

**JEAN-PHILIPPE THERRIEN**

**PHOTOCARCINOGENÈSE : DISTRIBUTION DES DIMÈRES CYCLOBUTYLIQUES DE  
PYRIMIDINES À L'ADN APRÈS IRRADIATION AUX UV ET RÔLE DE P53, pRB ET  
P21WAF1 DANS LEUR RÉPARATION PAR EXCISION DE NUCLÉOTIDES.**

**Thèse  
présentée  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)**

**Biologie Cellulaire et Moléculaire  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC**

**JUIN 2000**

**© Jean-Philippe Therrien, 2000**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

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

0-612-54033-2

**Canada**



Ce 29<sup>e</sup> jour du mois de juin 192000, les personnes soussignées, en leur qualité de membres du jury de la thèse de Jean-Philippe Therrien, ont assisté à la soutenance de cette thèse.

NOMS

UNIVERSITÉ

SIGNATURE

Dr Jean Cadet

Grenoble

Dr Marc-Edouard Menelle

Laval

Dr Madeleine Carreault

Laval

Dr Régis Drouin

Laval

## RÉSUMÉ COURT

Les tumeurs cutanées sont les cancers humains les plus fréquents et leur incidence ne cesse d'augmenter à chaque année. Ce sont les rayons UV du soleil qui sont à l'origine de la majorité de ces tumeurs. L'étude de la distribution et de la réparation des dommages générés à l'ADN par les rayons UV permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des cancers de peau. Nous avons montré en utilisant la technique "Ligation-Mediated PCR", que les dimères cyclobutyliques de pyrimidines [DCP] sont formés à une fréquence élevée, après une irradiation aux UV-B, au niveau des 8 sites du gène *p53* les plus fréquemment mutés dans les cancers de peau non-mélanocytiques. Il s'avère que les protéines p53 et possiblement pRb jouent un rôle dans la réparation des DCP formés au niveau de l'ADN après irradiation aux UV-B. De plus, le niveau basal de la protéine p21waf1 peut inhiber la réparation des DCP dans un environnement cellulaire où la protéine p53 est absente. Ces résultats représentent une contribution importante pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la mutagenèse solaire.

**JEAN-PHILIPPE THERRIEN**

**RÉGEN DROUIN**

## RÉSUMÉ LONG

Les cancers de peau représentent le type de cancer le plus fréquemment observé dans la population caucasienne. Maintenant, il n'y a plus aucun doute que ce sont les rayons UV du soleil qui sont responsables du développement de la majorité de ces cancers. Le but de notre travail était d'étudier les mécanismes moléculaires par lesquels les rayons UV amènent le développement de tumeurs cutanées. La technique "Ligation-Mediated PCR" [LMPCR] est une technique très sensible qui permet une résolution très élevée pour cartographier au niveau de la séquence nucléotidique, la distribution et la réparation des dommages formés à l'ADN dans les cellules vivantes. Grâce à cette technique, nous avons déterminé que les 8 sites dipyrimidiniques les plus fréquemment mutés du gène *p53* dans les cancers de peau non-mélanocytiques, sont aussi fréquemment endommagés par les rayons UV-B. Dans une autre étude, nous avons montré que la couche cornée et la partie supérieure de l'épiderme de la peau humaine ne protège nullement les cellules de la couche basale contre la formation de dimères cyclobutyliques de pyrimidines par les rayons UV-B du soleil. Ces résultats vont à l'encontre de la croyance populaire voulant que la couche cornée protège contre les rayons UV du soleil et ils renforcent l'utilisation d'écrans solaires comme un des meilleurs moyens de protection contre les rayons UV. Nos études faites au niveau de la régulation du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides [REN] montrent que le produit du gène *p53* joue un rôle important au niveau des deux voies de la REN, soit la TCREN [réparation couplée à la transcription] et la GREN [la réparation globale de l'ADN]. De plus, pour la première fois, nous avons montré un rôle possible de la protéine du rétinoblastome [pRb] au niveau de la réparation de l'ADN, plus particulièrement dans la GREN. Dans une autre étude, nous avons montré que l'absence de la

protéine p21waf1 favorise la réparation des DCP dans les cellules qui ne produisent pas de protéine p53. En effet, les cellules qui ne produisent pas ces deux protéines présentent une REN normale, alors que la REN était beaucoup moins efficace lorsque la protéine p21waf1 est présente à son niveau de base. En conclusion, ces résultats représentent une contribution importante pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la mutagenèse solaire. Cette compréhension est essentielle pour définir une approche efficace pour la prévention des cancers de peau.

**JEAN-PHILIPPE THERRIEN**

**/ RÉGEN DROUIN**

# **AVANT-PROPOS**

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Régen Drouin, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. De m'avoir apporté son support moral pendant ces 5 années d'études graduées qui ont été parsemées de hauts et de bas. Vos conseils judicieux, votre sens critique et votre souci de l'excellence m'ont permis de mener à bien mes différents projets de recherche. Ils m'ont aussi permis de développer mon esprit scientifique ainsi que mes habilités de communicateur scientifique. Merci Régen, je vous en serai toujours reconnaissant.

Je tiens aussi à remercier le Dr Elliot Arnold Drobetsky et le Dr Mahmoud Rouabhia pour leur collaboration à mes projets de recherche tant au niveau expérimental qu'au niveau de l'écriture d'articles scientifiques. Je tiens particulièrement à remercier le Dr Drobetsky pour m'avoir aidé, lors des nombreuses discussions que nous avons eu ensemble, à améliorer mon anglais et à préparer mes demandes de bourses post-doctorales. Cette aide m'a permis d'obtenir des réponses positives de trois organismes subventionnaires, soit le FRSQ, le CRSNG et le NCIC. Merci à vous deux!!!

Je tiens aussi à remercier les assistantes de recherche du Dr Drouin, soit : 1) Nancy Dallaire, pour m'avoir initié aux différentes techniques que j'ai eu à utiliser durant mes études graduées, plus particulièrement pour m'avoir initié à la technique LMPCR, 2) Isabelle Paradis, pour son assistance technique au niveau des différentes cultures cellulaires que j'ai dû utiliser pour mes différents projets, et finalement, et non la moindre, 3) Nathalie Bastien, pour m'avoir assisté et supporté, et ce même si c'était très tôt le matin ou très tard le soir, dans les



différentes expériences qui m'ont permis de publier dans des journaux ayant un impact élevé. Merci beaucoup à vous trois!!!

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du Dr Drouin, soit 1) du côté "Génétique Moléculaire" : Martin Angers, Jean-François Cloutier, Stéphane Ouellet, Patrick Rochette et Vickram Bissonauth (ex-étudiant du Dr Drouin) ; 2) du côté "Cytogénétique" : Josée Lavoie, Ju Yan, Walid Dridi, François Gros-Louis, Kada Krabchi, Marc Bronsard, Éric Bouchard, Claire Coté, Dominique Gagnon et Roger Brisson ; et 3) la secrétaire de l'unité de recherche en génétique humaine et moléculaire : Denise Fortier ; pour vos conseils, vos encouragements, votre soutien et finalement pour le bon temps que nous avons passé ensemble. Merci à tous!!!

Je tiens à remercier tous les organismes subventionnaires qui ont rendu possible la réalisation de mes différents projets. Ces organismes sont listés à la fin de chacun des articles dans la section "Remerciements" des chapitres II, III, IV et V ainsi que dans l'annexe I.

Finalement, je tiens à remercier mes parents Robert et Fernande, mon frère Hugo, ma sœur Geneviève et ma copine Dominique pour leurs encouragements, leur support et leur patience, ceci m'a permis de passer à travers ces 5 belles années d'études sans trop de problèmes. Merci Papa, Maman, "Le Frère", "La Sœur" et Chérie!!!

