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function. *Exp Cell Res* 253, 315-24.
60. Chen, J. Y., Funk, W. D., Wright, W. E., Shay, J. W. & Minna, J. D. (1993). Heterogeneity of transcriptional activity of mutant p53 proteins and p53 DNA target sequences. *Oncogene* 8, 2159-66.
61. Johnsson, N. (2002). A split-ubiquitin-based assay detects the influence of mutations on the conformational stability of the p53 DNA binding domain in vivo. *FEBS Lett* 531, 259-64.

62. Zhan, Q., Chen, I. T., Antinore, M. J. & Fornace, A. J., Jr. (1998). Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. *Mol Cell Biol* 18, 2768-78.
63. Drouin, R., Lemieux, N. & Richer, C. L. (1988). High-resolution R-banding at the 1250-band level. 1. Technical considerations on cell synchronization and R-banding (RHG and RBG). *Cytobios* 56, 107-25.
64. (1995). *ISCN (1995) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Felix Mitelman edit, S. Karger, Basel.
65. Yan, J., Zhang, X. X., Fetni, R. & Drouin, R. (2001). Trisomy 8 and monosomy 7 detected in bone marrow using primed in situ labeling, fluorescence in situ hybridization, and conventional cytogenetic analyses. A study of 54 cases with hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 125, 30-40.
66. Yan, J., Bronsard, M. & Drouin, R. (2001). Creating a new color by omission of 3 end blocking step for simultaneous detection of different chromosomes in multi-PRINS technique. *Chromosoma* 109, 565-70.
67. Koch, J., Hindkjaer, J., Kolvraa, S. & Bolund, L. (1995). Construction of a panel of chromosome-specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes in situ. *Cytogenet Cell Genet* 71, 142-7.
68. Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1995). UV light as a footprinting agent: modulation of UV-induced DNA damage by transcription factors bound at the promoters of three human genes. *J Mol Biol* 249, 714-28.
69. Angers, M., Drouin, R., Bachvarova, M., Paradis, I., Marceau, F. & Bachvarov, D. R. (2000). In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *J Cell Biochem* 78, 278-96.
70. Angers, M., Cloutier, J. F., Castonguay, A. & Drouin, R. (2001). Optimal conditions to use Pfu exo(-) DNA polymerase for highly efficient ligation-mediated polymerase chain reaction protocols. *Nucleic Acids Res* 29, E83.
71. Drouin, R., Therrien, J. P., Angers, M. & Ouellet, S. (2001). In vivo DNA analysis. *Methods Mol Biol* 148, 175-219.
72. Pfeifer, G. P. & Tornaletti, S. (1997). Footprinting with UV irradiation and LMPCR. *Methods* 11, 189-96.
73. Roy, R. J., Gosselin, P. & Guerin, S. L. (1991). A short protocol for micro-purification of nuclear proteins from whole animal tissue. *Biotechniques* 11, 770-7.

74. Bergeron, M. J., Leclerc, S., Laniel, M. A., Poirier, G. G. & Guerin, S. L. (1997). Transcriptional regulation of the rat poly(ADP-ribose) polymerase gene by Sp1. *Eur J Biochem* 250, 342-53.
75. Schneider, R., Gander, I., Muller, U., Mertz, R. & Winnacker, E. L. (1986). A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts. *Nucleic Acids Res* 14, 1303-17.

4.2.9 Table 1

Table 1 : Summary of the chromosome alterations found in SW480 cell line and in comparison with those found by other groups of investigators. (^a Number of alterations as represented in Figure 1a) and b); ^b Karyotyping technique)

Number on karyotype ^a	Our results (m-FISH and GTG) ^b	Melcher et al (2000) ⁴⁸ (SKY and CBG)	Gagos et al (1995) ⁴⁷ (GTG and CBG)	Tomita et al (1992) ⁴⁶ (GTG)	Yaseen et al (1990) ⁴⁵ (GTG)
1	der(1)t(1;9)(q21;q12)	der(1)t(1;9)(q12;q11)	der(1)t(1;9)(q12;q11)	der(1)t(1;9)(q25;q13)	
2	inv(2)(q23;q34)				
3	der(2)t(2;12)(q35;q12)	der(2)t(2;12)(q24;q13)	der(2)dic(2;12)(q24;p13)		
4	der(3)del(3)(q10)	der(3)del(3)(q11)		der(3)del(3)(q11)	
5	i(3)(q10)				
6	der(5)t(5;20)(q15;p12)	der(5)t(5;20)(q15;p12)	der(5)t(5;20)(q15;p12)	der(5)t(5;20)(q15;p11)	der(5)t(5;20)(q15;p11)
7	der(7)t(7;13)(q31;q12)	der(7)t(7;13)(q22;q14)		ins(7)(7;?)(q22;??)	der(7)?ins(q22)
8	der(7)t(inv7;14)[(q21;q34)(q22;q24)]	der(7)t[inv(7);14][(q22;q36)(q22;q22)]	der(7)t[inv(7);14][(q22;q36)(q22;q22)]	der(7)t(7;?)(q36;?)	
9	der(9)t(8;9)(q12;p13)	der(8)t(8;9)(p11;q11)	der(8)t(8;9)(p11;q11)	der(8)t(8;?)(p11.2;?)	
10	der(9)t(1;9)(q21;q12)	der(9)t(1;9)(q12;q11)	der(9)t(1;9)(q12;q11)	der(9)t(1;9)(q25;q13)	
11	der(10)t(3;10;12)(3qter→3q21::12?:10p15→10q26::10q24→10qter)	der(10)t(10;3)(p13;q21)	der(10)t(10;12)(p13;q12)		der(10)t(10;12)(p15;q11)
12	i(12)(p11)	der(12)del(12)(q13)			
13	der(18)del(18)(q12)	der(18)del(18)(q12)	der(18)del(18)(q12.2)		
14	der(19)t(5;8;19)(19pter→19q13.1::8?:19q13.2→19q13.3::5q34→5qter)	der(19)t(19;8;19:5)	der(19)t(19;?)	der(19)t(19;?)(q13;?)	der(19)t(19;?)(q13;?)
15	der(19)t(8;19)(?;p11)	der(8)t(8;19)			
16	der(20)t(5;20)(q15;p12)	der(5)t(5;20)(q11;??)	der(20)t(5;20)(q15;p13)	der(20)t(5;20)(q15;p11)	der(20)t(5;20)(q15;p11)
Other alterations			der(2)t(2;3)(q24;p21)	der(2)t(2;1)(q37;q13)	der(2)t(2;18)(q21;q11)
			der(2)t(2;11)(p36;q22)	?i(4p)	i(5p)
			der(4)del(4)(q21)		der(16)?origin
			der(5)del(5)(q15)		
			der(13)del(13)(q13)		
			+ 1 unidentified marker	+ 1 unidentified marker	+2 unidentified markers
Karyotype	-1, -2, -3, -5, -8, -9, -10, +11, -12, +13, +17, -18, -19, +21, +X, -Y	-1, -5, -8, -9, -10, +11, -12, +13, +17, -18, -19, +21, +X, -Y	-1, -5, -10, +12, -18, -19, +21, +X, -Y	-1, -5, -8, -9, -10, +11, -12, +13, +16, +17, -18, -19, +21, +22, +X, -Y	-5, +7, -10, +11, -12, +13, -16, -18, +21, +X, -Y
Modal	56 (52-58)	56 (52-58)	(55-58)	56	55 (53-57)

4.2.10 Légendes des figures

Figure 1. Representative karyotype of SW480 cells after GTG banding (a) and m-FISH (b). All chromosomal abnormalities were numbered from “1” to “16” on the karyotype shown in (a) and described in Table I (see Table I for the listing of the detailed chromosome anomalies). Combining GTG banding and m-FISH, it was possible to identify all abnormal chromosomes.

Figure 2. FISH analysis using a probe specific for the *p53* gene (red signal) carried out in parallel with PRINS using primers specific for the chromosome 17 centromere (green signal). Three copies of chromosome 17 are revealed and each copy carried a single *p53* gene located on the short arm to band 17p13.1.

Figure 3. (a) Sequencing of the PCR amplified fragment containing codons 273 and 309 revealed both mutations. Transition mutations G→A at codon 273 and C→T at codon 309 can be seen in the SW480 cell line in contrast to normal human lymphocytes. (b) Schematic illustration of the restriction enzyme assay designed to detect mutations in codons 273 and 309. A 304-bp DNA fragment containing codons 273 and 309 of *p53* was prepared by PCR amplification using DNA purified from SW480 cells and normal human lymphocytes as templates. The length of the putative digestion products resulting from the incubation of the 304-bp PCR fragment with the restriction enzymes NspI and HpyCH4, either individually or in combination, as indicated. (c) Agarose gel showing PCR products cleaved by restriction enzymes. No Tx: no digestion with restriction enzymes.

Figure 4. Western blot analysis of p53 expression in SW480, LoVo and LF041 cells. The amount of proteins loaded in each well varies from 0.2 to 30 μg of total protein extracts from SW480 cells and was compared with 30 μg of total proteins from LoVo and LF041 cells. The Coomassie blue stained gel appearing in the bottom part of the figure was used as a control for the protein loads

Figure 5. Immunofluorescence analysis of p53 protein levels (fluorescein, yellow) in SW480, LoVo and LF041. DAPI (blue) was used as a counterstaining. Panels (a), (c) and (e) are nuclei from SW480, LoVo and LF041, respectively, exposed only to the anti-mouse antibody (Ab). Panels (b), (d) and (f) are nuclei from SW480, LoVo and LF041, respectively, in which an anti-p53 Ab was used to reveal the p53 protein.

Figure 6. Western blot analysis of p21^{Cip1/WAF1} expression in LoVo, LF041 and SW480 cells. Expression of p21^{Cip1/WAF1} in LoVo (top panel), LF041 (middle panel) and SW480 (bottom panel) cells was monitored after exposure of the cells to 400 J/m^2 of UVB. Following induction, total proteins were extracted at different periods of time, at 0, 1, 3, 6, 12, and 24 hours and revealed by Western blotting. The Coomassie blue stained gel appearing in the bottom part of the figure was used as a control for the protein loads.

Figure 7. Genomic in vivo UV footprinting of the p21^{Cip1/WAF1} promoter in SW480, LoVo and LF041 cell lines. The sequence analyzed covers the upper strand of the region spanning nucleotides -2294 to -2207 upstream from the p53 mRNA start site and covering one of the two p53 consensus binding sites. The first four lanes show LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert sequencing reactions. The remaining lanes show LMPCR of DNA from cells (SW480, LoVo and LF041) irradiated with 750 J/m^2 of UVC after various periods of time (0, 1, 2, 4, 8 hours) post-induction with gamma radiation (20 Grays). Last lane (t) shows LMPCR of purified DNA irradiated with 750 J/m^2 of UVC after purification. All samples, except for the Maxam-Gilbert sequencing reactions, were treated with T4

endonuclease V and CPD photolyase to convert UVC-induced CPD into single-strand breaks. The DNA sequence shown on the left indicates the position of a p53-binding site identified by *in vitro* studies.⁴¹ The asterisk on the right side of the figure shows a clear *in vivo* positive footprint that might result from the binding of p53 to its nearby p21^{Cip1/WAF1} promoter target site.

Figure 8. Binding of p53 proteins extracted from the SW480, LoVo and LF041 cell lines to their consensus DNA target sequence by EMSA. Total proteins from LoVo cells (20 μ g), LF041 cells (5 μ g), and SW480 cells (5 μ g) were incubated with the p53 consensus labeled probe in the presence of either no (-) or 250 μ g of a p53 monoclonal Ab (+) and formation of DNA/protein complexes monitored by EMSA on a 4% native polyacrylamide gel. The DNA/protein/Ab complex is indicated as “p53 complex”. The bracket indicates the position of a p53-independent DNA/protein complex appearing on the gel. The remaining free-labeled probe passed through the gel and therefore does not appear on the figure.