Merci encore à tous et au plaisir de vous revoir.

Jean-Philippe Therrien

*Ci-dessous, je présente la description de ma contribution et celle des co-auteurs dans l'ensemble des articles qui constitue cette thèse.*

## CHAPITRE II

Ces travaux ont été publiés dans la revue scientifique *Photochemistry & Photobiology* dans la section "Rapid Communication", cette section du journal est réservée aux contributions jugées très importantes. Ma contribution se situe au niveau de la préparation des protocoles expérimentaux, l'obtention et l'interprétation de tous les résultats publiés dans cet article. De plus, j'ai contribué de façon mineure à l'écriture de l'article et de façon plus importante au processus de révision de l'article.

## CHAPITRE III

Ces travaux ont été publiés dans la revue scientifique *Cancer Research* dans la section "Advances in Brief", cette section est réservée aux contributions jugées très importantes. De tous les auteurs, je suis le seul étudiant et ma contribution se situe au niveau de la préparation des protocoles expérimentaux, l'obtention et l'interprétation de la majorité des résultats publiés dans cet article. De plus, j'ai activement participé à l'écriture de l'article soit des sections : matériel et méthodes, résultats et légendes des figures. J'ai aussi participé au processus de révision de l'article. La peau humaine reconstruite en laboratoire par ingénierie tissulaire a été produite par le Dr Rouabhia et le simulateur solaire utilisé pour notre étude a été fourni par le Dr Drobetsky.

## CHAPITRE IV

Ces travaux ont été publiés dans la revue scientifique *Proceedings of the National Academy of Science in USA*. Ma contribution se situe au niveau la préparation des protocoles expérimentaux, l'obtention et l'interprétation de la majorité des résultats publiés dans cet article. De plus, j'ai aussi participé de façon significative à l'écriture de cet article. L'étudiante du Dr Drobetsky, Caroline Baril, a fourni les données concernant l'expression des protéines p53 et pRb dans les cellules infectées avec LXSN, E6, E7 ou E6E7.

## CHAPITRE V

Ces travaux ont été soumis pour publication dans la revue scientifique *Proceedings of the National Academy of Science in USA*. Ma contribution se situe au niveau de la préparation des protocoles expérimentaux, l'obtention et l'interprétation de tous les résultats concernant les études de réparation de l'ADN. J'ai aussi participé de façon significative à l'écriture de l'article ainsi qu'au processus de révision de l'article. L'étudiant du Dr Drobetsky, Martin Loignon, a obtenu et interprété les résultats concernant la courbe de survie clonogénique, les études sur le cycle cellulaire et les études portant sur l'apoptose pour les lignées DLD-1 p53-/-p21+/+ et DLD-1 p53-/-p21-/-.

## **TABLES DES MATIÈRES**

<b>RÉSUMÉ COURT.....</b>	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ LONG.....</b>	<b>III</b>
<b>AVANT-PROPOS.....</b>	<b>V</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>VI</b>
<b>PARTICIPATION AUX TRAVAUX.....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABLES DES MATIÈRES.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTES DES ABBRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTES DES FIGURES.....</b>	<b>XVI</b>
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LE CANCER DE PEAU.....</b>	<b>2</b>
<b>2. LES COMPOSANTES UV DES RAYONS SOLAIRES.....</b>	<b>4</b>
<b>3. LES DIFFÉRENTS TYPES DE DOMMAGES À L'ADN GÉNÉRÉS PAR         LES RAYONS UV.....</b>	<b>8</b>
<b>4. LA RÉPARATION DES DOMMAGES À L'ADN.....</b>	<b>13</b>
<b>5. LA THÉORIE DES MUTATIONS SOMATIQUES.....</b>	<b>19</b>
<b>6. LA TECHNIQUE "LIGATION-MEDIATED POLYMERASE CHAIN         REACTION" [LMPCR].....</b>	<b>23</b>
<b>7. LA PROBLÉMATIQUE ET LES OBJECTIFS.....</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE II : UVB-INDUCED CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMER         FREQUENCY CORRELATES WITH SKIN CANCER         MUTATIONAL HOTSPOTS IN P53.....</b>	<b>32</b>
<b>1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....</b>	<b>33</b>

<b>2.</b>	<b>ARTICLE.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1</b>	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3</b>	<b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES.....</b>	<b>37</b>
<b>2.4</b>	<b>RÉSULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>40</b>
<b>2.5</b>	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>44</b>
<b>2.6</b>	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>45</b>
<b>2.7</b>	<b>TABLE I.....</b>	<b>50</b>
<b>2.8</b>	<b>TABLE II.....</b>	<b>51</b>
<b>2.9</b>	<b>LÉGENDES.....</b>	<b>52</b>
<b>2.10</b>	<b>FIGURE 1A.....</b>	<b>54</b>
<b>2.11</b>	<b>FIGURE 1B.....</b>	<b>55</b>
<b>2.12</b>	<b>FIGURE 1C.....</b>	<b>56</b>
<b>2.13</b>	<b>FIGURE 2.....</b>	<b>57</b>
<b>2.14</b>	<b>FIGURE 3.....</b>	<b>58</b>

**CHAPITRE III : THE MULTILAYERED ORGANIZATION OF  
ENGINEERED HUMAN SKIN DOES NOT INFLUENCE  
THE FORMATION OF SUNLIGHT-INDUCED  
CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMERS IN CELLULAR  
DNA..... 59**

<b>1.</b>	<b>RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>2.</b>	<b>ARTICLE.....</b>	<b>61</b>
<b>2.1</b>	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>62</b>
<b>2.2</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>63</b>
<b>2.3</b>	<b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES.....</b>	<b>64</b>
<b>2.4</b>	<b>RÉSULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>67</b>
<b>2.5</b>	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>71</b>

<b>2.6</b>	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>72</b>
<b>2.7</b>	<b>LÉGENDES.....</b>	<b>75</b>
<b>2.8</b>	<b>FIGURE 1.....</b>	<b>78</b>
<b>2.9</b>	<b>FIGURE 2.....</b>	<b>79</b>
<b>2.10</b>	<b>FIGURE 3A.....</b>	<b>80</b>
<b>2.11</b>	<b>FIGURE 3B.....</b>	<b>81</b>
<b>2.12</b>	<b>FIGURE 4A.....</b>	<b>82</b>
<b>2.13</b>	<b>FIGURE 4B.....</b>	<b>83</b>

**CHAPITRE IV : 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..... 84**

<b>1.</b>	<b>RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>2.</b>	<b>ARTICLE.....</b>	<b>86</b>
<b>2.1</b>	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>87</b>
<b>2.2</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>88</b>
<b>2.3</b>	<b>MATÉRIEL &amp; MÉTHODES.....</b>	<b>91</b>
<b>2.4</b>	<b>RÉSULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>93</b>
<b>2.5</b>	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>99</b>
<b>2.6</b>	<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>100</b>
<b>2.7</b>	<b>TABLE I.....</b>	<b>105</b>
<b>2.8</b>	<b>LÉGENDES.....</b>	<b>106</b>
<b>2.9</b>	<b>FIGURE 1.....</b>	<b>108</b>
<b>2.10</b>	<b>FIGURE 2.....</b>	<b>109</b>
<b>2.11</b>	<b>FIGURE 3.....</b>	<b>110</b>
<b>2.12</b>	<b>FIGURE 4.....</b>	<b>111</b>

<b>CHAPITRE V : ABLATION OF P21WAF1 ENHANCES THE CAPACITY OF P53-DEFICIENT HUMAN TUMOUR CELLS TO REPAIR UVB-INDUCED DNA DAMAGE.....</b>	<b>112</b>
1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	113
2. ARTICLE.....	115
2.1 RÉSUMÉ.....	116
2.2 INTRODUCTION.....	117
2.3 MATÉRIEL & MÉTHODES.....	119
2.4 RÉSULTATS & DISCUSSION.....	122
2.5 REMERCIEMENTS.....	128
2.6 RÉFÉRENCES.....	129
2.7 LÉGENDES .....	133
2.8 TABLE I.....	135
2.9 FIGURE 1.....	136
2.10 FIGURE 2.....	137
2.11 FIGURE 3.....	138
2.12 FIGURE 4.....	139
2.13 FIGURE 5.....	140
2.14 FIGURE 6.....	141
<b>CHAPITRE VI : DISCUSSION &amp; CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>142</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>168</b>

## **LISTE DES ABBRÉVIATIONS ET SYMBOLES**

**ADN : Acide DésoxyriboNucléique**

**ARN : Acide RiboNucléique**

**ARN pol II : Acide RiboNucléique polymérase II**

**CBC : Carcinome Baso-Cellulaire**

**CSC : Carcinome Spino-Cellulaire**

**DCP : Dimère Cyclobutylique de Pyrimidines**

**DMS : DiMéthyl Sulfate**

**DPO : Dommage Photo-Oxidatif**

**ERCC1 : "Excision Repair Cross Complementation group-1"**

**GREN : Réparation Globale par Excision de Nucléotides au niveau du génome entier**

**hHR23B : Protéine Humaine homologue à la protéine RAD23 chez la levure**

**LMPCR : Technique "Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction"**

**LSS : Lumière Solaire Simulée**

**pb : paires de bases**

**PCNA : "Proliferating Cell Nuclear Antigen"**

**PHIT : Peau Humaine reconstruite par Ingénierie Tissulaire**

**PP(6-4) : Photoproduits Pyrimidines (6-4) pyrimidones**

**REN : Réparation par Excision de Nucléotides**

**REB : Réparation par Excision de Bases**

**RF-C : Facteur de Réplication C**

**RPA : Protéine de Réplication A**

**CS : Syndrome de Cockayne**

**CS-A : Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation A**

**CS-B : Syndrome de Cockayne du groupe de complémentation B**



**CSA** : Protéine associée au **CS**du groupe de complémentation **A**  
**CSB** : Protéine associée au **CS**du groupe de complémentation **B**  
**TCREB** : Réparation par **Excision de Bases Couplée à la Transcription**  
**TCREN** : Réparation par **Excision de Nucléotides Couplée à la Transcription**  
**TFIIH** : Facteur de **Transcription basale**  
**TTD** : **TrichoThioDystrophie**  
**TTD-A** : **TrichoThioDystrophie** du groupe de complémentation **A**  
**TTD/XPB** : **TrichoThioDystrophie** avec un phénotype **XPB**  
**TTD/XPD** : **TrichoThioDystrophie** avec un phénotype **XPD**  
**UV** : Rayons **UltraViolets**  
**XP** : **Xeroderma Pigmentosum**  
**XP-A** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **A**  
**XP-B** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **B**  
**XP-C** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **C**  
**XP-D** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **D**  
**XP-E** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **E**  
**XP-F** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **F**  
**XP-G** : **Xeroderma Pigmentosum** du groupe de complémentation **G**  
**XPA** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **A**  
**XPB** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **B**  
**XPC** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **C**  
**XPD** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **D**  
**XPE** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **E**  
**XPF** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **F**  
**XPG** : Protéine associée au **XP** du groupe de complémentation **G**

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1** : Représentation schématique du spectre des radiations électromagnétiques du soleil.
- Figure 2** : Représentation schématique de l'incidence des différents types de rayons ultraviolets émis par le soleil au niveau de la peau.
- Figure 3** : Représentation schématique des divers photoproduits induits à l'ADN par les radiations UV.
- Figure 4** : Représentation de la voie de réparation des DCP par excision de nucléotides [REN].
- Figure 5** : Représentation schématique de la théorie des mutations somatiques.
- Figure 6** : Représentation schématique des différentes étapes de la technique LMPCR.
- Figure 7** : Modèle hypothétique du mode de régulation de la voie REN par les protéines p53 et p21waf1.

**CHAPITRE I :**  
**INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## **1. LE CANCER DE PEAU**

Le premier cancer de peau fût diagnostiqué chez un marin dans la dernière décennie du XIX siècle par le Dr Unna (de Gruijl, 1999 ; Unna, 1894). Depuis, le cancer de peau est devenu le type de cancer le plus fréquemment observé chez la population caucasienne. Aux États-Unis seulement, plus de 1 million de nouveaux cas sont diagnostiqués à chaque année (Miller et Weinstock, 1994). Les facteurs de risques associés au développement d'un cancer de peau chez une personne sont : 1) un âge élevé, 2) le sexe masculin, 3) une peau qui bronze peu, 4) une peau qui brûle facilement après une exposition solaire, 5) la présence d'érythème cutané prolongé après une exposition solaire, 6) la présence de taches de rousseur, 7) une ascendance celtique, 8) des cheveux roux, blonds ou bruns clairs, 9) des yeux bleus ou de couleur pâle, 10) une peau blanche (Preston et Stern, 1992).

Les cancers de peau se subdivisent en deux catégories principales : 1) les cancers de peau non-mélanocytiques, et 2) les mélanomes. Les cancers de peau non-mélanocytiques comprennent : 1) le carcinome baso-cellulaire [CBC], et 2) le carcinome spino-cellulaire [CSC]. Les CBC et CSC originent des kératinocytes et ils sont souvent précédés par une kératose actinique, une lésion cutanée précancéreuse. Le CBC survient le plus souvent chez les Caucasiens, approximativement 500 000 nouveaux cas sont diagnostiqués par année aux États-Unis (Preston et Stern, 1992 ; Scotto et al., 1983). Approximativement 80% des CBC se développent dans les régions du cou et de la tête (Preston et Stern, 1992 ; Scotto, 1983), plus particulièrement près des paupières, des oreilles et dans la région du nez. Son traitement par chirurgie "excisionnelle" entraîne une morbidité importante au niveau du visage. Les CBC sont très invasifs

localement et leurs excision entraîne souvent une perte importante de tissus au niveau des paupières, des oreilles et du nez. Pour pallier à cette perte le patient doit avoir recours à la chirurgie plastique. Le traitement des CBC et la chirurgie plastique sont assurés par le système de santé et ils génèrent des coûts très élevés. Par exemple, en 1991, les coûts approximatifs associés aux traitements des cancers de peau au Québec s'élevaient à 8 500 000\$ (Comité de Santé Environnementale du Québec, 1995). Le CSC peut être particulièrement agressif pouvant même causer le décès, son traitement engendre aussi des coûts importants au système de santé. Environ 80% des CSC se développent au niveau des bras, du cou et de la tête (Preston et Stern, 1992 ; Scotto, 1983). Approximativement 100 000 nouveaux cas sont diagnostiqués à chaque année aux États-Unis (Preston et Stern, 1992 ; Scotto et al., 1983). De plus, il est important de noter que ces chiffres sont sous évalués, car ils sont basés uniquement sur les diagnostics confirmés par un examen pathologique et ils ne comprennent pas les lésions non-traitées ou les lésions traitées par une autre méthode que la biopsie, donc où il n'y a pas d'examen pathologique (Preston et Stern, 1992). Le mélanome qui se développe à partir des mélanocytes, est un type de cancer de peau très agressif qui a tendance à devenir métastatique très rapidement (de Gruijl, 1999). Heureusement, il est moins commun que les cancers de peau non-mélanocytiques. Par contre, c'est le type de cancers de peau responsable du plus grand nombre de décès par cancer de peau.