Figure 1A

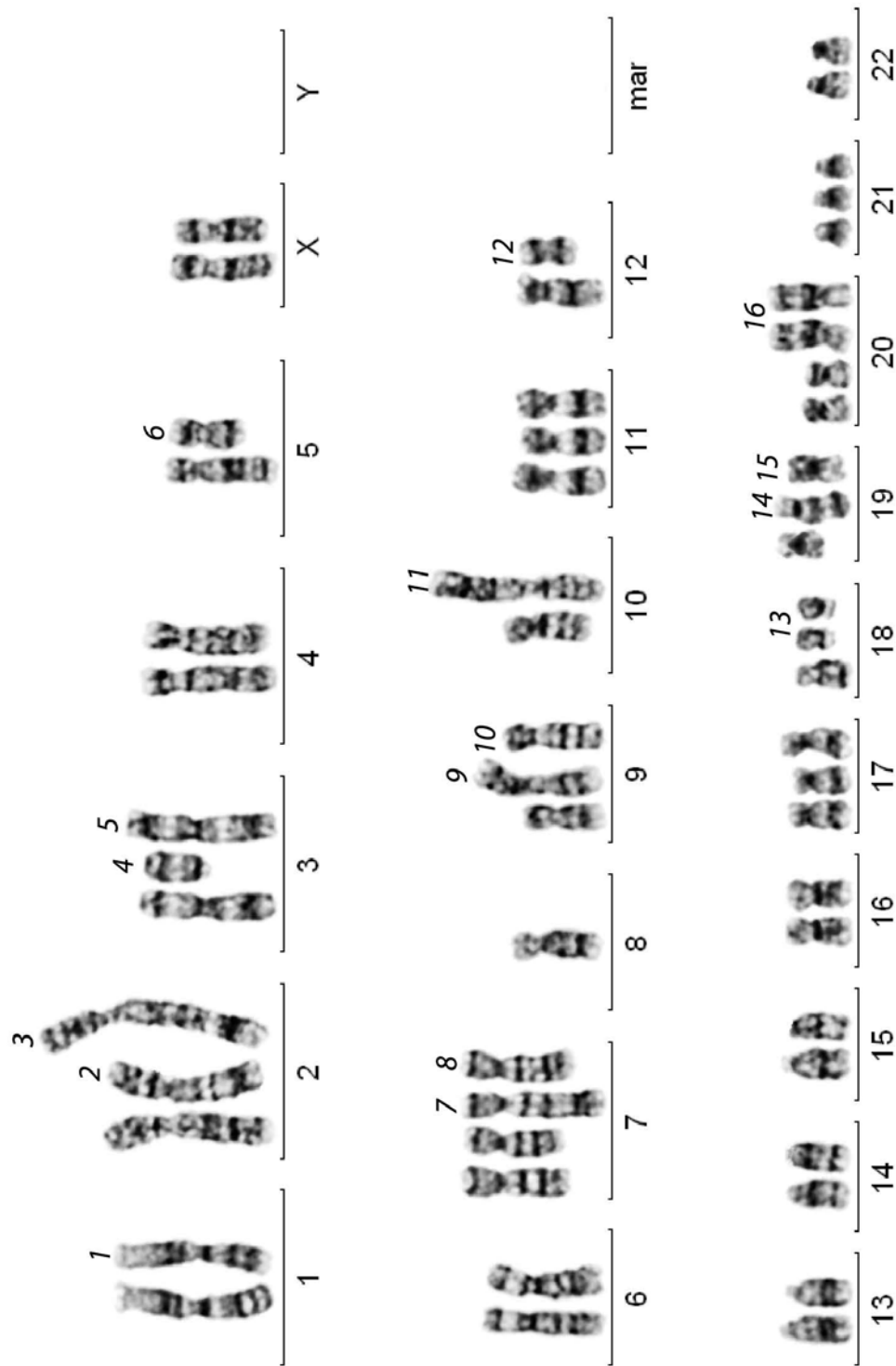


Figure 1B

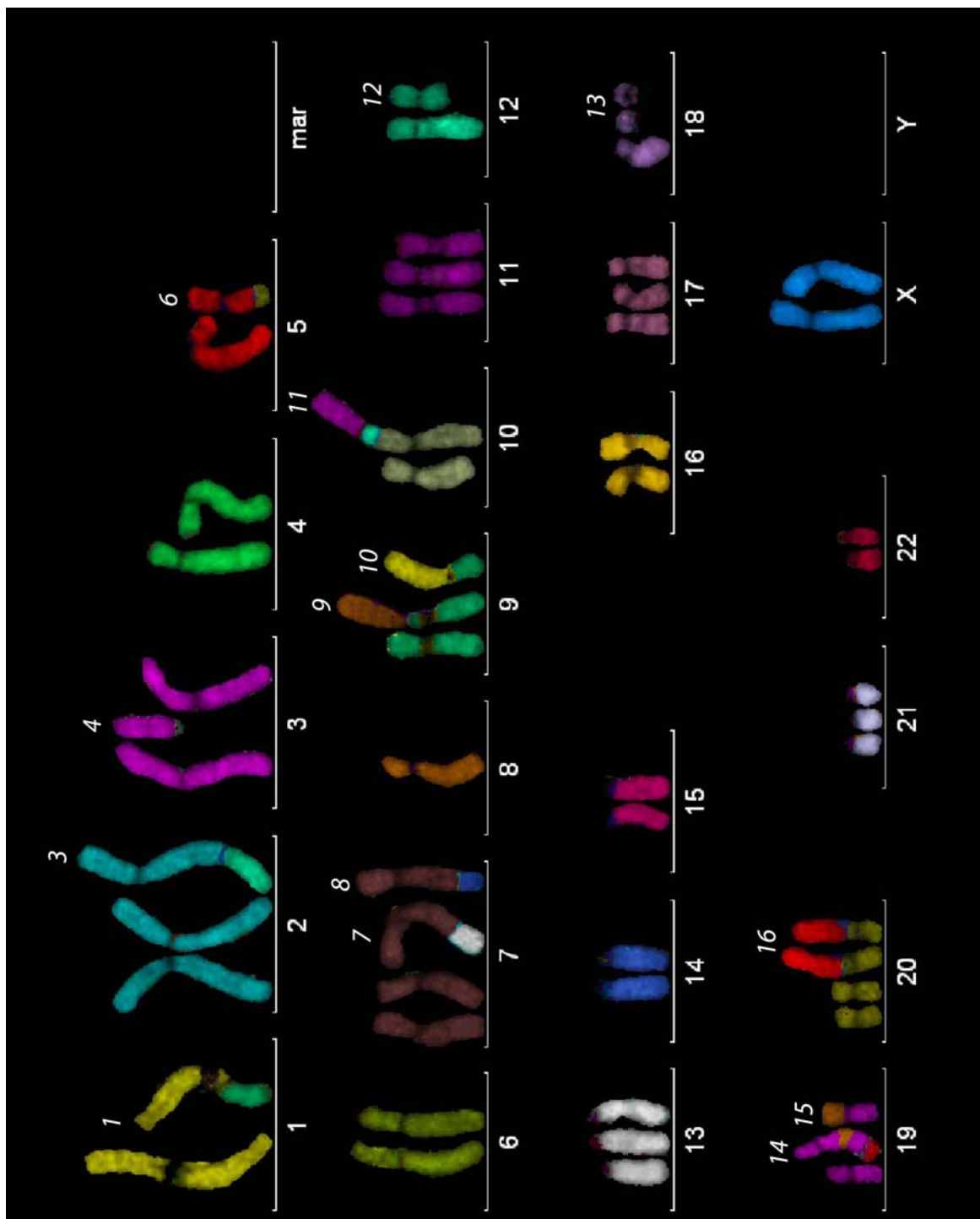


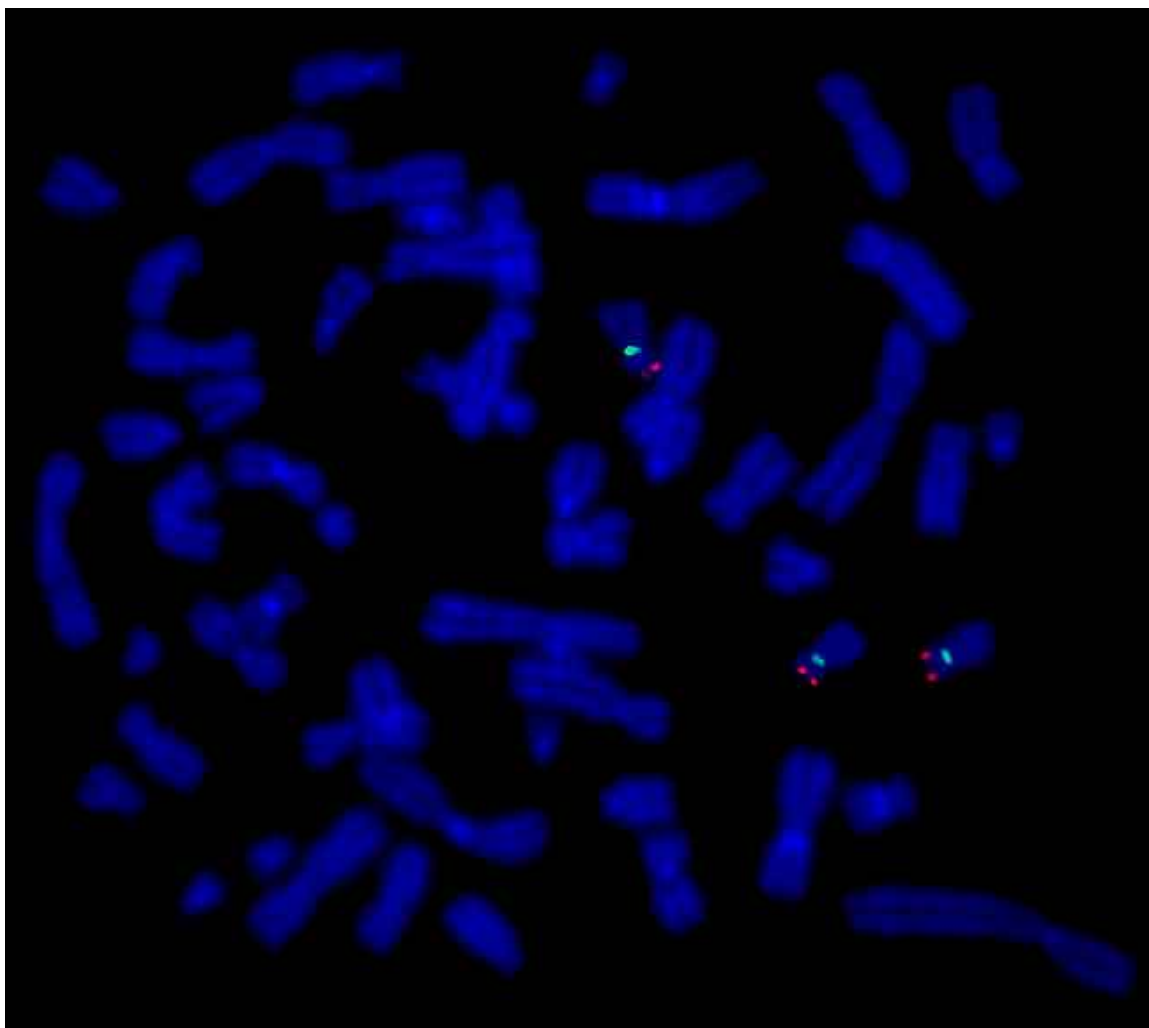
Figure 2

Figure 3

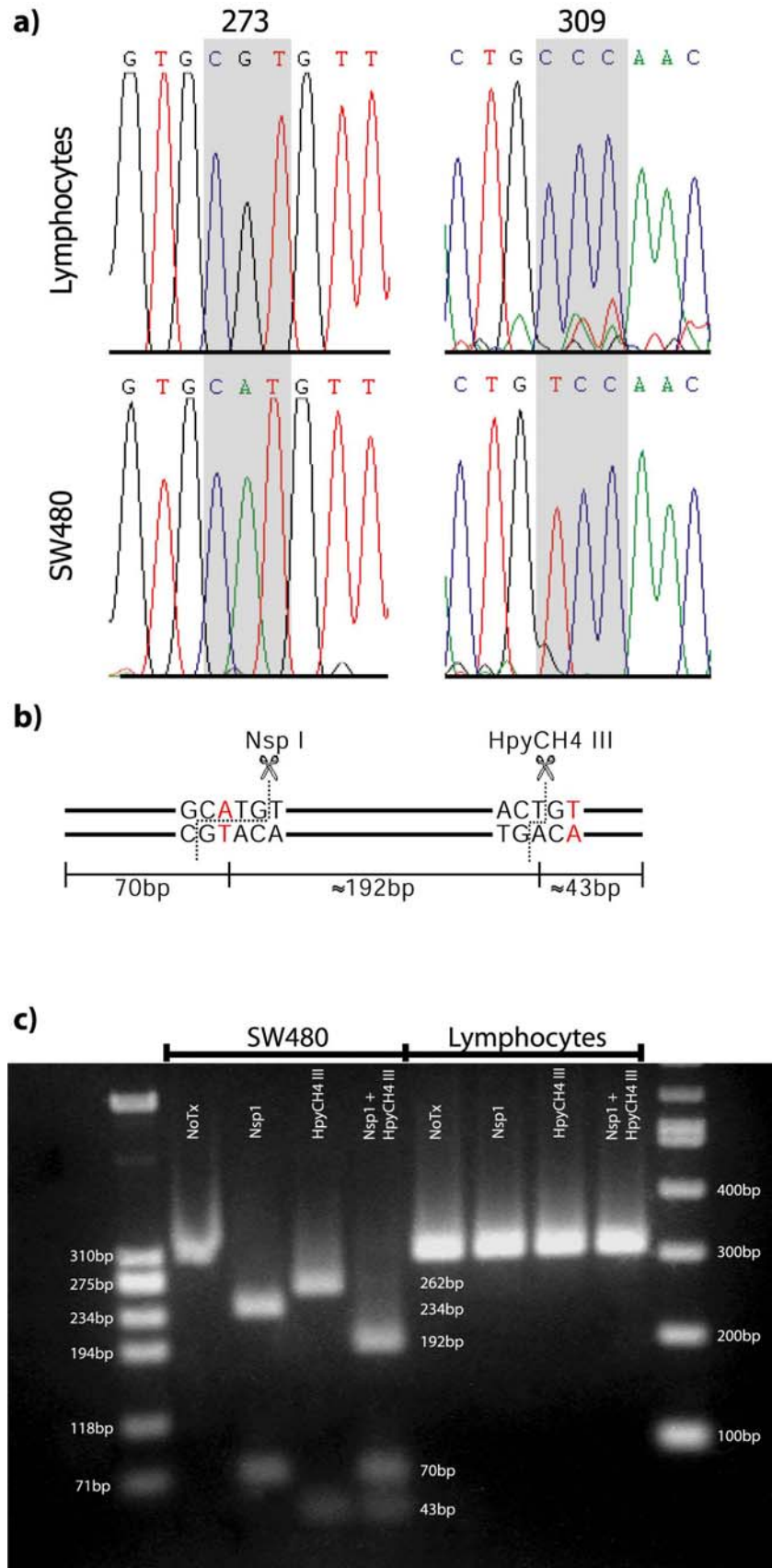


Figure 4

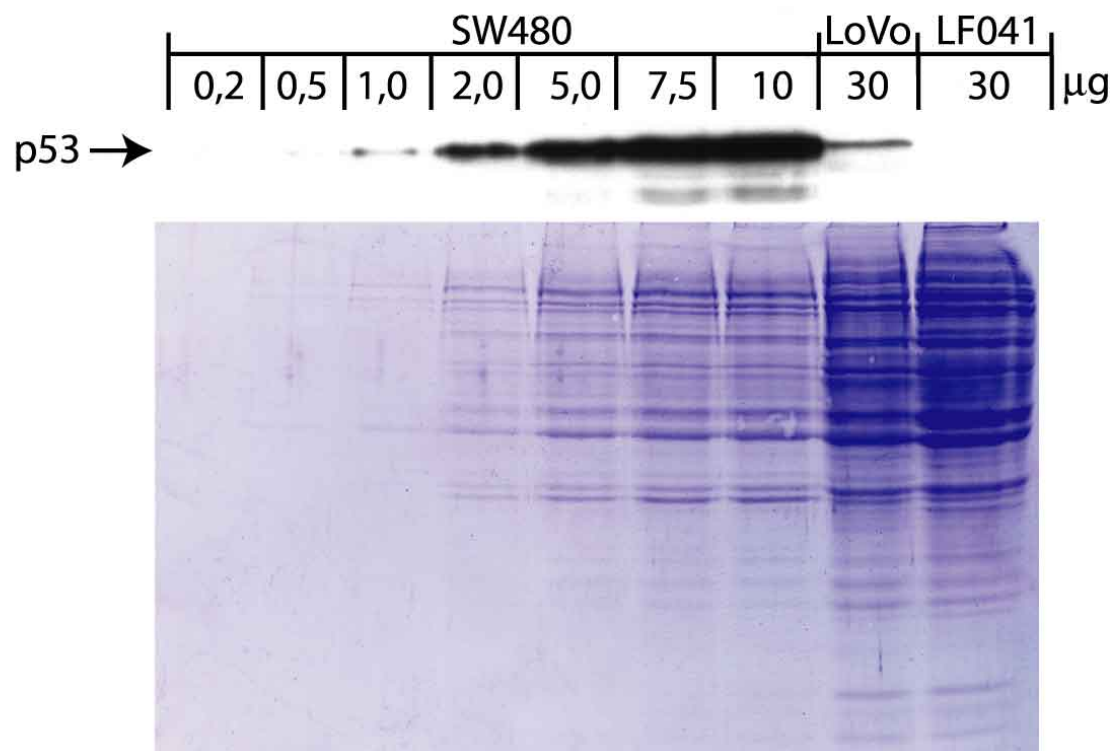


Figure 5

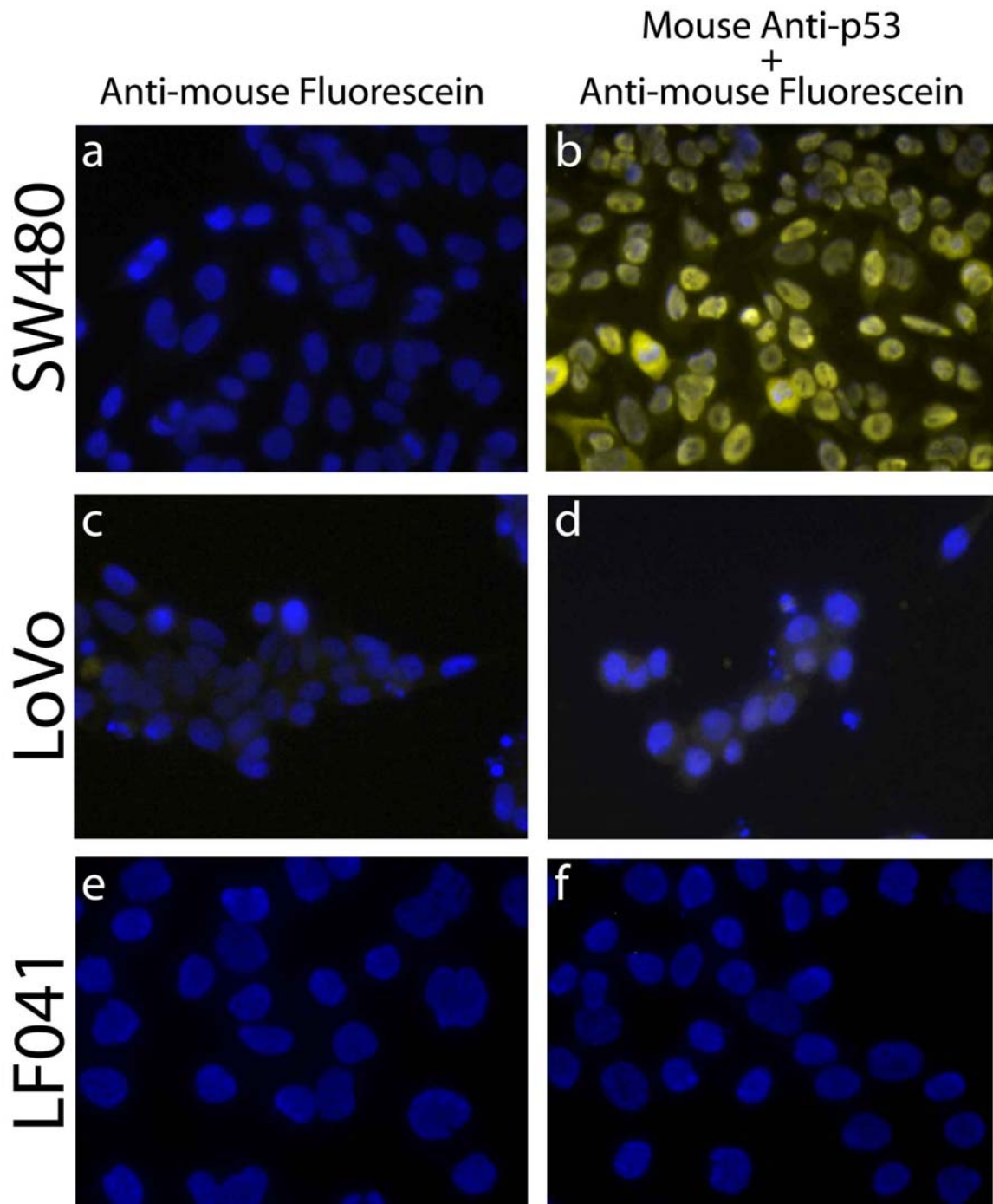


Figure 6

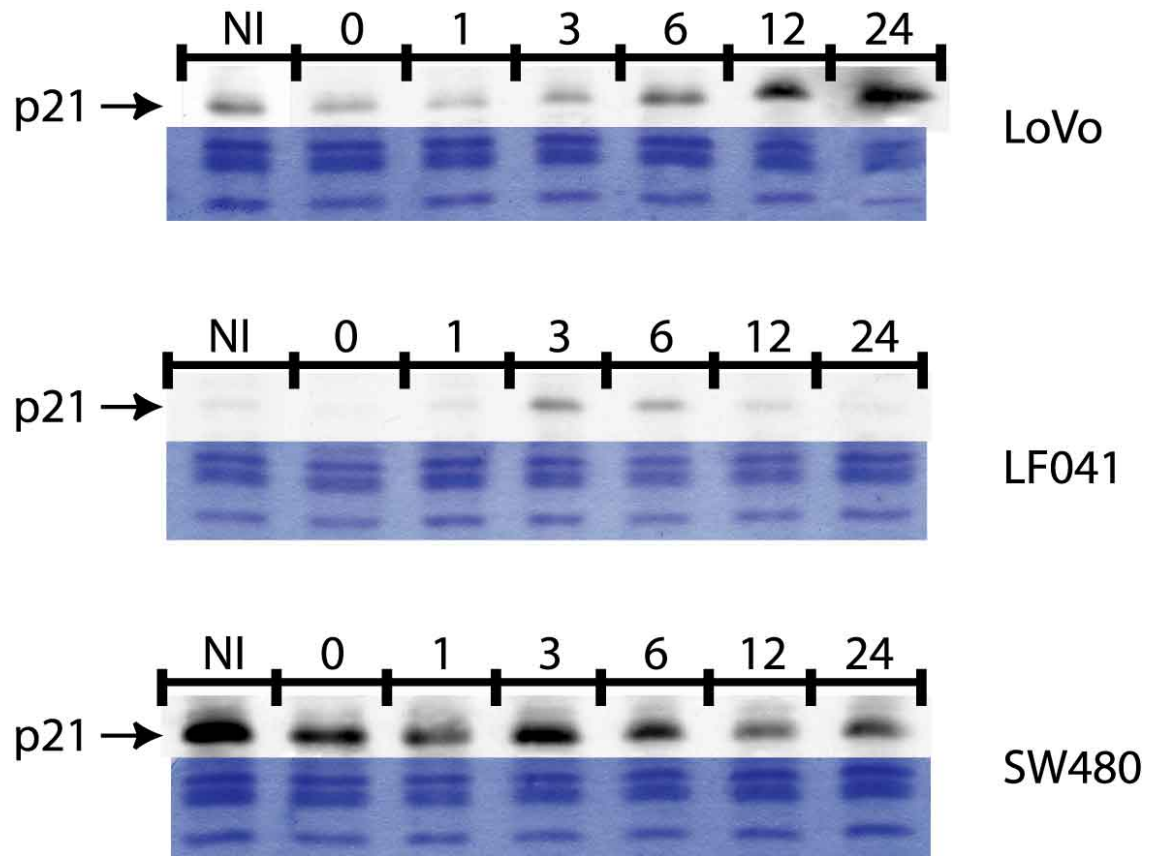


Figure 7

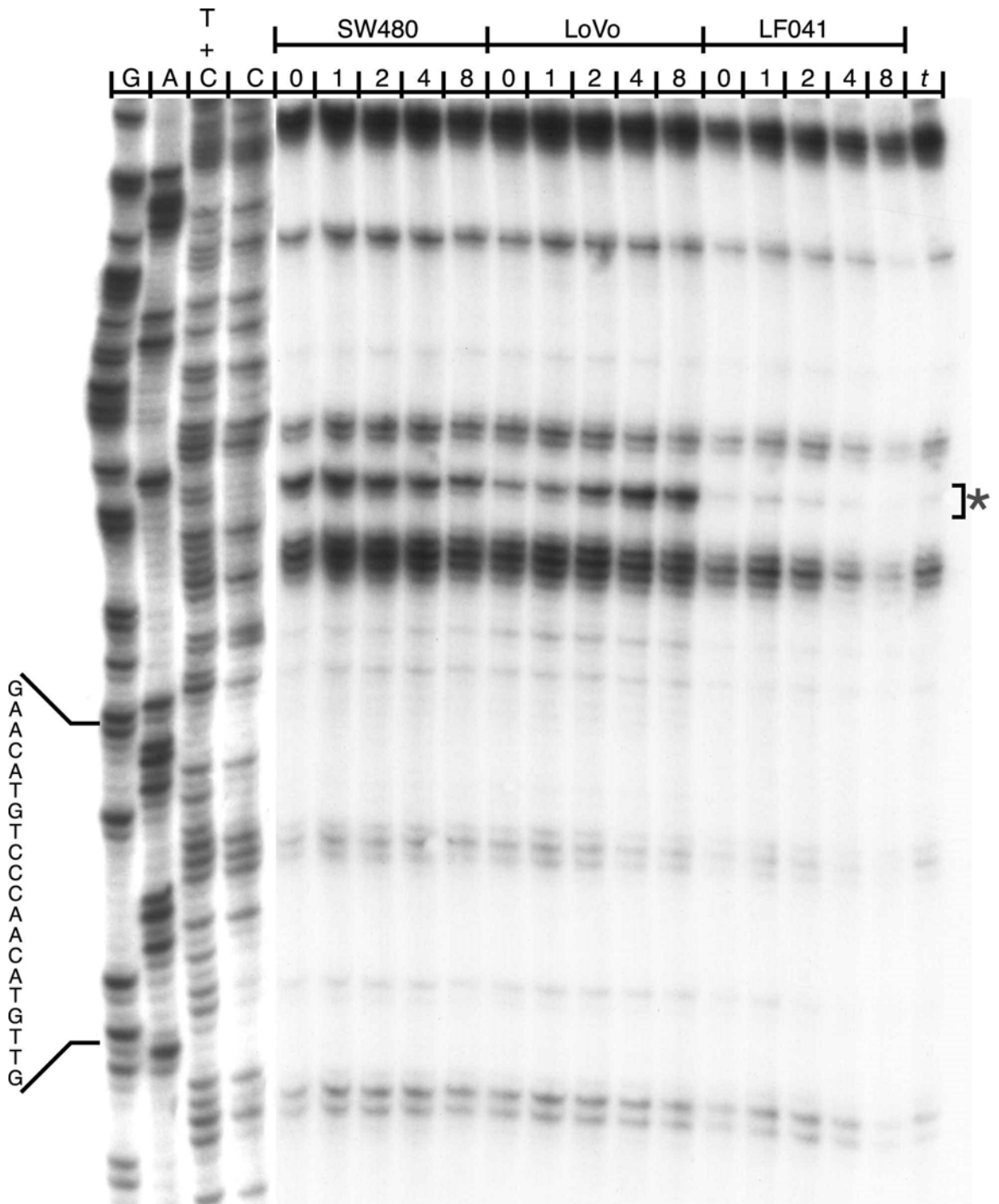
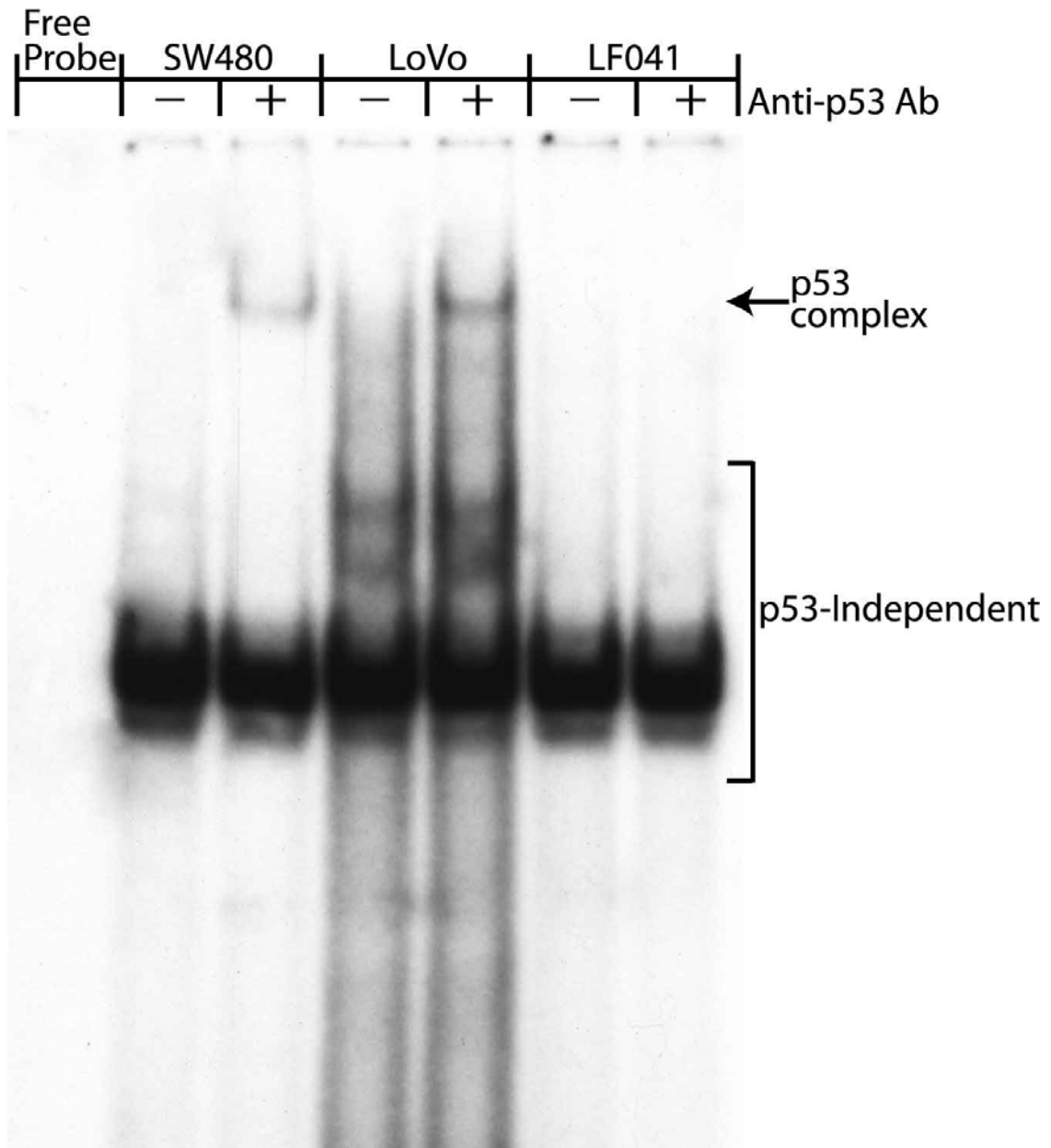


Figure 8



Chapitre 5 : Discussion et Conclusion

5.1 Discussion sur le Chapitre 2

Dans le projet présenté dans le chapitre 2, nous avons irradié les cellules CHO avec soit des UVA (340-400 nm), des UVB (295-320 nm), des UVC (254 nm) ou de la lumière solaire simulée (SSL; $\lambda > 295$ nm) à des doses physiologiques (sauf pour les UVC qui ne se rendent pas à la surface terrestre). Suite à ces irradiations, la technique « ligation-mediated PCR » (LMPCR) a permis de cartographier, de manière spécifique et au nucléotide près, les DCP sur l'exon 2 du gène *aprt*.

Les résultats ont révélé que, suite à une exposition aux UVB, la distribution des DCP au niveau des différents types de sites dipyrimidiniques est de CC>TT>TC>CT avec des proportions relatives de 30% sur les CC, 28% sur les TT, 26% sur les TC, et 16% sur les CT. Ces proportions sont assez inhabituelles. En fait, dans de l'ADN génomique total, on observe normalement que 68% des DCP se retrouvent sur les TT, 16% sur les TC, 13% sur les CT et 3% sur les CC (TT>TC>CT>CC) (Setlow and Carrier 1966; Mitchell, Jen et al. 1992). Cette différence marquée de la distribution peut être expliquée par différents facteurs. Premièrement, la région analysée est très courte, soit 100 pb, ce qui biaise en partie l'analyse qu'on peut en faire. En second lieu, le nombre de chacun des types de sites dipyrimidiniques n'est pas équilibré au niveau de la séquence étudiée. En fait, sur les 65 sites dipyrimidiniques