Selon des évidences expérimentales et des données épidémiologiques, la grande majorité des cancers de peau non-mélanocytiques sont causés par les rayons solaires, mais plus particulièrement par la composante UV-B [290 à 320 nm] [voir Figure 1] (Cole et al., 1986 ; Fitzpatrick et Sober, 1985 ; de Gruijl et van der Leun, 1991 ; Leaf, 1989 ; Scotto, 1983). La diminution de la couche

d'ozone dans l'atmosphère terrestre augmente la quantité de rayons UV-B qui atteignent la surface terrestre et par le fait même augmente le risque de développer un cancer de peau non-mélanocytaire (Preston et Stern, 1992). Il semble, selon un modèle mathématique, qu'une réduction de 1% de la couche d'ozone serait associée à une augmentation de 2 à 4 % de l'incidence des tumeurs cutanées et une augmentation plus importante des CSC que les CBC (Fears et Scotto, 1983 ; Henriksen et al., 1990 ; Kelfkens et al., 1990 ; Preston et Stern, 1992 ; Rundel, 1983 ; Scotto, 1983 ; Urbach, 1989). Il semble présentement que le meilleur moyen de prévenir le cancer de peau non-mélanocytaire est de réduire son exposition au soleil. Si l'on s'expose, éviter l'exposition au soleil du midi, utiliser des écrans solaires efficaces et suivre les recommandations du fabricant, et porter des vêtements protecteurs [chapeaux, t-shirt, etc...] (Preston et Stern, 1992).

## **2. LES COMPOSANTES UV DES RAYONS SOLAIRES**

Le soleil émet plusieurs types de rayons [voir Figure 1], soit les rayons UV, la lumière visible et les rayons infrarouges. Les rayons UV se divisent en trois types : 1) les UV-C correspondent à une longueur d'onde [ $\lambda$ ] de 100 à 280 nm, 2) les UV-B correspondent à une  $\lambda$  de 280 à 320 nm, et 3) les UV-A correspondent à une  $\lambda$  de 320 à 400 nm (Griffiths et al., 1998). La distribution, en pourcentage, des  $\lambda$  émises par le soleil avant d'être atténuées par l'atmosphère terrestre [couche d'ozone] est la suivante : 0,5% d'UV-C, 1,5% d'UV-B, 6,3% d'UV-A, 38,9% de lumière visible [ $\lambda = 400$  à 700 nm] et 52,8% de rayons infrarouges [ $\lambda > 700$  nm] (Frederick et al, 1989). La distribution des  $\lambda$  qui atteignent la surface terrestre est la suivante : 0,3% d'UV-B, 5,1% d'UV-A,

62,7% de lumière visible [ $\lambda = 400$  à  $700$  nm] et 31,9% de rayons infrarouges [ $\lambda > 700$  nm] (Piver, 1991). Ceci est dû au fait que la couche d'ozone filtre complètement les  $\lambda$  en dessous de 290 nm, partiellement les  $\lambda$  comprises entre 290 et 325 nm et elle n'a pas d'effet significatif pour les  $\lambda > 330$  nm (Frederick et al., 1989 ; Urbach, 1989). De plus, la variation de l'épaisseur de la couche d'ozone influence uniquement la quantité de radiations UV pour les  $\lambda$  variant de 290 à 325 nm qui atteignent la surface terrestre (Urbach, 1989). Donc, l'amincissement de la couche d'ozone n'a pas d'effets au niveau de la quantité de rayons UV-C et UV-A transmis jusqu'à la surface terrestre, seulement un effet pour les rayons UV-B [ $\lambda = 290$  à  $320$  nm]. Même si les rayons UV-B pénètrent moins profondément dans la peau que les rayons UV-A [Figure 2], il n'en reste pas moins que ce sont eux qui seraient à l'origine des cancers de peau non-mélanocytiques.

Les mécanismes par lesquels les rayons UV-B causent les cancers de peau non-mélanocytiques incluent : 1) la formation de dommages à l'ADN, surtout la production de dimères de pyrimidines, 2) l'inactivation du système de réparation des dommages à l'ADN [ex : Réparation par Excision de Nucléotides {REN}], 3) l'altération du système immunitaire [augmentation du nombre de suppresseurs de cellules T et diminution des fonctions des cellules T (Dellon et al., 1984 ; Frenzt et al., 1988 ; Preston et Stern, 1992)].