présents et analysés dans la région de 100 pb, il y a 8 sites TT, 17 TC, 16 CT et 24 CC. Les TT sont donc sous-représentés et les CC sur-représentés dans la région analysée. De plus, les DCP sur les TT sont reconnus pour être formés beaucoup plus facilement dans les régions contenant des suites continues de thymidines (Sage, Cramb et al. 1992; Sage 1993), ce qu'on ne retrouve pas dans l'exon 2 du gène *aprt*. La région analysée est donc défavorable à la formation de dimères sur les dipyrimidines TT.

Jusqu'à récemment, les UVA étaient reconnus pour induire l'oxydation des différentes bases de l'ADN. Cependant, des études ont montré que le dommage majoritaire causé par les UVA sont plutôt les DCP, comme c'est le cas pour les UVB et les UVC

(Douki, Perdiz et al. 1999; Perdiz, Grof et al. 2000; Douki, Reynaud-Angelin et al. 2003). Bien qu'il était connu que les UVA causent des DCP, aucune information concernant leur distribution n'était disponible avant la publication de notre article. Dans la même séquence de 100 pb de l'exon 2 du gène *aprt* que celle analysée pour les UVB, les UVC et la SSL, la distribution des DCP suite à une irradiation aux UVA est la suivante : 57% aux TT, 18% aux TC, 11% aux CT et 14% aux CC (TT>TC>CC>CT). Une grande proportion des dommages induits par les UVA est donc concentrée au niveau des sites dipyrimidiniques TT, même si leur faible nombre dans la séquence étudiée les défavorise. Ceci laisse supposer que, dans un contexte de séquence équilibré en dipyrimidines, les UVA devraient amener la formation de DCP sur les TT dans une proportion encore plus grande que ce que nous avons observé. Cette supposition a été confirmée dans une publication ultérieure à la nôtre (Douki, Reynaud-Angelin et al. 2003). Dans cet article, les auteurs montrent, à l'aide de la technique HPLC-MS/MS, que les UVA induisent des DCP sur les TT dans une proportion de 88% (Douki, Reynaud-Angelin et al. 2003).