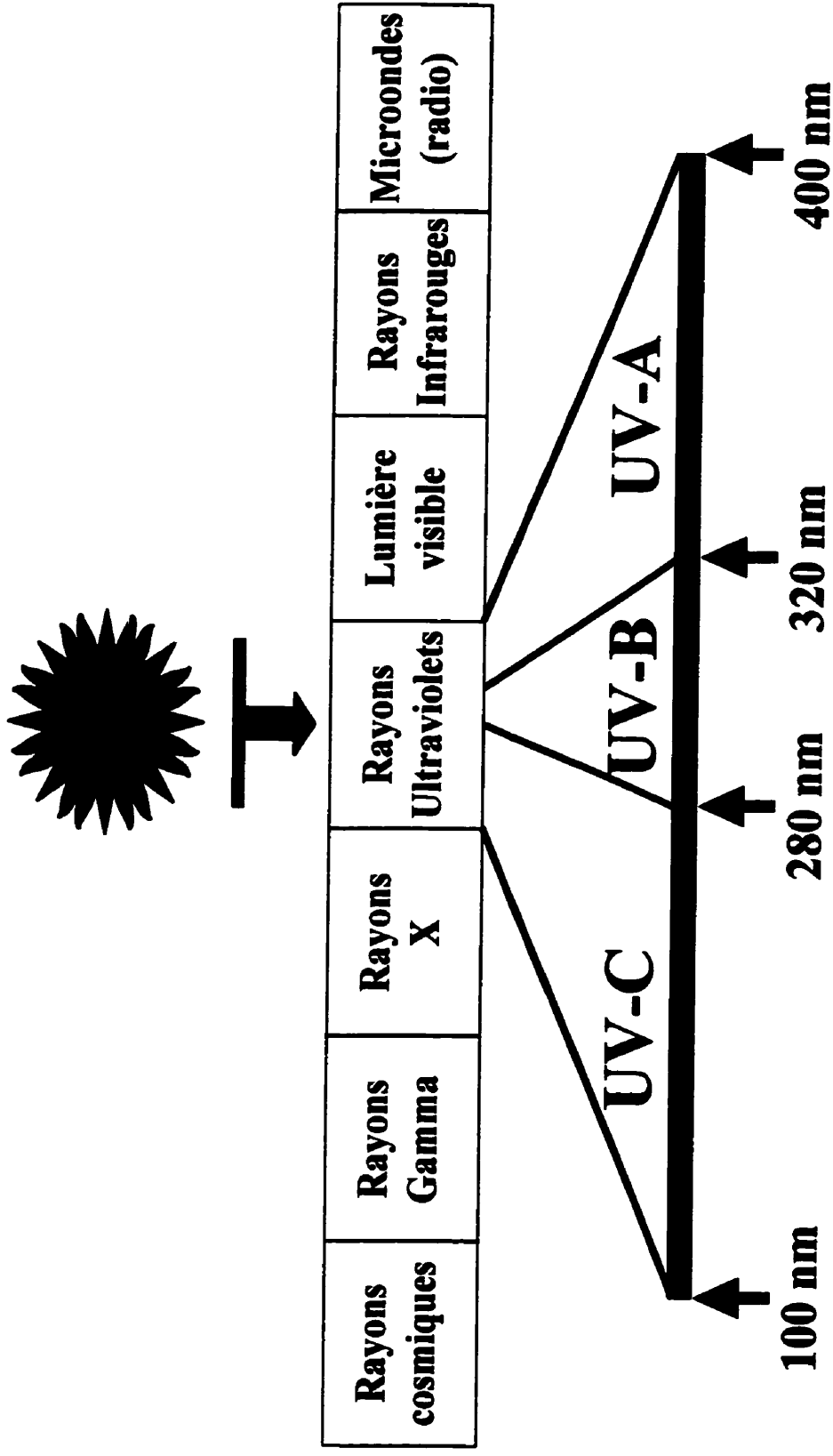
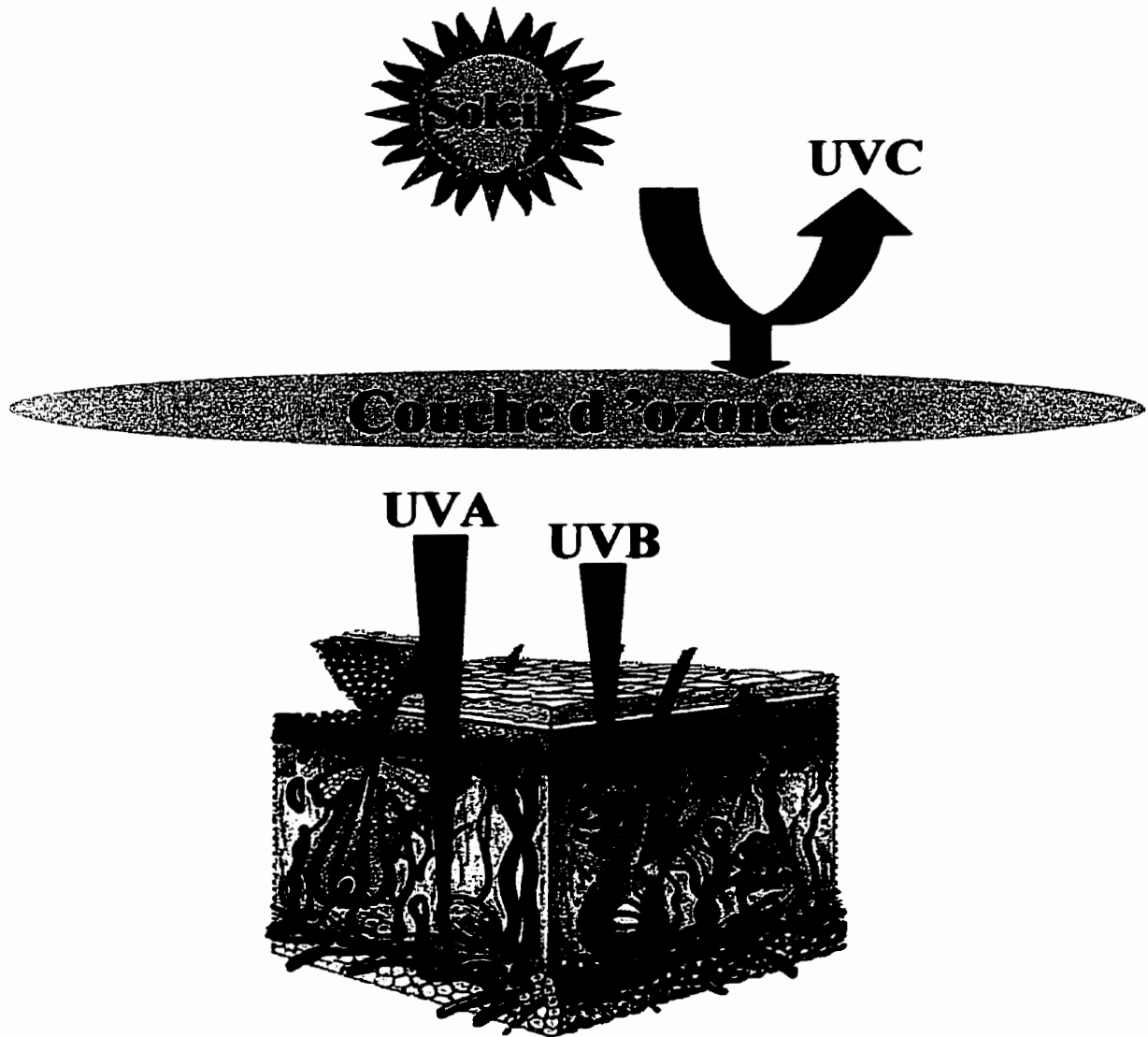


Figure 1. Représentation schématique du spectre des radiations électromagnétiques du soleil.



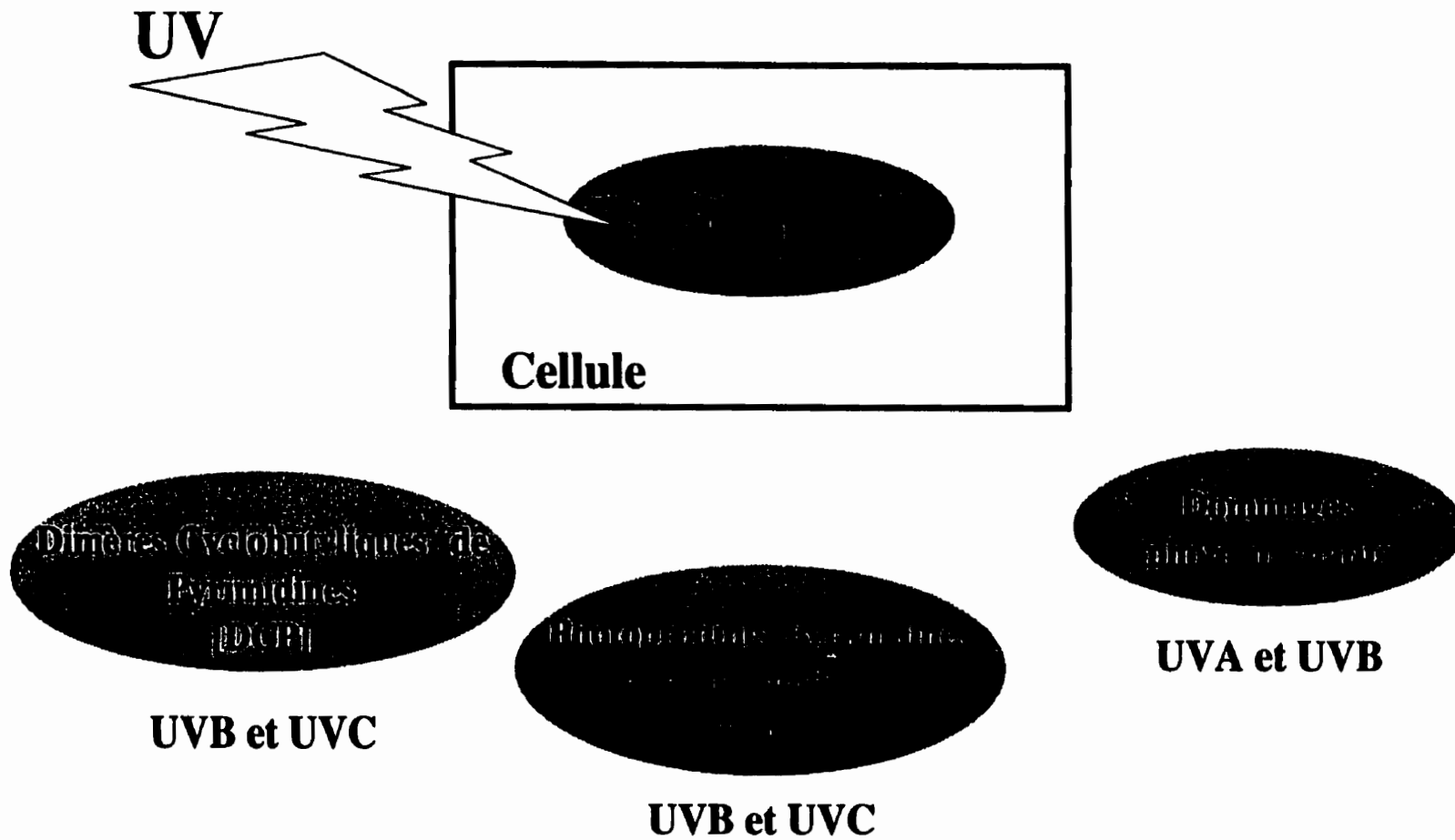


**Figure 2.** Représentation schématique de l'effet des différents types de rayons ultraviolets émis par le soleil au niveau de la peau.