Le spectre des mutations induites par différentes longueurs d'ondes (UVA, UVB, UVC et SSL) sur l'exon 2 du gène *aprt* était déjà publié lors de la parution de notre article (Drobetsky, Turcotte et al. 1995). Comme notre spectre de distribution des DCP a été fait dans les mêmes conditions que dans ce dernier papier, il était facile de les superposer et de faire un lien direct entre les dommages et les mutations. Le spectre de mutations montre que les UVB et les UVC induisent principalement des transitions C→T et quelques doubles transitions CC→TT, ce qui correspond aux mutations normalement retrouvées aux UV. Avec les UVA, bien que plusieurs (22%) des mutations sont des transitions C→T et que 5% sont des doubles CC→TT, la majorité des changements de bases, soit 37%, sont des transversions T→G. Ces mutations ne peuvent pas être expliquées par les 8-oxoG, dommages retrouvés suite à l'oxydation des bases après une administration d'UVA. Nous pensons que les dimères induits sur les TT sont la cause de ces transitions T→G. En fait, tous les sites de points chauds de DCP sur les TT induits par les UVA sont des sites de points chauds de mutations T→G. Seul un site TT est un point chaud de dommage par les UVA sans avoir de mutations recensées. Dans ce site, une substitution du T en 5' en G

n'amène pas de changements dans la séquence des acides aminés, ce qui en fait une mutation silencieuse qui ne peut être sélectionnée. Dans ce même site, si le T en 3' est muté en G, l'acide aminé sérine devient alors une alanine. Comme ces deux acides aminés ne diffèrent que par un atome d'oxygène, ils peuvent ne pas donner de phénotype mutagène.

Comment les UVA peuvent induire des DCP sur l'ADN? Les UVA sont 10^5 fois moins absorbés par l'ADN que les UVC (Sutherland and Griffin 1981) et ils induisent des DCP à un taux de 10^5 fois moins élevé que celui des UVC (Douki, Perdiz et al. 1999; Kuluncsics, Perdiz et al. 1999; Perdiz, Grof et al. 2000). Il est donc valable de penser que les UVA peuvent générer suffisamment d'énergie pour induire des DCP directement sur l'ADN. Dans un projet qui n'est pas encore publié, nous avons irradié de l'ADN nu aux UVA. La fréquence et la distribution des photo-dommages sont identiques à celles retrouvées dans les cellules CHO irradiées dans les mêmes conditions. Ce qui supporte l'hypothèse de la formation des DCP par absorption directe des UVA par l'ADN.

Les UVA excitent certains chromophores cellulaires qui induisent la formation de ROS. Dans cet ordre d'idées, les UVA ne pourraient-ils pas exciter certains chromophores qui, à leur tour, amèneraient l'énergie nécessaire à la formation du double-lien entre deux pyrimidines adjacentes pour former le DCP? C'est une hypothèse qui perd beaucoup de sa validité lorsqu'on sait que la fréquence et la distribution sont les mêmes sur l'ADN nu que sur l'ADN en contexte cellulaire. Cependant, l'ADN nu n'est jamais complètement nu, après une purification standard certains ions métalliques, comme le fer et le cuivre, restent sur l'ADN. Des évidences ont été publiées concernant le fait que les ions de cuivre, importants pour la structure de la chromatine, qui restent sur l'ADN suite à sa purification, induisent des dommages à l'ADN suite à leur oxydation par le H_2O_2 (Drouin, Rodriguez et al. 1996). Un phénomène semblable pourrait expliquer le fait que les UVA induisent des DCP via des chromophores (métalliques ou autres) sur l'ADN en contexte génomique **et** sur l'ADN nu.

En perspective, plusieurs éléments restent à éclaircir quant au rôle des UVA dans la mutagenèse solaire. Premièrement, notre quantité de sites étant assez faible et peu représentative d'un ADN équilibré en GATC, il serait intéressant d'étendre l'expérience à une quantité plus grande de sites dipyrimidiniques. On éliminerait alors le contexte de séquence particulier retrouvé dans notre échantillon. Ensuite, il faudrait vérifier si les UVA induisent directement les DCP ou s'ils utilisent une voie indirecte de transfert d'énergie. L'utilisation de certains chélateurs pourraient être utilisés sur l'ADN afin de le purifier des ions métalliques avant l'irradiation aux UVA. En second lieu, il faudrait évaluer le temps que prend la cellule pour réparer un DCP induit par les UVA. Les UVB et les UVC aussi induisent des DCP sur les TT, mais très peu de transversions T→G sont retrouvées suite à ces longueurs d'ondes. Est-ce que c'est parce que la cellule répare plus difficilement des dimères induits par les UVA que par les UVB ou UVC? Les UVA n'endommagent assurément pas que l'ADN. Ils peuvent perturber l'équilibre cellulaire, ce qui résulterait en un ralentissement de la réparation globale des DCP.

5.2 Discussion sur le Chapitre 3

La réparation des CPD induits par tous les types d'UV se fait par excision de nucléotides (NER). Différentes protéines ne faisant pas partie de la NER influence son efficacité. Dans le chapitre 3, nous avons fait la lumière sur une controverse concernant le rôle des protéines de la réparation des mésappariements (MMR) dans la NER. Deux articles publiés par l'équipe du Dr Mellon ont montré qu'une déficience en une des protéines de la MMR amène une déficience en TCNER des DCP induits par les UVC chez les procaryotes (Mellon and Champe 1996) et chez les humains (Mellon, Rajpal et al. 1996). Ces résultats ont par la suite été confirmés par un autre groupe de recherche (Leadon and Avrutskaya 1997), mais l'article a dû être retiré par manque de reproductibilité des résultats (Leadon and Avrutskaya 2003). Mentionnons également qu'aucun mécanisme pouvant expliquer cette collaboration entre les deux systèmes de réparation n'a été évoqué dans l'un ou l'autre des articles de Mellon et al.

Dans l'article présenté au chapitre 3, nous avons repris les mêmes cellules que celles utilisées par l'équipe du Dr Mellon (Mellon, Rajpal et al. 1996) et nous avons refait les cinétiques de réparation des DCP induits par les UVB. Contrairement à ce qui avait été obtenu par Mellon et al, nous avons eu des cinétiques de réparation des DCP normales dans les cellules déficientes en un gène de la MMR, tout comme dans les cellules contrôles non-déficientes en MMR. Nous avons pensé que la longueur d'onde utilisée pour générer les DCP pouvait avoir une influence. Nous avons donc repris le tout avec les UVC et nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec les UVB. Des courbes de survie clonogéniques ont montré que les cellules, qu'elles soient déficientes ou non en MMR, avaient la même sensibilité aux UVB qu'aux UVC. Qu'est-ce qui peut expliquer que nos résultats soient totalement contradictoires avec ceux obtenus par l'équipe du Dr Mellon?

<Un article publié en juin 2004 par l'équipe du Dr Andrew Rainbow a permis d'amener des éléments de réponse à cette controverse (Lee, Drouin et al. 2004). Dans cette étude, un vecteur contenant des DCP et actif au niveau de la transcription a été introduit dans les mêmes cellules utilisées par Mellon et al et nous (LoVo, SW480, HCT116 et HCT116+chr3). Ils ont observé le temps de réparation et calculé le temps de reprise de la transcription. Comme les DCP bloquent l'ARN polymérase II, le temps de reprise de la transcription dans ce vecteur est proportionnel à la vitesse de réparation des DCP sur le brin transcrit. Ce qui est intéressant avec ce système, c'est qu'il peut être ou non pré-activé par des UV ou un autre stress. Donc, on peut voir l'effet non-ADN des UV sur la réparation des DCP. Ils ont montré que, dans des cellules prétraitées avec moins de 12 J/m^2 , la réparation des DCP est plus lente sur le vecteur transfecté dans les cellules déficientes en MMR (HCT116 et LoVo). Ce résultat est en accord avec ceux que Mellon et al ont obtenus avec des cellules irradiées à 12 J/m^2 . Cependant, lorsque les cellules sont prétraitées avec plus de 15 J/m^2 d'UVC, la différence de reprise de la transcription entre les cellules déficientes en MMR et les compétentes s'efface. Ce qui est en accord avec nos résultats, nous qui avons utilisé des doses de 15 J/m^2 d'UVC. L'hypothèse qui peut expliquer la discordance de résultats entre notre équipe et celle du Dr Mellon semble être la dose d'UV utilisée.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir les connaissances concernant l'effet de la dose sur la réparation, surtout au niveau des UVB qui, contrairement aux UVC, se rendent à la surface terrestre et nous atteignent. On pense comprendre les fins rouages de la réparation NER, mais avec des résultats comme ceux publiés par Lee et al, on s'aperçoit qu'on est loin d'y être si experts. Pour pouvoir comprendre les mécanismes d'initiation des cancers de la peau, il faut passer par la compréhension des effets qu'ont les UV sur la cellule.

5.3 Discussion sur le Chapitre 4

Dans le chapitre 3, la réparation des DCP par NER des cellules SW480 est comparée à celle des LoVo. Ces deux lignées cellulaires proviennent d'adénocarcinome colorectal, mais seule la LoVo est déficiente en MMR via des mutations dans les deux allèles de hMSH2. Comme nous avons pu le voir dans le chapitre 3, toutes deux présentent une cinétique de réparation des DCP normale. Pourtant, les SW480 sont mutées dans deux codons du gène *p53*, ce qui devrait théoriquement donner une protéine non fonctionnelle. En effet, *p53* est un catalyseur de la NER et sa déficience fonctionnelle se traduit par un ralentissement de la réparation des DCP. Dans le chapitre 4, nous avons tenté de comprendre comment une cellule ayant un *p53* théoriquement non-fonctionnel peut être normale en NER.

La lignée SW480 est une des plus utilisées en recherche, tant au niveau clinique que fondamental. Une recherche dans « PubMed » sous « SW480 » fait apparaître plus de 500 résultats. Depuis son isolation, en 1976, d'un adénocarcinome colorectal chez un homme de 50 ans par Leibovitz et al (Leibovitz, Stinson et al. 1976), plusieurs aspects ont été caractérisés dans ces cellules. Entre autres, deux mutations ponctuelles ont été recensées au niveau des codons 273 et 309 de *p53* (Nishisho, Nakamura et al. 1991). Cependant, la distribution de ces mutations sur les allèles de *p53* était jusqu'à maintenant inconnue.

Dans ce projet, nous avons d'abord caractérisé les SW480 au niveau cytogénétique afin de s'assurer que nous utilisons une lignée stable, malgré les multiples passages depuis 1976. Les caryotypes GTG et m-FISH que nous avons obtenus sont comparables avec ceux obtenus depuis 14 ans, ce qui représente une stabilité hors du commun pour une lignée tumorale. La lignée que nous avons étudiée est donc comparable avec celle que les autres groupes de recherche ont utilisée et utilisent encore.

À partir du moment où la stabilité de la lignée fut confirmée, nous avons investigué le gène *p53* et la protéine résultante de façon plus approfondie. Nous avons découvert que les SW480 contiennent 3 allèles de *p53* et que, les deux mutations (R273H et P309S) sont présentes sur chacun des allèles. Ceci laisse croire que l'allèle normal fut supprimé par la cellule et qu'il y a eu triplification de l'allèle double muté. Pour les cellules SW480, une quantification de la protéine *p53* mutée a montré un niveau basal (sans stimulation) beaucoup plus élevé que ce qui est normalement retrouvé dans les cellules. Cette quantité élevée de *p53* avait déjà été observée par un autre groupe de recherche (Rodrigues, Rowan et al. 1990). Une accumulation de *p53*, lorsque la protéine est mutée, est un phénomène très fréquent. En fait, l'hypothèse la plus valable pour l'expliquer est que les protéasomes, qui dégradent normalement *p53*, ne reconnaissent pas la protéine mutée (Rodrigues, Rowan et al. 1990).

Toujours dans le chapitre 4, il a été montré que la protéine *p53* mutée est capable de lier sa séquence consensus *in vitro*, ce qui est assez surprenant car elle contient une mutation (R273H) dans la région de la protéine qui lui sert à se lier à l'ADN. Cependant, la mutation au codon 273 est particulière. Johnsson a montré, par une technique *in vitro*, que la stabilité ADN/*p53* est comparable entre la *p53* mutée à son codon 273 et la *p53* normale (Johnsson 2002). Dans notre laboratoire, Dr Dridi et al ont montré que des cellules contenant la mutation R273H sur leur gène *p53* induisent la production de *p21* et l'hypophosphorylation de RB, suite à l'administration d'inhibiteurs de fuseaux mitotiques (nocodazole), ce qui est normalement observé dans des cellules compétentes en *p53* (Dridi, Fetni et al. 2003).

Comme il a été discuté dans l'introduction (section 1.6.1), lorsque *p53* est activé par différents stimuli, il active différents gènes effecteurs, dont *p21* (Di Leonardo, Linke et al. 1994; Dulic, Kaufmann et al. 1994; Bae, Fan et al. 1995; el-Deiry, Tokino et al. 1995). Nous avons dosé la protéine *p21* suite à une stimulation de *p53* par irradiation aux UV ou aux radiations ionisantes. Le niveau de *p21* dans les SW480 est constitutionnellement

élevé, même sans stimulation de p53. Dans les LoVo, ce niveau augmente graduellement dans le temps post-stimulation pour atteindre un maximum après 12-24h. Comment expliquer cette activation constitutive de p21 dans les SW480? Une hypothèse est que le gène *p53* double-muté donne une protéine qui mime une p53 activée. Avec le niveau élevé de protéines p53 mutées dans les SW480 qui mimeraient des p53 actives et qui seraient capables de lier leur séquence consensus, il serait logique d'avoir un niveau de p21 aussi élevé. Nous avons vérifié cette hypothèse en allant voir les empreintes protéiques (« footprints ») sur le promoteur de *p21* suite à une stimulation de p53. Nous n'avons pas trouvé d'empreinte dans la région où p53 se lie normalement au promoteur de *p21*. Cependant, un site hyper-réactif a été trouvé tout près, dénotant une structure secondaire de l'ADN très probablement causée par une protéine qui, lorsque liée à l'ADN, cause une distorsion de la double-hélice et facilite la formation de dommages par les UV. Il est important de noter que les empreintes de p53 sont très difficiles à voir. Seule une équipe a réussi à voir des empreintes de p53 sur ses gènes effecteurs en utilisant des cellules qui surexpriment p53 (Chin, Momand et al. 1997). Le site hyper-réactif qu'ils ont retrouvé dans le promoteur de *p21* apparaissait de façon progressive dans le temps pour atteindre son apogée après 4 à 8 heures dans les cellules compétentes en p53 (LoVo). Cependant, dans les SW480, le site hyper-réactif était toujours présent, à partir du temps 0 heure. Ce résultat concorde avec le fait que, dans les SW480, le niveau de la protéine p21 est toujours élevé. Nous ne pouvons pas conclure que c'est p53 qui est toujours liée au promoteur de *p21*, et active la production de la protéine. Cependant, nous pouvons penser que le phénomène est relié à p53 car aucun site hyper-réactif n'est présent dans les cellules n'exprimant pas de p53 (LF041).