### **3. LES DIFFÉRENTS TYPES DE DOMMAGES À L'ADN GÉNÉRÉS PAR LES RAYONS UV**

Les radiations UV causent directement ou indirectement des dommages à l'ADN, ceux-ci sont appelés photoproduits. Ces photoproduits peuvent induire des mutations au niveau de l'ADN lesquelles peuvent conduire à la transformation cellulaire. Ces photoproduits se divisent en trois classes : 1) les Dimères Cyclobutyliques de Pyrimidines [DCP], 2) les Photoproduits Pyrimidines (6-4) pyrimidones [PP(6-4)] et les isomères de valence Dewar, la conversion des PP(6-4) en isomères de valence Dewar se fait via les rayons UV-B (Cadet et Vigny, 1990 ; Taylor, 1990) et/ou les rayons solaires (Clingen et al., 1995), et 3) les photoproduits mineurs [Dommages Photo-Oxydatifs {DPO}] [Voir Figure 3]. Ce sont principalement les rayons UV-C et UV-B qui peuvent induire la formation de DCP ou de PP(6-4), alors que les DPO peuvent être formés principalement par les rayons UV-A et UV-B, et de façon beaucoup moins importante par les rayons UV-C (Sage, 1993) [Voir Figure 3]. Contrairement aux rayons UV-B et aux UV-C, les rayons UV-A produisent indirectement les DPO. Les rayons UV-A produisent de l'oxygène singulet et des radicaux libres qui génèrent les DPO à l'ADN.

Les DCP et les PP(6-4) sont formés au niveau de sites dipyrimidiniques [deux pyrimidines adjacentes], soit au niveau de TpT, TpC, CpT et CpC. Les DCP représentent le photoproduit le plus fréquent causé par l'absorption directe des rayons UV par l'ADN. Les DPC sont formés en plus grande quantité que les PP(6-4), soit environ 3 fois plus (Mitchell et al., 1990). Ceci est probablement attribué au fait que les DCP requierent moins d'énergie pour être formés que les PP(6-4). Les DCP sont produits suite à l'absorption directe des



**Figure 3.** Représentation schématique des divers photoproduits induits à l'ADN par les radiations UV.

rayons UV-C ou UV-B par l'ADN, l'absorption des UV induit la formation de deux liens covalents entre les carbones en positions 5 et 6 de deux pyrimidines adjacentes, formant ainsi un anneau cyclobutylique (Friedberg, 1985). Des études expérimentales et de modélisation ont montré que les DCP se caractérisent par une légère, mais significative déformation de l'hélice d'ADN bicaténaire. Près d'un DCP, l'ADN est intact mais il a subi une torsion d'au moins 7° par rapport à la forme B normale de l'ADN (Ciarrocchi et Pedrini, 1982 ; Wang et Taylor, 1991). Les DCP sont réparés plus lentement que les PP(6-4), donc ils persistent plus longtemps au niveau de l'ADN. En résumé, les DCP auraient un plus grand potentiel mutagénique que les PP(6-4). Donc, il est justifié de croire que la formation des DCP au niveau de l'ADN soit à l'origine des cancers de peau non-mélanocytiques.

Il existe différents facteurs qui influencent la distribution des DCP au niveau de l'ADN. Ces facteurs sont : 1) la séquence nucléotidique, 2) la structure de la chromatine [ADN], 3) la présence de protéines associées à l'ADN [ex : facteurs de transcription], et 4) le type de rayons UV [UV-C vs UV-B].

La séquence nucléotidique influence positivement ou négativement la formation des DCP au niveau de l'ADN. Il a été montré que la formation des DCP au niveau d'un site dipyrimidinique est favorisée par la présence en 5' d'une pyrimidine comparativement à une purine et qu'une guanine en 5' inhibe de façon plus importante la formation des DCP qu'une adénine (Mitchell et al., 1992). Il semble aussi que les DCP, comme les PP(6-4), sont formés préférentiellement au niveau de longues séquences de pyrimidines adjacentes (Tornaletti et Pfeifer, 1996).

La structure de la chromatine est un autre paramètre qui influence la distribution des DCP au niveau de l'ADN cellulaire. Dans les cellules, l'ADN est organisé en quelque sorte comme un collier de perles. Cette forme en collier de perles correspond aux nucléosomes ["core DNA"], qui sont composés de 146 paires de bases [pb] enroulées autour d'un octamère d'histones, et l'ADN qui relie les perles correspond à l'ADN de liaison ["linker DNA"]. Dans le nucléosome, la périodicité de l'hélice d'ADN varie de 10.7 pb/tour pour les trois tours du centre à 10 pb/tour pour les 50-60 pb de l'ADN de chaque côté du nucléosome. La présence de nucléosomes a pour effet de modifier la flexibilité de l'ADN. La formation des DCP est déterminée par le degré de flexibilité de l'ADN, lequel est à son tour conféré par le déroulement et la flexibilité de l'ADN (Brown et al., 1993 ; Schieferstein et Thoma, 1996 ; Suquet et Smerdon, 1993). C'est pourquoi on observe la formation accrue des DCP à un intervalle d'environ 10 pb en présence de nucléosomes (Tornaletti et al., 1996 ; Drouin et Therrien, 1997). Contrairement au "core DNA", la distribution des DCP formés dans la région qui correspond au "linker DNA" est uniforme, on n'y observe aucune périodicité de 10 pb (Pehrson, 1995). En plus de la flexibilité de l'ADN, il semble que la forme de l'ADN module la formation des DCP. En effet, l'ADN triple brin est significativement moins sensible à la photodimérisation que l'ADN en forme B (Lyamichev et al., 1990 ; Tang et al., 1991). Il a été aussi montré que la flexibilité diminuée de l'ADN au niveau du sillon mineur inhibe la formation des DCP (Pehrson et Cohen, 1992). Donc, la formation des DCP est modulée en fonction de la structure et de la flexibilité qu'adopte l'ADN dans la cellule.