Une seconde hypothèse pour expliquer qu'un p53 double-muté peut activer p21 est que cette activation ne se fait pas directement sur le promoteur de *p21*, mais via une autre protéine. p53 n'agit pas seulement en cis, il contient également des domaines de liaison à d'autres protéines (trans). Dans un article publié en 1998, il a été clairement démontré que p53 ne se lie pas directement à GADD45 pour activer sa transcription, mais active plutôt la protéine WT1 qui agit par la suite comme facteur de transcription sur GADD45 (Zhan,

Chen et al. 1998). Comme, dans les SW480, les mutations R273H et P309S ne se retrouvent pas dans les domaines de liaison aux protéines de p53, on pourrait rencontrer le même genre de transactivation. Selon cette hypothèse, la protéine p53 double-mutante des SW480 pourrait directement activer d'autres protéines qui, à leur tour, agiraient comme facteur de transcription pour activer la transcription de *p21* et de certains gènes importants dans la NER.

Plusieurs éléments restent à éclaircir pour mieux comprendre comment une cellule double-mutante pour *p53* peut activer certains gènes et avoir les mêmes phénotypes que ceux retrouvés dans des cellules compétentes en p53. Comme il a été mentionné, plusieurs recherches ont été faites en utilisant les cellules SW480 comme déficientes en p53 (ex: (Sharma, Schwarte-Waldhoff et al. 1993; Price and Youmell 1996; Wang, Eshleman et al. 1996; Yang, Stambrook et al. 1996; Lin-Lee, Tatebe et al. 2001; Yoshikawa, Kusunoki et al. 2001; Liu, Nakatsuru et al. 2002; Matsubishi, Saio et al. 2004). ...). À la lumière des résultats que nous avons obtenus avec les SW480, il est clair que les recherches utilisant ces cellules comme déficientes en p53 doivent être interprétées avec prudence. Le mécanisme par lequel p53 est capable d'induire un niveau élevé de p21 n'est pas encore élucidé, mais c'est sans doute le même mécanisme par lequel p53 est apte à activer les gènes de la réparation NER et, par le fait même, amener une réparation normale des DCP.

5.4 Conclusion générale

Le travail présenté dans cette thèse permet de mieux comprendre les effets moléculaires des radiations électromagnétiques du soleil et les mécanismes d'initiation des néoplasies humaines. Nous avons amené des éléments prouvant que les UVA contribuent au cancer de la peau. Ils causent des dommages sur l'ADN (DCP) qui, lorsqu'ils ne sont pas réparés, peuvent générer des mutations, comme les transitions T→G. Du moins, c'est ce qui semble se produire dans les cellules de rongeur et rien n'indique que la situation est différente chez l'humain. Nous avons présenté dans l'introduction que les UVA sont les plus abondants à la surface de la terre et, comme ils sont les plus pénétrants, ils se rendent facilement aux mélanocytes. Ils sont ainsi menaçants et favorisent la génération de mélanomes. Ils ne sont donc pas à négliger dans la cancérogenèse solaire et des travaux devront être faits pour compléter les brides d'informations que nous possédons à ce jour sur les UVA.

Dans l'introduction, la théorie de la mutagenèse somatique de Thilly a été expliquée en détail (section 1.5.2). Selon cette théorie, la probabilité qu'un dommage donné devienne une mutation est influencée par la vitesse de réparation de ce même dommage. Une réparation ralentie résulte en une probabilité de mutations plus grande. Les protéines non-essentiels à la NER, mais qui la catalysent entrent donc en jeu dans le calcul de la probabilité d'une mutation. Avec les résultats présentés dans cette thèse, nous avons tenté d'élucider le mystère des interactions entre certaines protéines et la NER. Entre autres, nous avons fait la lumière sur les interactions entre les protéines de la réparation des mésappariements de bases d'ADN et la NER. Dans ce cas, contrairement à ce qui avait été publié précédemment, aucune interaction n'a été montrée entre les protéines de la MMR et la NER des DCP. Cependant, comme il a été discuté, les conclusions ne sont pas aussi simples et des travaux devront encore être faits pour éclaircir l'effet des doses d'UV sur l'interaction des protéines de la MMR et la NER.

Dans le même ordre d'idées, nous avons tenté d'élucider l'importance, dans la réparation NER et dans l'activation de p21, de certaines mutations dans le gène suppresseur de tumeurs *p53*. Comme gardien du génome, p53, a un rôle très important à jouer au niveau de la préservation de l'intégrité génomique. Lorsque l'ADN est endommagé, il bloque le cycle cellulaire pour permettre sa réparation ou active l'apoptose si la cellule a subi trop de dommages. p53 est également catalyseur de la réparation car il est reconnu pour activer plusieurs gènes impliqués dans la NER suite à un stress. Son absence entraîne un ralentissement de la NER. Les mutations dans *p53* ont habituellement un effet dominant négatif, c'est-à-dire qu'une seule mutation, dans un seul allèle, amène normalement une perte de fonctionnalité de p53. Dans les cellules SW480, trois allèles de *p53* contiennent les mutations R273H et P309S. Malgré cela, la protéine p53 qui est produite est capable d'effectuer certaines tâches. Donc, ces anomalies de p53 n'empêchent pas l'activation de p21 et des gènes de la NER suite à un stress cellulaire. Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer un tel phénomène, mais des études beaucoup plus approfondies seront nécessaire pour pouvoir y voir clair.

Dans les travaux accomplis pendant mon doctorat, j'ai approfondi certains aspects de la théorie de la mutagenèse somatique. Je me suis concentré à mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la réponse cellulaire à un stress solaire. Je crois que cette thèse, en plus de soulever plusieurs interrogations, a permis de faire un peu de lumière sur certains sujets controversés et a permis l'avancement des recherches fondamentales sur le cancer.

Bibliographie (Chapitres 1 et 5)

- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes Dev* **15**(17): 2177-96.
- Armstrong, J. D. and B. A. Kunz (1992). "Photoreactivation implicates cyclobutane dimers as the major promutagenic UVB lesions in yeast." *Mutat Res* **268**(1): 83-94.
- Bae, I., S. Fan, et al. (1995). "Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells." *Cancer Res* **55**(11): 2387-93.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science* **244**(4901): 217-21.
- Barak, Y., O. Cohen-Fix, et al. (1995). "Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. Significance for UV light mutagenesis." *J Biol Chem* **270**(41): 24174-9.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 738-47.
- Bohr, V. A., C. A. Smith, et al. (1985). "DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall." *Cell* **40**(2): 359-69.
- Bourre, F., A. Benoit, et al. (1989). "Respective roles of pyrimidine dimer and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts in UV mutagenesis of simian virus 40 DNA in mammalian cells." *J Virol* **63**(11): 4520-4.
- Brash, D. E. (1997). "Sunlight and the onset of skin cancer." *Trends Genet* **13**(10): 410-4.
- Brash, D. E. and W. A. Haseltine (1982). "UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots." *Nature* **298**(5870): 189-92.
- Brash, D. E., J. A. Rudolph, et al. (1991). "A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10124-8.
- Brash, D. E., S. Seetharam, et al. (1987). "Photoproduct frequency is not the major determinant of UV base substitution hot spots or cold spots in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(11): 3782-6.
- Brash, D. E., A. Ziegler, et al. (1996). "Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion." *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**(2): 136-42.
- Carty, M. P., J. Hauser, et al. (1993). "Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts." *Mol Cell Biol* **13**(1): 533-42.
- Carty, M. P., C. W. Lawrence, et al. (1996). "Complete replication of plasmid DNA containing a single UV-induced lesion in human cell extracts." *J Biol Chem* **271**(16): 9637-47.
- Cehab, N. H., A. Malikzay, et al. (1999). "Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13777-82.
- Chen, P. L., Y. M. Chen, et al. (1990). "Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene." *Science* **250**(4987): 1576-80.
- Chin, P. L., J. Momand, et al. (1997). "In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation." *Oncogene* **15**(1): 87-99.

- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(7): 1991-5.
- Cleaver, J. E. (1968). "Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum." Nature **218**(142): 652-6.
- Clingen, P. H., C. F. Arlett, et al. (1995). "Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells." Cancer Res **55**(11): 2245-8.
- Dameron, K. M., O. V. Volpert, et al. (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." Science **265**(5178): 1582-4.
- de Gruijl, F. R. and P. D. Forbes (1995). "UV-induced skin cancer in a hairless mouse model." Bioessays **17**(7): 651-60.
- Di Leonardo, A., S. P. Linke, et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-51.
- Doetsch, P. W., T. H. Zasatawny, et al. (1995). "Monomeric base damage products from adenine, guanine, and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation." Biochemistry **34**(3): 737-42.
- Douki, T., D. Perdiz, et al. (1999). "Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role." Photochem Photobiol **70**(2): 184-90.
- Douki, T., A. Reynaud-Angelin, et al. (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation." Biochemistry **42**(30): 9221-6.
- Dridi, W., R. Fetni, et al. (2003). "The dominant-negative effect of p53 mutants and p21 induction in tetraploid G1 arrest depends on the type of p53 mutation and the nature of the stimulus." Cancer Genet Cytogenet **143**(1): 39-49.
- Drobetsky, E. A., J. Turcotte, et al. (1995). "A role for ultraviolet A in solar mutagenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(6): 2350-4.
- Drouin, R. and G.P. Holmquist (1994). UV-induced pyrimidine monoadducts and their in vivo photofootprints, in Chromosomal alterations : Origin and significance, G. Obe and A.T. Natarajan, Editors. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 10-20.
- Drouin, R., H. Rodriguez, et al. (1996). "Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications." Free Radic Biol Med **21**(3): 261-73.
- Drouin, R., H. Rodriguez, et al. (1996). Ligation-Mediated PCR for analysis of oxidative DNA damage. Technologies for detection of DNA damage and mutations. G. P. Pfeifer. New York, Plenum Press: 211-225.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, et al. (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." Cell **76**(6): 1013-23.
- Dumaz, N., C. Drougard, et al. (1993). "Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10529-33.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1995). "Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues." Cancer Res **55**(13): 2910-9.
- Evans, E., J. G. Moggs, et al. (1997). "Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors." Embo J **16**(21): 6559-73.

- Falck, J., N. Mailand, et al. (2001). "The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis." *Nature* **410**(6830): 842-7.
- Ford, J. M. and P. C. Hanawalt (1995). "Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8876-80.
- Ford, J. M. and P. C. Hanawalt (1997). "Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts." *J Biol Chem* **272**(44): 28073-80.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, et al. (1995). *DNA repair and mutagenesis*. Washington, DC, ASM Press.
- Gale, J. M., K. A. Nissen, et al. (1987). "UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(19): 6644-8.
- Gasparro, F. P. (2000). "Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy." *Environ Health Perspect* **108 Suppl 1**: 71-8.
- Gibbs, P. E. and C. W. Lawrence (1993). "U-U and T-T cyclobutane dimers have different mutational properties." *Nucleic Acids Res* **21**(17): 4059-65.
- Hann, B. C. and D. P. Lane (1995). "The dominating effect of mutant p53." *Nat Genet* **9**(3): 221-2.
- Holmquist, G. P. and S. Gao (1997). "Somatic mutation theory, DNA repair rates, and the molecular epidemiology of p53 mutations." *Mutat Res* **386**(1): 69-101.
- Honigsmann, H., R. M. Szeimies, et al. (1999). Photochemotherapy and photodynamic therapy. *Dermatology in General Medicine*. F. I.M. McGraw-Hill, New-York: 280-289.
- Hutchinson, F. (1994). "Induction of tandem-base change mutations." *Mutat Res* **309**(1): 11-5.
- Jiang, N. and J. S. Taylor (1993). "In vivo evidence that UV-induced C-->T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products." *Biochemistry* **32**(2): 472-81.
- Johnsson, N. (2002). "A split-ubiquitin-based assay detects the influence of mutations on the conformational stability of the p53 DNA binding domain in vivo." *FEBS Lett* **531**(2): 259-64.
- Kastan, M. B. and D. S. Lim (2000). "The many substrates and functions of ATM." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 179-86.
- Kern, S. E., J. A. Pietenpol, et al. (1992). "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression." *Science* **256**(5058): 827-30.
- Kielbassa, C., L. Roza, et al. (1997). "Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light." *Carcinogenesis* **18**(4): 811-6.
- Kim, J. K. and B. S. Choi (1995). "The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement." *Eur J Biochem* **228**(3): 849-54.
- Kim, J. K., D. Patel, et al. (1995). "Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity." *Photochem Photobiol* **62**(1): 44-50.
- Kreutzer, D. A. and J. M. Essigmann (1998). "Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3578-82.

- Kuluncsics, Z., D. Perdiz, et al. (1999). "Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts." J Photochem Photobiol B **49**(1): 71-80.
- Kvam, E. and R. M. Tyrrell (1997). "Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation." Carcinogenesis **18**(12): 2379-84.
- Leadon, S. A. and A. V. Avrutskaya (1997). "Differential involvement of the human mismatch repair proteins, hMLH1 and hMSH2, in transcription-coupled repair." Cancer Res **57**(17): 3784-91.
- Leadon, S. A. and A. V. Avrutskaya (2003). "Differential involvement of the human mismatch repair proteins, hMLH1 and hMSH2, in transcription-coupled repair." Cancer Res **63**(13): 3846.
- Lebkowski, J. S., S. Clancy, et al. (1985). "The lacI shuttle: rapid analysis of the mutagenic specificity of ultraviolet light in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8606-10.
- LeClerc, J. E., A. Borden, et al. (1991). "The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9685-9.
- Lee, D. F., R. Drouin, et al. (2004). "Detection of an involvement of the human mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells." Cancer Res **64**(11): 3865-70.
- Lehmann, A. R. (2003). "DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy." Biochimie **85**(11): 1101-11.
- Leibovitz, A., J. C. Stinson, et al. (1976). "Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines." Cancer Res **36**(12): 4562-9.
- Lin-Lee, Y. C., S. Tatebe, et al. (2001). "Differential sensitivities of the MRP gene family and gamma-glutamylcysteine synthetase to prooxidants in human colorectal carcinoma cell lines with different p53 status." Biochem Pharmacol **61**(5): 555-63.
- Lippke, J. A., L. K. Gordon, et al. (1981). "Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3388-92.
- Liu, L., Y. Nakatsuru, et al. (2002). "Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer." Clin Cancer Res **8**(9): 2985-91.
- Lober, G. and L. Kittler (1977). "Selected topics in photochemistry of nucleic acids. Recent results and perspectives." Photochem Photobiol **25**(2): 215-33.
- Marks, R. (2000). "Epidemiology of melanoma." Clin Exp Dermatol **25**(6): 459-63.
- Matsushashi, N., M. Saio, et al. (2004). "p53 dependence and apoptosis in response to FP treatment with p53-transfected colon cancer cell lines by use of thin layer collagen gel." Oncol Rep **12**(2): 357-61.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980). "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages." Methods Enzymol **65**(1): 499-560.
- McGregor, W. G., R. H. Chen, et al. (1991). "Cell cycle-dependent strand bias for UV-induced mutations in the transcribed strand of excision repair-proficient human fibroblasts but not in repair-deficient cells." Mol Cell Biol **11**(4): 1927-34.

- Mellon, I. and G. N. Champe (1996). "Products of DNA mismatch repair genes mutS and mutL are required for transcription-coupled nucleotide-excision repair of the lactose operon in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1292-7.
- Mellon, I., D. K. Rajpal, et al. (1996). "Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes." Science **272**(5261): 557-60.
- Mellon, I., G. Spivak, et al. (1987). "Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene." Cell **51**(2): 241-9.
- Miller, J. H. (1983). "Mutational specificity in bacteria." Annu Rev Genet **17**: 215-38.
- Milner, J. and E. A. Medcalf (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." Cell **65**(5): 765-74.
- Mitchell, D. L., D. E. Brash, et al. (1990). "Rapid repair kinetics of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts in human cells are due to excision rather than conformational change." Nucleic Acids Res **18**(4): 963-71.
- Mitchell, D. L., J. Jen, et al. (1992). "Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation." Nucleic Acids Res **20**(2): 225-9.
- Mitchell, D. L. and R. S. Nairn (1989). "The biology of the (6-4) photoproduct." Photochem Photobiol **49**(6): 805-19.
- Molinari, M., C. Mercurio, et al. (2000). "Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis." EMBO Rep **1**(1): 71-9.
- Mu, D., D. S. Hsu, et al. (1996). "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease." J Biol Chem **271**(14): 8285-94.
- Mu, D., C. H. Park, et al. (1995). "Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system." J Biol Chem **270**(6): 2415-8.
- Mueller, P. R. and B. Wold (1989). "In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR." Science **246**(4931): 780-6.
- Mullauer, L., P. Gruber, et al. (2001). "Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease." Mutat Res **488**(3): 211-31.
- Nataraj, A. J., J. C. Trent, 2nd, et al. (1995). "p53 gene mutations and photocarcinogenesis." Photochem Photobiol **62**(2): 218-30.
- Nishimori, H., T. Shiratsuchi, et al. (1997). "A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis." Oncogene **15**(18): 2145-50.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, et al. (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." Science **253**(5020): 665-9.
- Nyberg, K. A., R. J. Michelson, et al. (2002). "Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints." Annu Rev Genet **36**: 617-56.
- O'Donnell, R. E., R. J. Boorstein, et al. (1994). "Effect of pH and temperature on the stability of UV-induced repairable pyrimidine hydrates in DNA." Biochemistry **33**(33): 9875-80.
- Parris, C. N. and K. H. Kraemer (1993). "Ultraviolet-induced mutations in Cockayne syndrome cells are primarily caused by cyclobutane dimer photoproducts while repair of other photoproducts is normal." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7260-4.
- Paulovich, A. G. and L. H. Hartwell (1995). "A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage." Cell **82**(5): 841-7.

- Pehrson, J. R. (1989). "Thymine dimer formation as a probe of the path of DNA in and between nucleosomes in intact chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(23): 9149-53.
- Pehrson, J. R. (1995). "Probing the conformation of nucleosome linker DNA in situ with pyrimidine dimer formation." J Biol Chem **270**(38): 22440-4.
- Pehrson, J. R. and L. H. Cohen (1992). "Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation." Nucleic Acids Res **20**(6): 1321-4.
- Peng, W. and B. R. Shaw (1996). "Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions." Biochemistry **35**(31): 10172-81.
- Perdiz, D., P. Grof, et al. (2000). "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis." J Biol Chem **275**(35): 26732-42.
- Pfeifer, G. P. (1997). "Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment." Photochem Photobiol **65**(2): 270-83.
- Pfeifer, G. P., R. Drouin, et al. (1991). "In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(4): 1374-8.
- Pfeifer, G. P., R. Drouin, et al. (1992). "Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo." Mol Cell Biol **12**(4): 1798-804.
- Pfeifer, G. P., S. D. Steigerwald, et al. (1989). "Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR." Science **246**(4931): 810-3.
- Price, B. D. and M. B. Youmell (1996). "The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage." Cancer Res **56**(2): 246-50.
- Protic-Sabljić, M., N. Tuteja, et al. (1986). "UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells." Mol Cell Biol **6**(10): 3349-56.
- Purmal, A. A., Y. W. Kow, et al. (1994). "Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro." Nucleic Acids Res **22**(1): 72-8.
- Robert, C., B. Muel, et al. (1996). "Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line." J Invest Dermatol **106**(4): 721-8.
- Rochette, P. J., N. Bastien, et al. (2002). "Human cells bearing homozygous mutations in the DNA mismatch repair genes hMLH1 or hMSH2 are fully proficient in transcription-coupled nucleotide excision repair." Oncogene **21**(37): 5743-52.
- Rodrigues, N. R., A. Rowan, et al. (1990). "p53 mutations in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7555-9.
- Rosen, J. E., A. K. Prahalad, et al. (1996). "8-Oxodeoxyguanosine formation in the DNA of cultured cells after exposure to H₂O₂ alone or with UVB or UVA irradiation." Photochem Photobiol **64**(1): 117-22.
- Roy, R., L. Schaeffer, et al. (1994). "The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH." J Biol Chem **269**(13): 9826-32.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips, et al. (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 332-7.
- Sage, E. (1993). "Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context." Photochem Photobiol **57**(1): 163-74.

- Sage, E., E. Cramb, et al. (1992). "The distribution of UV damage in the *lacI* gene of *Escherichia coli*: correlation with mutation spectrum." *Mutat Res* **269**(2): 285-99.
- Sage, E., B. Lamolet, et al. (1996). "Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1): 176-80.
- Sancar, A. (1994). "Structure and function of DNA photolyase." *Biochemistry* **33**(1): 2-9.
- Sancar, A. (2003). "Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors." *Chem Rev* **103**(6): 2203-37.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., et al. (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.
- Schaeffer, L., V. Moncollin, et al. (1994). "The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor." *Embo J* **13**(10): 2388-92.
- Schaeffer, L., R. Roy, et al. (1993). "DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor." *Science* **260**(5104): 58-63.
- Setlow, R. B. and W. L. Carrier (1966). "Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's." *J Mol Biol* **17**(1): 237-54.
- Sharma, S., I. Schwarte-Waldhoff, et al. (1993). "Functional interaction of wild-type and mutant p53 transfected into human tumor cell lines carrying activated ras genes." *Cell Growth Differ* **4**(10): 861-9.
- Siede, W., A. S. Friedberg, et al. (1994). "Characterization of G1 checkpoint control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* following exposure to DNA-damaging agents." *Genetics* **138**(2): 271-81.
- Smerdon, M. J. (1991). "DNA repair and the role of chromatin structure." *Curr Opin Cell Biol* **3**(3): 422-8.
- Srivastava, S., S. Wang, et al. (1993). "Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis." *Cancer Res* **53**(19): 4452-5.
- Sutherland, J. C. and K. P. Griffin (1981). "Absorption spectrum of DNA for wavelengths greater than 300 nm." *Radiat Res* **86**(3): 399-409.
- Tessman, I., S. K. Liu, et al. (1992). "Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: mostly error-free processing of deaminated cytosine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(4): 1159-63.
- Therrien, J. P., R. Drouin, et al. (1999). "Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15038-43.
- Therrien, J. P., M. Loignon, et al. (2001). "Ablation of p21^{waf1/cip1} expression enhances the capacity of p53-deficient human tumor cells to repair UVB-induced DNA damage." *Cancer Res* **61**(9): 3781-6.
- Thilly, W. G. (1983). "Analysis of chemically induced mutation in single cell populations." *Basic Life Sci* **23**: 337-78.
- Todo, T. (1999). "Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family." *Mutat Res* **434**(2): 89-97.
- Todo, T., H. Takemori, et al. (1993). "A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts." *Nature* **361**(6410): 371-4.
- Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (1995). "UV light as a footprinting agent: modulation of UV-induced DNA damage by transcription factors bound at the promoters of three human genes." *J Mol Biol* **249**(4): 714-28.

- Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (1996). "UV damage and repair mechanisms in mammalian cells." Bioessays **18**(3): 221-8.
- Tornaletti, S., D. Rozek, et al. (1993). "The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer." Oncogene **8**(8): 2051-7.
- Travers, A. A. (1989). "DNA conformation and protein binding." Annu Rev Biochem **58**: 427-52.
- Tyrrell, R. M. and S. M. Keyse (1990). "New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells." J Photochem Photobiol B **4**(4): 349-61.
- Unsal-Kacmaz, K., A. M. Makhov, et al. (2002). "Preferential binding of ATR protein to UV-damaged DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6673-8.
- Urbach, F. (1993). "Environmental risk factors for skin cancer." Recent Results Cancer Res **128**: 243-62.
- van Hoffen, A., J. Venema, et al. (1995). "Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts." Embo J **14**(2): 360-7.
- Venema, J., A. van Hoffen, et al. (1991). "Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes." Mol Cell Biol **11**(8): 4128-34.
- Wang, C., J. Eshleman, et al. (1996). "Spontaneous apoptosis in human colon tumor cell lines and the relation of wt p53 to apoptosis." Chin Med J (Engl) **109**(7): 537-41.
- Wang, C. I. and J. S. Taylor (1991). "Site-specific effect of thymine dimer formation on dAn.dTn tract bending and its biological implications." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9072-6.
- Wang, S. Y. (1965). "Photochemical Reactions of Nucleic Acid Components in Frozen Solutions." Fed Proc **24**: S71-9.
- Wellinger, R. E. and F. Thoma (1997). "Nucleosome structure and positioning modulate nucleotide excision repair in the non-transcribed strand of an active gene." Embo J **16**(16): 5046-56.
- Yang, B., P. J. Stambrook, et al. (1996). "Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest." Clin Cancer Res **2**(10): 1639-47.
- Yoshikawa, R., M. Kusunoki, et al. (2001). "Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy." Cancer Res **61**(3): 1029-37.
- Zdzienicka, M. Z., J. Venema, et al. (1992). "(6-4) photoproducts and not cyclobutane pyrimidine dimers are the main UV-induced mutagenic lesions in Chinese hamster cells." Mutat Res **273**(1): 73-83.
- Zhan, Q., I. T. Chen, et al. (1998). "Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding." Mol Cell Biol **18**(5): 2768-78.
- Zhang, X., B. S. Rosenstein, et al. (1997). "Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells." Photochem Photobiol **65**(1): 119-24.
- Zhang, Y. and Y. Xiong (2001). "A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation." Science **292**(5523): 1910-5.

Zhao, H. and H. Piwnica-Worms (2001). "ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1." Mol Cell Biol **21**(13): 4129-39.

Annexe 1: Pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct mapping after sub-lethal UVC doses: nucleotide resolution using terminal transferase-dependent PCR.

(Soumis à la revue « Photochemistry and Photobiology », le 2 décembre 2004)

Pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct mapping after sub-lethal UVC doses: nucleotide resolution using terminal transferase-dependent PCR.

Patrick J ROCHETTE, Nathalie BASTIEN & Régen DROUIN*

Division of Pathology, Department of Medical Biology, Université Laval, Québec, PQ, Canada
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, & Service of Medical Genetics, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, PQ, Canada

* To whom correspondence should be addressed at:

Dr. Régen Drouin
Dept of Pediatrics
Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS),
Hospital Fleurimont,
3001, 12th Avenue North
Sherbrooke, Quebec
Canada J1H 5N4.
Tel.: (819) 820-6827
Fax: (819) 564-5217
Email: Regen.Drouin@USherbrooke.ca

† *Abbreviations:* 6-4PP, pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; LMPCR, ligation-mediated polymerase chain reaction; NER, nucleotide excision repair; TDPCR, terminal transferase-dependent polymerase chain reaction; UV, ultraviolet.

Abstract

Irradiation of genomic DNA with UVC induces two main types of potentially mutagenic base modifications: cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and the less frequent (15-30% of CPD levels) pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PP). Ligation-mediated PCR (LMPCR), a genomic sequencing technique, allows CPD mapping at nucleotide resolution following irradiation with sub-lethal doses of UVB or UVC for most cell types. In contrast, a dose of 80 J/m² of UVC that is lethal for the majority of cell types, is necessary to map 6-4PP by the LMPCR technique. This compromise the use of LMPCR to study the repair of 6-4PP. To date, no other techniques have been developed to study 6-4PP repair at nucleotide resolution. We have therefore adapted a recently developed technique for the mapping of 6-4PP: terminal transferase-dependent PCR (TDPCR). TDPCR is in many ways similar to LMPCR. This technique is more sensitive and allows the mapping of 6-4PP at UVC doses as low as 10 J/m² in genomic DNA and in living cells.

Introduction

Skin cancer, the most common and rapidly increasing human neoplasm, is associated with exposure to the ultraviolet (UV) component of sunlight (1, 2). UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm), and UVA (320-400 nm) induce mainly cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) (3-5). CPD are formed when a covalent bond is created between carbons 5 and 6 of two adjacent pyrimidines. In addition to CPD, UVB and UVC produced also pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PP), less frequently (15-30% of CPD levels), by the formation of a covalent bond between carbons 4 and 6 of two adjacent pyrimidines (6). Both of these lesions can be misinstructional during replicative bypass, leading to the fixation of the mutation (7-9). Mutations can occur in tumor suppressor genes, such as p53, contributing to tumor initiation and promotion in non-melanoma skin cancer (10-12).

Both classes of photoproducts can be mapped at nucleotide resolution by ligation-mediated PCR (LMPCR) following their enzymatic or chemical cleavage to single-strand breaks with 5'-phosphate termini. Prior to LMPCR, CPD are specifically cleaved using T4 endonuclease V followed by photoreactivation with CPD photolyase to remove the 5'-overhanging base, whereas 6-4PP are cleaved using hot piperidine treatment (13-16). This chemical treatment produces a high background of breaks since it cleaves, in addition to 6-4PP, oxidative damage. Unfortunately, it does not cleave the Dewar valence isomer of 6-4PP and 6-4PP with the same efficiency (17, 18). This increased background makes detection of 6-4PP by LMPCR less sensitive. Indeed, the background is too high to map 6-4PP at UV doses below 80 J/m^2 , making it impossible to study repair of 6-4PP (16). In contrast, the very specific enzymatic conversion of CPD by T4 endonuclease V makes possible the detection of CPD at UVC doses below 12 J/m^2 (19, 20).

In this paper, we adapted and optimized a new technique for 6-4PP mapping: Terminal transferase-dependent PCR (TDPCR) (21). TDPCR is in many ways similar to LMPCR, but unlike LMPCR, it is not necessary to cleave the damage to generate a phosphorylated 5'-end, prior to primer extension. The principle of TDPCR is based on the incapacity of DNA polymerase to polymerize over certain kinds of damage, like CPD and (6-4)PP (Figure 1). We have adapted TDPCR to map 6-4PP following sub-lethal doses of UVC for several cell types. This will permit the study of repair of 6-4PP in living cells.

Material and Methods

UV irradiation of cellular and purified DNA.

The phenol/chloroform purified human DNA (*in vitro*) or normal human fibroblasts (*in vivo*) were UVC irradiated on ice. Prior to irradiation, purified DNA was dissolved at a concentration of 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in irradiation buffer (150 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4). For fibroblasts, prior to irradiation, medium was replaced by 0.9% NaCl. The UVC light source consisted of one germicidal tube (TUV 15 W G 15 T8, Phillips) delivering 254-nm UV at 6.25 $\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$. UV doses varied from 10 to 1000 J/m^2 . For doses below 100 J/m^2 , germicidal lamp was partially covered with aluminum foil delivering 0.65 $\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$.

Preparation of irradiated DNA for TDPCR and LMPCR.

UVC irradiation induces CPD and 6-4PP. CPD were photoreactivated using *E. Coli* CPD photolyase (kindly provided by Dr Aziz Sancar), to leave only 6-4PP. The CPD photoreactivation mix (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM DTT, 0.2 mg/mL BSA, 0.1 μL CPD photolyase) was added to a 10 μg of DNA for a final concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and put under UVA light for 1 h (15, 16, 22). 6-4PP were photoreactivated using *Xenopus* 6-4 photolyase (23). 6-4 photolyase has to be first deoxygenated under UVA lamp for 30 min in the deoxygenation mix (5 mM DTT, 10 mM

Tris-Cl pH 7.6). After the deoxygenation of 6-4 photolyase, the DNA containing 20 mM NaCl, 2 mM EDTA and 10% glycerol was added in the tube and the resulting mix was put under UVA lamp for 1 h. After enzyme treatment, the DNA was purified by phenol/chloroform extraction, ethanol precipitated and was dissolved in H₂O at a concentration of 0.2 µg/µL. For LMPCR, DNA has to be processed to generate ligatable DNA strand breaks. After photoreactivation of CPD by CPD photolyase, 6-4PP were cleaved and converted to single-strand breaks with hot piperidine (Sigma, Oakville, ON, Canada) treatment. 50 µL of 2 M piperidine was added to 50 µg of DNA at a concentration of 1 µg/µL and was heated at 82°C for 30 min. Then, this mix was ethanol precipitated and dissolved in water at 0.2 µg/µL. 6-4PP frequency in the total genomic DNA was determined using a denaturing glyoxal/DMSO 1.2% agarose gel after hot piperidine cleavage of the 6-4PP (24).