Un autre facteur qui modifie la distribution des DCP à l'ADN est la présence de protéines sur l'ADN. C'est dans la région du promoteur des gènes que l'on retrouve le plus souvent des protéines liées à l'ADN afin d'activer ou

d'inhiber la transcription des gènes. Il a été montré que la fréquence des DCP formées au niveau de l'ADN dans les cellules vivantes irradiées aux rayons UV, en comparaison avec leur distribution dans l'ADN isolé ["naked DNA"], varie d'un site à un autre de façon plus significative dans les séquences qui correspondent au promoteur des gènes. Au niveau des séquences qui correspondent aux exons des gènes, il y a moins de différences observables entre la distribution des DCP dans l'ADN cellulaire vs l'ADN isolé (Pfeifer et al, 1992 ; Tormanen et Pfeifer, 1992 ; Tornaletti et Pfeifer, 1995a). Les variations les plus significatives ont été observées aux ou près des sites de liaison des facteurs de transcription. Certains sites dipyrimidiniques situés à l'intérieur de ces sites de liaison sont protégés contre la formation des DCP par la présence d'une protéine [facteur de transcription]. Tandis que d'autres sites dipyrimidiniques sont plus exposés aux rayons UV, donc plus susceptibles de former des DCP, dû au repliement de l'ADN causé par la présence d'un facteur de transcription. Donc, la présence de protéines sur l'ADN va aussi affecter la distribution des DCP, soit en augmentant ou en diminuant la formation des DCP dans les régions de liaison.

Le dernier facteur qui modifie la distribution des DCP est le type de rayons UV auquel l'ADN est exposé. Des études qui comparent la distribution des DCP aux différents sites dipyrimidiniques [5' TpT ; TpC ; CpT ; CpC] ont montré que la distribution varie selon le type de rayons UV [UV-C ou UV-B] utilisé (Mitchell et al, 1992). L'étude de Mitchell et al. montre que la distribution des DCP après irradiation d'ADN plasmidique [séquences *Alu*] transfecté dans des cellules vivantes aux UV-C est :  $TpT > TpC \cong CpT > CpC$  selon des proportions de 68 : 13 : 16 : 3, ces résultats sont en accord avec ceux de Setlow et Carrier (Carrier et al., 1983 ; Setlow et Carrier, 1966). Tandis que les proportions observées après irradiation aux rayons UV-B est de 52 : 19 : 21 : 7,

ces résultats sont aussi en accord avec ceux de Carrier et al. obtenus pour de l'ADN humain (Carrier et al., 1983). Cette étude montre que la formation des DCP est diminuée au niveau des homodimères de thymines [TpT] et augmentée au niveau de dimères contenant une ou deux cytosines [TpC ; CpT ; CpC] après irradiation aux UV-B vs UV-C. La méthylation des cytosines affecte aussi la distribution des DCP suite à une irradiation aux UV de type B uniquement (Drouin et Therrien, 1997 ; Therrien et al., 1999a ; Tommasi et al., 1997). Donc, la distribution des DCP varie aussi selon la  $\lambda$  des UV, ce qui s'explique probablement par la  $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption qui est différente pour chaque pyrimidine [thymine, cytosine et cytosine méthylée]. Par exemple, la cytosine méthylée absorbe à une longueur d'onde maximum plus élevée que la cytosine non-méthylée [ $\lambda_{\text{max}} = 273 \text{ nm}$  vs  $267 \text{ nm}$  à pH 7.0] (Pfeifer, 1997).

#### **4. LA RÉPARATION DES DOMMAGES À L'ADN**

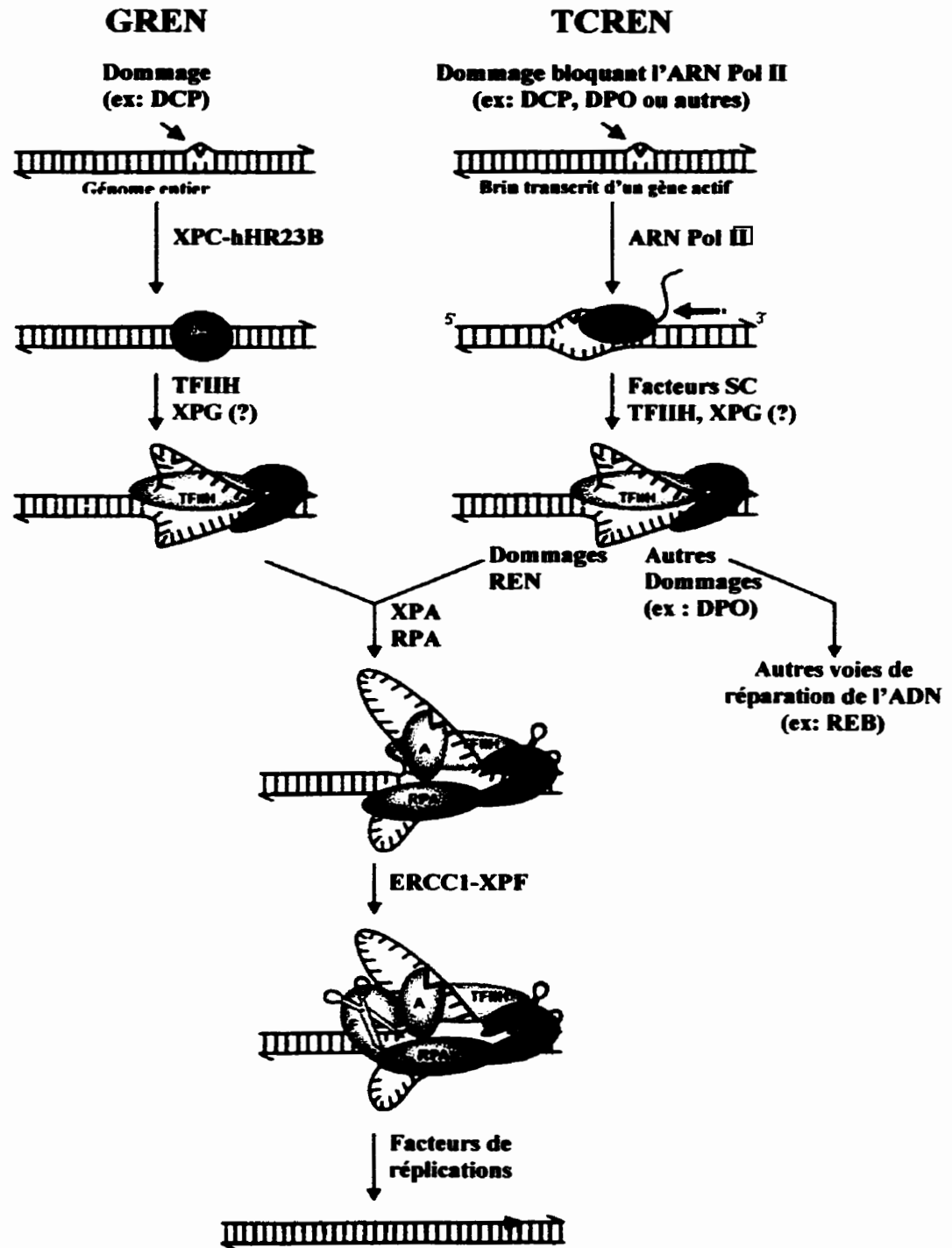
Au cours de l'évolution, les cellules ont développé des mécanismes pour réparer les dommages générés à l'ADN par différents agents chimiques [hydrocarbures polycycliques, mycotoxines, aminofluorènes, psoralènes, etc.] et physiques [rayons UV ou radiations ionisantes]. Il existe dans les cellules humaines 5 différentes voies de réparation de l'ADN : 1) Réparation par Excision de Bases [REB], 2) Réparation par Excision de Nucléotides [REN], 3) réparation directe [ex : via la photolyase ou la O<sup>6</sup>-méthylguanine-ADN méthyltransférase I], 4) réparation de mésappariement de bases ["mismatch repair"], 5) réparation par recombinaison homologue. Les DCP sont réparés principalement par la voie REN, cette voie de réparation sera définie plus en détail ci-dessous.