Linker and primers.

TDPCR linker with his 3' aminopentyl blocking group was generated exactly as previously described (21). Oligonucleotide primer sets used for the mapping of 6-4PP by LMPCR and TDPCR were specific for (i) human *c-jun* promoter (primers JE (spanning position +7 - +203 of the lower strand) and JF (position +220 - +24, upper strand)) (25) and (ii) p53 gene (primers 5 (spanning position +12370 - +12170 of the upper strand) and 7 (Position +13258 - +13058, upper strand)) (26).

TDPCR.

TDPCR is an extremely sensitive genomic sequencing method because it utilizes a single-sided exponential amplification PCR step. TDPCR was essentially performed as previously described (21) with minor modifications. Oligonucleotide primer 1 was annealed to 1.0 µg of DNA and then extended using *pfu exo-* DNA polymerase. The number of primer extension cycles varied from 1 to 30, were performed as described before (21). Extension of the primer is blocked by an adduct (6-4PP or CPD). After these primer

extension cycles, 20 μ L of each sample was transferred into another tube and was ethanol precipitated after the addition of 80 μ L of a solution composed of 2.5 M ammonium acetate, 2.5 mM EDTA and 2 μ g glycogen. The precipitate was dissolved in 10 μ L of TE 0.1X (1 mM Tris pH 7.4, 0.1 mM EDTA). The addition of ribo-guanosine tail was performed on newly synthesized strands (21). The oligonucleotide linker was then ligated to the ribo-tailed ends of the primer extended molecules. After ligation, DNA fragments were amplified with Taq polymerase using the 25-mer of the linker and a gene-specific PCR primer (primer 2) under conditions given previously (27). After 21 cycles of PCR amplification, samples were phenol/chloroform extracted, ethanol precipitated and the amplified fragments were separated on 8% polyacrylamide gels containing 7 M urea (60 cm height x 0,4 cm thick) (22). The samples were run until the xylene cyanol dye reached the bottom of the sequencing gel, and the bottom 40 cm of the gel was electroblotted onto nylon membrane by using a semi-dry electrotransfer device. The sequences were visualized by autoradiography and phosphorimager after hybridization with gene-specific 32 P-labeled probe (synthesized by PCR with primer 3 (15, 16, 22, 28)).

Each experimental sample using UV-irradiated DNA was done in duplicate. A screening gel for which about half of the sample was loaded was carried out. If there was no significant variation between samples of the duplicate, both samples were pooled and a combined gel was done. On the final autoradiogram, each band represents a nucleotide position of a 6-4PP or CPD, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position. The TDPCR preserves the quantitative representation of each fragment of the sequence ladder in the original population of molecules containing 6-4PP or CPD and each sequence ladder can be amplified very reproducibly. The band intensity was quantified by phosphorimager, Fuji BAS 1000 (Fuji Medical Systems USA Inc., Stamford, CT). The nylon membranes were exposed to phosphor-sensitive imaging plate (type III-s).

Because the Maxam-Gilbert sequencing by TDPCR is difficult to read, the sequencing was done by LMPCR (see technique below).

LMPCR.

The unique aspect of LMPCR is the blunt-end ligation of an asymmetric (5'-overhang to avoid self-ligation or ligation in the wrong direction) double-stranded linker onto the 5'-end of each nicked DNA molecule. The blunt end is created by the extension of primer 1 until a strand break is reached. This allows exponential PCR amplification, which requires a separate primer at each end of the region of interest, using the longer oligonucleotide of the linker (linker-primer) and a second nested gene-specific primer (primer 2). After 21 amplification cycles, resulting DNA fragments are size-fractionated on a sequencing gel, electroblotted onto a nylon membrane and hybridized to a single-stranded gene-specific ³²P-labeled probe exactly as described for TDPCR.

The DNA for Maxam-Gilbert cleavage reactions was carried out as usual (27, 29). The DNA for A lane was treated with K₂PdCl₄ at pH 2.0 followed by piperidine treatment (30). Sequence standards contain 1 µg of human leukocyte DNA chemically cleaved to 0.2 kb.

Results

Principle of TDPCR

Figure 1 shows a schematic representation of the TDPCR and LMPCR procedures. In the TDPCR procedure, primer extension is repeated to produce multiple copies of the template strands. To amplify these single-stranded DNA fragments by PCR, a linker has to be added to the 3' end. Terminal transferase was used to add a controlled number of rGTP to the 3' end. Because rGTP is not the preferred substrate of terminal transferase, it limits the tailing to just a few residues. Under the conditions we used, an average of only 3 nucleotides are added (21). It is important to note that in the TDPCR procedure, PCR is accomplished on the newly synthesized strands whereas in LMPCR, only the old template strands participate in the PCR. In fact, in LMPCR, the primer extension step is used only to provide a blunt end for each fragment to which a linker is ligated. In contrast, in TDPCR, the primer extension generates multiple copies of template DNA on which the linker is ligated.

How many primer extension cycles are optimal?

Vent exo- DNA polymerase was originally used in the TDPCR technique (21). Results published in our lab showed that *pfu exo-* is more efficient than *vent exo-* for primer extension in LMPCR (31). In an attempt to optimize the TDPCR technique, we replaced *vent exo-* with *pfu exo-* DNA polymerase for the primer extension cycles. Figure 2 illustrates the effect of repeating the first primer extension 1 to 30 times using *pfu exo-* DNA polymerase. The signal increased in proportion to the number of times the primer extension was repeated. However, the noise also increased. To measure the signal to noise ratio quantitatively, we measured the signal intensity of several bands (closed arrows in figure 2a) and compared them with several background bands (open arrows in figure 2). A graphical representation of this analysis is shown in figure 2b. The best signal to noise ratio is achieved with 4 primer extension cycles.

Using CPD photolyase after UV irradiation, does TDPCR map only 6-4PP?

UV radiation induces two main types of damage, i.e. CPD and 6-4PP. Both damage block DNA polymerase and then can be mapped without distinction by TDPCR. Some organisms use photolyase to photoreactivate UV-induced damage. Once cloned and isolated, photolyases can be used to repair their respective damage *in vitro*. The only way to specifically study CPD or 6-4PP after UV irradiation, is to use photolyase to specifically repair CPD or 6-4PP prior to TDPCR. However, if CPD photolyase does not photoreactivate all CPD, TDPCR will map both the 6-4PP and the remaining CPD. For this reason we evaluated, using TDPCR, the efficiency of CPD and 6-4PP photolyases to photoreactivate CPD and 6-4PP, respectively. Therefore, after photoreactivation of CPD or 6-4PP, with their respective photolyases, we mapped the remaining damage by TDPCR (figure 3). Phosphorimager (Fuji BAS 1000) quantification shows that, after photoreactivation of 6-4PP by xenopus 6-4 photolyase, 89.6% of the damage remained. *E. Coli* CPD photolyase repaired 69.3% of all damage. Both photolyases together are able to repair 90% of all damage generated by 1000 J/m² of UVC, that can be mapped by TDPCR. All conditions were compared with a control irradiated but not treated with any photolyases (100% of the damage).

Is TDPCR more sensitive than LMPCR for detection of 6-4PP?

LMPCR is the only available technique to study repair at nucleotide resolution along the transcribed or the non-transcribed strand of DNA. LMPCR is known to map CPD at doses as low as 12 J/m² of UVC (16, 19). Below 20 J/m² UVC, normal human fibroblasts survive and it is then possible to study repair rates of CPD in those cells by LMPCR. In contrast, due to the unspecific conversion of 6-4PP using hot piperidine, it was not possible to study repair of 6-4PP in cells by LMPCR. The principal goal of adapting and optimizing TDPCR to map 6-4PP was to use this technique to study repair of 6-4PP in living cells (i.e. at doses of UVC less than 20 J/m²). We therefore compared the LMPCR and TDPCR

techniques for the mapping of 6-4PP at different doses, from 0 to 1000 J/m² (figure 4). The same amount of starting material was used in each reaction and the same irradiated material was used for both techniques. The DNA used for LMPCR was treated with hot piperidine whereas the DNA used for TDPCR was untreated. Quantification of 6-4PP sites (figure 4b) shows us that 80 J/m² was necessary to detect 6-4PP with LMPCR. With TDPCR, an irradiation of naked DNA and cellular DNA with less than 20 J/m² is necessary to detect 6-4PP. The values for each nucleotide (closed arrow) are corrected with background value (open arrow) to eliminate the variation due to loading. To eliminate background, each corrected values was subtracted from its corresponding non-irradiated control (NoUV) site. Each point was then compared with the 1000 J/m², taking this point as a 100% signal. In figure 4, the LMPCR part of the autoradiogram was exposed 4-fold longer. On the autoradiogram, the TDPCR signal below 80 J/m² is difficult to see. We had to overexpose the plate to be able to see it clearly but, at this exposition, the signal at 1000 J/m² saturated the plate.

Discussion

After UVC irradiation, 6-4PP are less represented than CPD (15-30% of CPD levels) (3, 6). LMPCR is used to detect both photoproducts at nucleotide resolution along the transcribed or the non-transcribed DNA strand. To perform LMPCR, DNA lesions must be converted to single-stranded breaks with a 5'-phosphate. CPD can be specifically processed by T4 endonuclease V but there is no simple enzymatic procedure to specifically cleave 6-4PP. Prokaryotic NER can be reconstituted *in vitro* by using purified UVRA, UVRB and UVRC protein and it is possible to enzymatically cleave 6-4PP with this system. However, due to his complexity, this approach is used only by a restricted number of research group (32). So far, the best way to cleave 6-4PP is by using hot piperidine treatment. Following this treatment, LMPCR does not allow the detection of 6-4PP at doses below 80 J/m^2 of UVC ((14, 16) and figure 4). At this dose, no CPD removal is observed 24 hours post-irradiation (data not published). We can speculate that 6-4PP are also not repaired after 80 J/m^2 of UVC. In view of the fact that all types of normal human cells die after UVC doses of more than 20 J/m^2 , it remains impossible to study the repair of 6-4PP with LMPCR under physiological conditions. NER proteins involved in the recognition of DNA damage (XPC/hHR23B) have an affinity for the distortion caused by adducts to DNA. 6-4PP are known to distorted the DNA double-helix more than CPD (44 degrees versus 7-9 degrees) (33). The 6-4PP are presumed to be repaired more rapidly by NER than CPD, based on several studies (34, 35), but no technique to date has allowed the determination of the repair rate of 6-4PP at nucleotide resolution.

In this paper, we adapted the TDPCR technique developed by Komura and Riggs (21) for the mapping of 6-4PP. As seen in the schematic representation of the TDPCR procedure (figure 1), the major difference between LMPCR and TDPCR is in the primer extension step. With TDPCR, it is not necessary to convert the damage into single strand breaks prior to primer extension step. An advantage of this difference is that one can repeat the primer extension cycle as much as desire and thus increase the signal virtually an unlimited amount. However, the background TDPCR signal increases more rapidly as the

number of primer extension cycles increases. Thus there is an optimal number of primer extension cycle that gives the best signal to noise ratio. This ratio differs with the DNA polymerase used. Komura and Riggs (21) tested *vent* *exo*- DNA polymerase to find that 10 cycles of primer extension gives the best signal to noise ratio. Here, we used *Pfu* *exo*- DNA polymerase and found that 4 cycles of primer extension gives us the best ratio (figure 2).

CPD and 6-4PP block *pfu* *exo*- DNA polymerase, meaning that both kinds of damage are mapped by TDPCR after UVC irradiation. Thus, the only way to map specifically 6-4PP is to repair all CPD prior to TDPCR. *E. Coli* produces a CPD photolyase to repair CPD very efficiently by photoreactivation. This enzyme, once cloned and purified, can be use *in vitro* to repair CPD. By TDPCR, we showed that CPD and 6-4PP photolyases are very efficient to repair their respective damage in our condition (figure 3).

By TDPCR with prior photoreactivation of CPD allows the mapping of 6-4PP after UVC-irradiation below 20 J/m² of naked DNA and living cells. In our hands, it could be then possible, using TDPCR, to study repair of 6-4PP along transcribed and non-transcribed strands of DNA at nucleotide level of resolution.

References

1. Brash, D. E. (1988) UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer. *Photochem Photobiol* **48**, 59-66.
2. Urbach, F. (1989) The biological effects of increased ultraviolet radiation: an update. *Photochem Photobiol* **50**, 439-441.
3. Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.
4. Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E., and Sage, E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* **275**, 26732-26742.
5. Rochette, P. J., Therrien, J. P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E. A., and Sage, E. (2003) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 2786-2794.
6. LeClerc, J. E., Borden, A., and Lawrence, C. W. (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9685-9689.
7. Protic-Sabljić, M., Tuteja, N., Munson, P. J., Hauser, J., Kraemer, K. H., and Dixon, K. (1986) UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **6**, 3349-3356.
8. Jiang, N. and Taylor, J. S. (1993) In vivo evidence that UV-induced C-->T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry* **32**, 472-481.
9. Gibbs, P. E., Borden, A., and Lawrence, C. W. (1995) The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidinone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **23**, 1919-1922.
10. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T., and Brash, D. E. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773-776.

11. Daya-Grosjean, L., Dumaz, N., and Sarasin, A. (1995) The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B* **28**, 115-124.
12. Nataraj, A. J., Trent, J. C., 2nd, and Ananthaswamy, H. N. (1995) p53 gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* **62**, 218-230.
13. Lippke, J. A., Gordon, L. K., Brash, D. E., and Haseltine, W. A. (1981) Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3388-3392.
14. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. (1991) In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1374-1378.
15. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. (1992) Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol Cell Biol* **12**, 1798-1804.
16. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. (1996) Ligation-Mediated PCR for Analysis of UV Damage. In *Technologies for detection of DNA damage and mutations* (Edited by G. P. Pfeifer), pp. 199-209. Plenum Press, New York.
17. Kan, L. S., Voituriez, L., and Cadet, J. (1992) The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidylyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: formation, alkaline lability and conformational properties. *J Photochem Photobiol B* **12**, 339-357.
18. Smith, C. A. and Taylor, J. S. (1993) Preparation and characterization of a set of deoxyoligonucleotide 49-mers containing site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidylyl(3'-->5')-thymidine. *J Biol Chem* **268**, 11143-11151.
19. Gao, S., Drouin, R., and Holmquist, G. P. (1994) DNA repair rates mapped along the human PGK1 gene at nucleotide resolution. *Science* **263**, 1438-1440.
20. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science* **263**, 1436-1438.
21. Komura, J. and Riggs, A. D. (1998) Terminal transferase-dependent PCR: a versatile and sensitive method for in vivo footprinting and detection of DNA adducts. *Nucleic Acids Res* **26**, 1807-1811.
22. Drouin, R., Therrien, J. P., Angers, M., and Ouellet, S. (2001) In vivo DNA analysis. *Methods Mol Biol* **148**, 175-219.

23. Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M., and Todo, T. (1997) Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase. *J Biol Chem* **272**, 32591-32598.
24. Drouin, R., Gao, S., and Holmquist, G. P. (1996) Agarose gel electrophoresis for DNA damage analysis. In *Technologies for detection of DNA damage and mutations* (Edited by G. P. Pfeifer), pp. 37-43. Plenum Press, New York.
25. Rozek, D. and Pfeifer, G. P. (1993) In vivo protein-DNA interactions at the c-jun promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol Cell Biol* **13**, 5490-5499.
26. Tornaletti, S., Rozek, D., and Pfeifer, G. P. (1993) The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* **8**, 2051-2057.
27. Pfeifer, G. P. and Riggs, A. D. (1993) Genomic Sequencing. In *Methods in Molecular Biology* (Edited by H. Griffin and A. Griffin), Vol. 23, pp. 169-181. Humana Press Inc. Totowa.
28. Drouin, R., Rodriguez, H., Holmquist, G. P., and Akman, S. A. (1996) Ligation-Mediated PCR for Analysis of Oxidative DNA Damage In *Technologies for detection of DNA damage and mutations* (Edited by G. P. Pfeifer), pp. 211-225. Plenum Press, New York.
29. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol* **65**, 499-560.
30. Iverson, B. L. and Dervan, P. B. (1987) Adenine specific DNA chemical sequencing reaction. *Nucleic Acids Res* **15**, 7823-7830.
31. Angers, M., Cloutier, J. F., Castonguay, A., and Drouin, R. (2001) Optimal conditions to use Pfu exo(-) DNA polymerase for highly efficient ligation-mediated polymerase chain reaction protocols. *Nucleic Acids Res* **29**, E83.
32. Zheng, Y., Hunting, D., and Tang, M. S. (1998) Cyclobutane thymine dimers with a disrupted phosphodiester bond are refractory to T4 endonuclease V digestion but have increased sensitivity to UvrABC nuclease. *Biochemistry* **37**, 3243-3249.
33. de Laat, W. L., Jaspers, N. G., and Hoeijmakers, J. H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**, 768-785.
34. Mitchell, D. L. and Nairn, R. S. (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* **49**, 805-819.
35. Mitchell, D. L., Brash, D. E., and Nairn, R. S. (1990) Rapid repair kinetics of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts in human cells are due to excision rather than conformational change. *Nucleic Acids Res* **18**, 963-971.

Acknowledgements

We thank Dr Aziz Sancar for photolyase and R. Stephen Lloyd for T4 endonuclease V. The authors are grateful to Dr Darel Hunting for critical review of the manuscript. This work was supported by grant from the National Cancer Institute of Canada (NCIC) (with funds from the Canadian Cancer Society and the Terry Fox Run) to R.D. P.J.R. holds student fellowships from the Hôpital St-François d'Assise Research Center and from the Canadian Institute for Health Research (CIHR). R.D. was research scholars (Senior level) of the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" and now holds the Canada Research Chair in « Genetics, Mutagenesis and Cancer ».

Legends

Figure 1 Schematic outline of LMPCR and TDPCR procedures

Figure 2 (a) Autoradiographic profile of the mapping of UVC-induced (1000 J/m^2) 6-4PP along the non-transcribed strand of p53 gene (exon 5) by TDPCR using different number of primer extension cycles varying from 1 to 30. After irradiation, CPD were photoreactivated by CPD photolyase. Phosphorimager analysis indicates that four cycles of primer extension using *pfu exo-* DNA polymerase gives the best signal to background ratio. Nine sites of signal (closed arrows) in comparison with 3 sites of background noise (open arrows) were analyzed. Analysis is graphically illustrated in **(b)**.

Figure 3 Autoradiographic profile of the mapping of UVC-induced (1000 J/m^2) damage along the non-transcribed strand of p53 gene (exon 5) by TDPCR done after photoreactivation of 6-4PP (photo 6-4), CPD (photo CPD) or both photolyases (photo CPD + 6-4) with their respective photolyase or without photolyase (no photo). As negative control, TDPCR was done on non-irradiated DNA (NoUV). First four lanes show LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reaction. Eleven damage sites (arrows) were quantified using phosphorimager Fuji BAS 1000.

Figure 4 (a) Comparison of TDPCR and LMPCR for the distribution of 6-4PP along the p53 gene (exon 7, upper strand) following irradiation with UVC at doses varying from 0 to 1000 J/m². After irradiation, CPD were photoreactivated by CPD photolyase. Phosphorimager analysis on 7 random sites (closed arrows) show a dose-dependent effect of the 6-4PP formation. Open arrows represent sites of background. A graphical representation of the phosphorimager analysis was done on a site that is representative of all others **(b)**. This graphical illustration clearly shows that LMPCR technique do not permit the mapping of 6-4PP after UVC-irradiation below 80 J/m². On the other side, mapping of 6-4PP below 20 J/m² is possible by TDPCR.

Figure 1

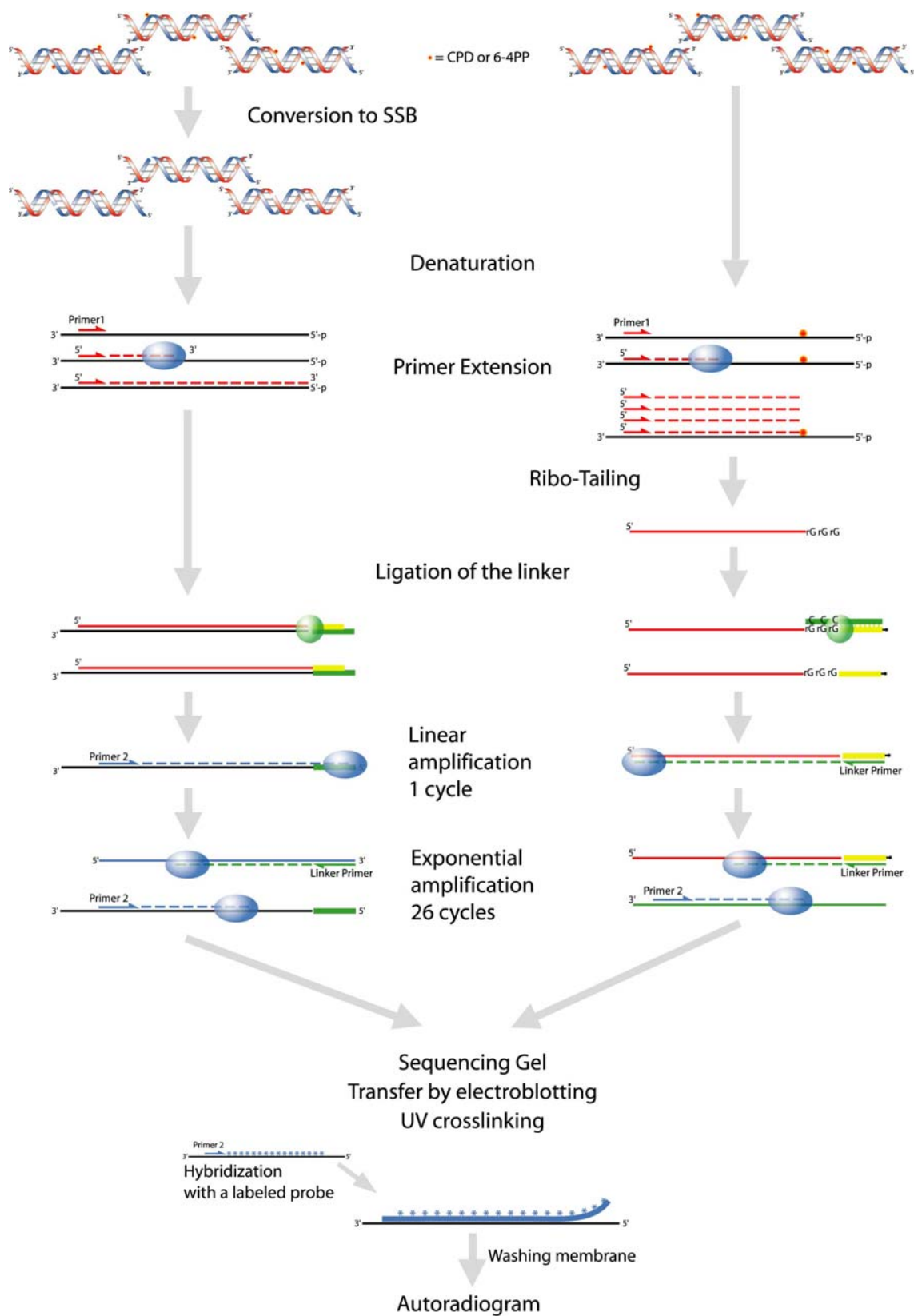


Figure 2A

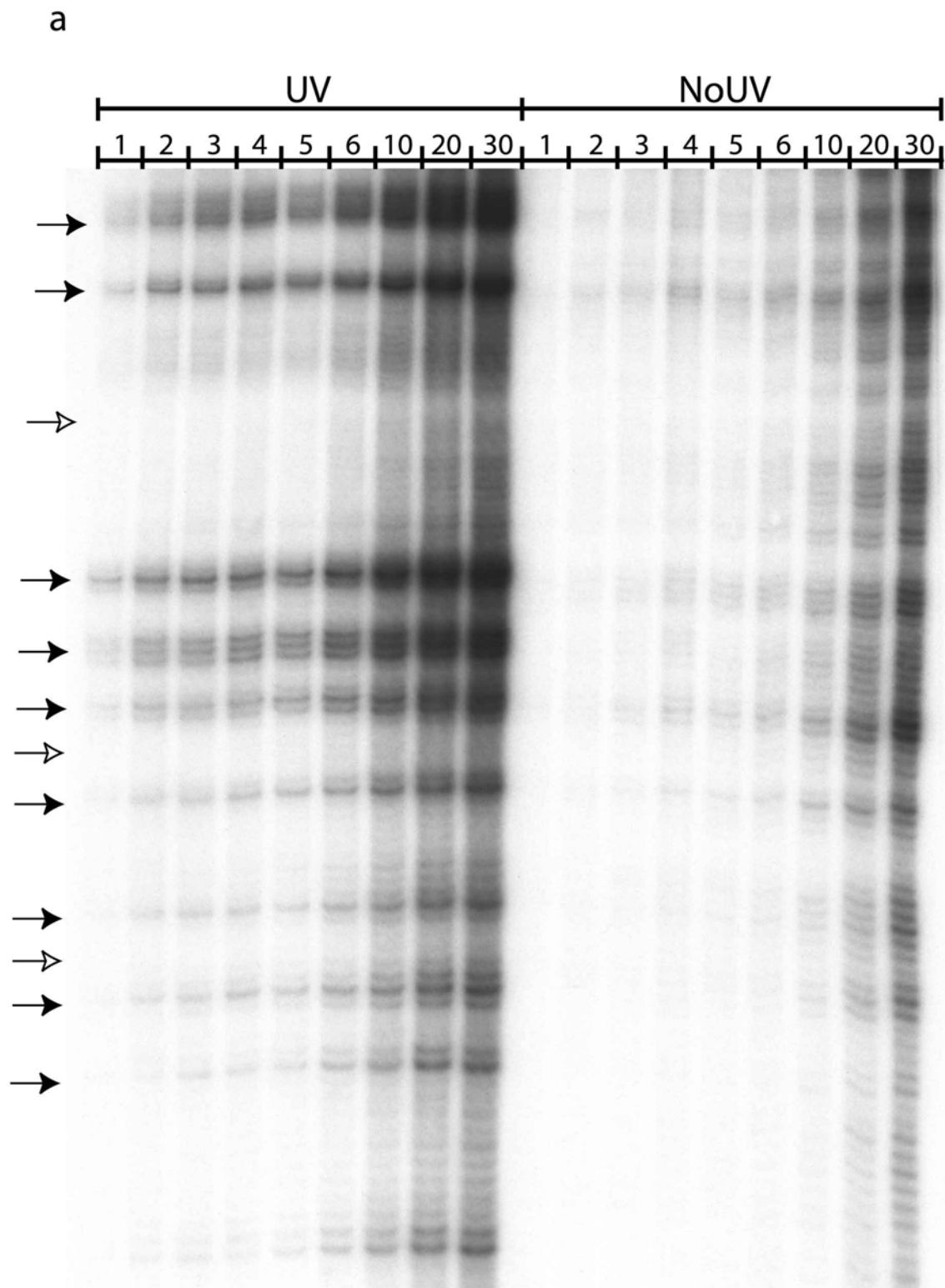


Figure 2B

b

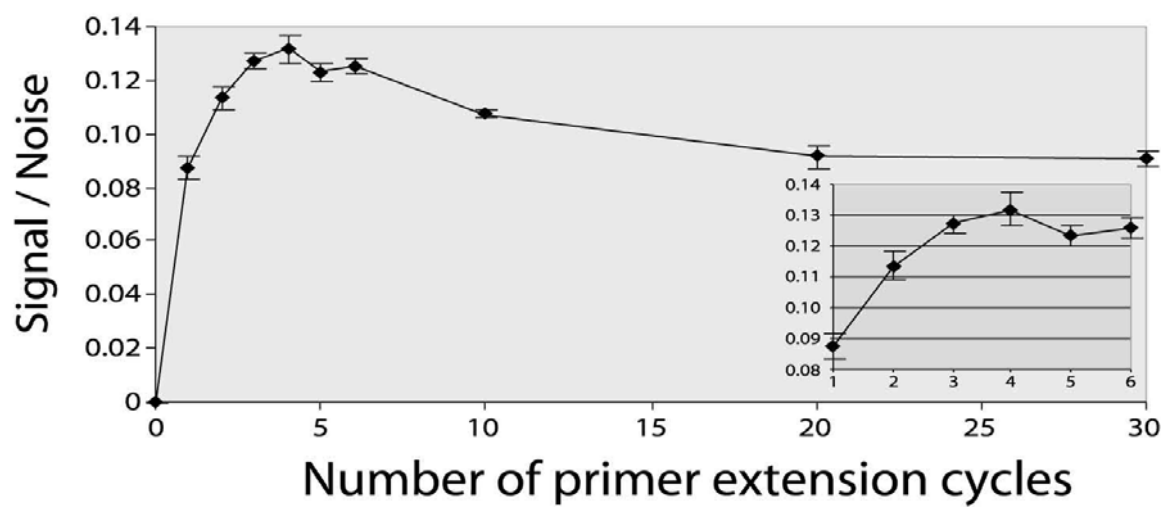


Figure 3

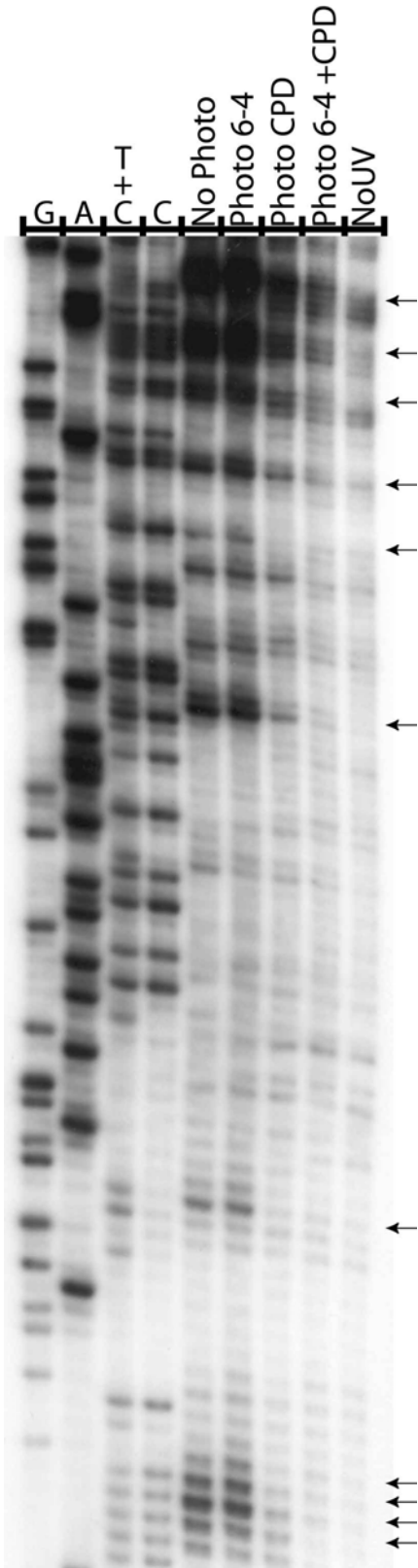


Figure 4