La voie REN est une voie de réparation des dommages formés à l'ADN hautement versatile et sophistiquée. Elle neutralise les effets néfastes d'une multitude de lésions à l'ADN, incluant les principaux types de dommages induits par les sources environnementales. Par exemple, les DCP et les PP(6-4) générés à l'ADN par les rayons UV du soleil sont réparés par la voie REN (de Laat et al., 1999 ; excellente revue de littérature sur la voie REN). La voie REN se subdivise en deux voies d'initiation bien différentes l'une de l'autre, soit : 1) la voie REN couplée à la transcription ["Transcription-Coupled repair", TCREN], découverte dans les années 1980 par le groupe du Dr Hanawalt (Bohr et al., 1985 ; Mellon et al., 1987), 2) la voie REN du génome entier ou REN globale [GREN] (de Laat et al., 1999). La TCREN permet d'éliminer de façon préférentielle et rapide les dommages à l'ADN au niveau du brin transcrit des gènes actifs. Tandis que la GREN permet d'éliminer les dommages au niveau des régions non-codantes du génome et du brin non-transcrit des gènes actifs. Ces deux voies d'initiation de la REN ainsi que leur voie commune comporte différentes étapes [voir plus bas et Figure 4]. Ces étapes impliquent la participation de plusieurs protéines ou complexes protéine-protéine afin qu'une réparation rapide et efficace des dommages à l'ADN soit obtenue. Ces différentes étapes ont pu être élucidées et les gènes qui codent pour les différentes protéines impliquées dans la REN ont été caractérisées. Les gènes qui codent pour ces protéines ont été identifiés grâce à différentes maladies génétiques humaines à transmission autosomale récessive : 1) Xeroderma Pigmentosum [XP], 2) Syndrome de Cockayne [CS], et 3) TrichoThioDystrophie [TTD]. Pour Xeroderma Pigmentosum, il y a 8 groupes de complémentation qui ont été identifiés à ce jour, XP-A à XP-G et le XP-variant. Chacun de ces groupes est déficient en une protéine [XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF ou XPG] impliquée dans le système de réparation de l'ADN (Cleaver, 1968 ; Hanawalt et Sarasin, 1986 ; Kraemer et al., 1987 ; Sarasin, 1994



; Sarasin et al. 1988). Pour le Syndrome de Cockayne, il existe 2 groupes de complémentation, CS-A et CS-B (Lehmann, 1987 ; Sarasin, 1991, 1994). Les protéines CSA et CSB sont principalement impliquées dans la voie d'initiation TCNER (Venema et al., 1990). Pour la TrichoThioDystrophie, il existe 3 groupes de complémentation TTD/XPB, TTD/XPD et TTD-A (Lehmann, 1987 ; Mezzina et al., 1994 ; Sarasin, 1991, 1994 ; Sarasin et al., 1992 ; Stefanni et al., 1992).

La Figure 4 illustre les deux voies d'initiation de la REN, soit la GREN et la TCREN, ainsi que la voie commune à ces deux voies d'initiation de la REN. Lorsqu'un dommage reconnu par la voie de la REN survient, peu importe l'endroit dans le génome, il est réparé par la voie d'initiation GREN. Ce dommage qui génère une distorsion de l'hélice d'ADN est dans un premier temps reconnu par le complexe XPC-hHR23B. La protéine XPC est spécifique à la voie GREN et elle n'est pas requise pour la voie du TCREN (van Hoffen et al., 1995 ; Venema et al., 1990, 1991). Le complexe XPC-hHR23B et la protéine XPC seule montrent une grande affinité pour les cassures mono et bicaténares ainsi que pour les dommages générés à l'ADN par les radiations UV (Masutani et al., 1994 ; Reardon et al., 1996 ; Shivji et al., 1994). Le complexe XPC-hHR23B est indispensable pour qu'il y ait incision en 5' et en 3' du dommage, et ainsi que pour la formation et la stabilisation du complexe d'ouverture de l'ADN pendant la GREN (Aboussekhra et al., 1995 ; Evans et al., 1997 ; Mu et al., 1995, 1997 ; Mu et Sancar 1997). Donc, le complexe XPC-hHR23B démarre la voie du GREN en reconnaissant et liant le dommage, il dénature localement la double hélice d'ADN et il recrute le complexe TFIIH et possiblement la protéine XPG du système de réparation (de Laat et al., 1999). Ces étapes sont spécifiques à la



**Figure 4.** Représentation de la voie de réparation des DCP par excision de nucléotides [REN]. La figure a été modifiée d'après l'article de "de Laat et al., 1999, *Genes Dev* 13 : 768-785".

voie du GREN. Une fois le complexe TFIIH recruté, le complexe XPC-hHR23B peut être relâché sans que les étapes subséquentes de la REN soient affectées.

La voie du TCREN initie la réparation des dommages qui sont reconnus par la voie de la REN, mais qui sont spécifiquement formés au niveau du brin transcrit des gènes actifs dans la cellule. La voie TCREN répare rapidement et préférentiellement les dommages situés au niveau du brin transcrit des gènes actifs afin qu'ils soient transcrits sans erreur lors d'une éventuelle réponse cellulaire face à un mutagène. Contrairement à la voie du GREN, les dommages sont reconnus par l'ARN polymérase II [ARN pol II] qui s'arrête lorsqu'elle rencontre le dommage. Par la suite, l'ARN pol II recrute le complexe TFIIH, les facteurs CSA, CSB et XPG, et possiblement d'autres cofacteurs qui vont déplacer l'ARN pol II. Dans les deux voies d'initiation de la REN, le complexe TFIIH génère une ouverture dans l'ADN d'environ 10 à 20 nucléotides entourant la lésion via ses hélicases, la XPB et la XPD, cette étape requiert de l'énergie [ATP] (de Laat et al., 1999). L'hélicase XPB déroule l'ADN dans une direction 3'→5' et l'hélicase XPD dans le sens opposé (Schaeffer et al., 1993, 1994 ; Roy et al., 1994). Dans le cas du TCREN, le dommage peut être réparé via la voie commune de la REN ou via une autre voie non spécifique à la voie REN s'il s'agit d'un dommage qui n'est pas associé au mode de réparation par la REN. Par exemple, les DPO qui sont réparés via le REB bloquent aussi l'ARN pol II et semblent être réparés par le mode couplé à la transcription [TC] mais autre que la TCREN, soit le TCREB (de Laat, 1999). Mis à part cette exception, les étapes subséquentes de la voie REN sont communes aux deux voies d'initiation de la REN.

L'arrivée des protéines XPA et RPA marque le début de la voie commune de la REN. La XPA est une protéine de liaison à l'ADN avec une préférence marquée pour lier les dommages à l'ADN (Asahina et al., 1994 ; Jones et Wood 1993 ; Robins et al., 1991). La RPA est aussi une protéine de liaison à l'ADN, mais à l'ADN simple brin, et elle est composée de trois sous-unités de 70, 32, et 14 kD (de Laat, 1999). Ces deux protéines vont stabiliser l'ouverture de 10 à 20 nucléotides dans l'ADN et elles vont positionner d'autres facteurs nécessaires à la poursuite de la voie REN. La XPA va se lier aux nucléotides endommagés et faciliter l'assemblage du complexe de réparation. Tandis que la RPA va se lier au brin d'ADN qui n'a pas été endommagé afin de stabiliser le complexe d'ouverture de l'ADN et de positionner les nucléases. La protéine XPG est positionnée par le complexe TFIIH et par la RPA, qui jusqu'à présent jouait un rôle dans la stabilisation du complexe d'ouverture, va permettre la première incision qui survient en 3' du dommage. Le complexe ERCC1-XPF est mis en place par la RPA et la XPA et il va permettre la deuxième incision qui survient en 5' du dommage. Cette double incision est suivie par la synthèse d'un nouveau fragment d'ADN remplaçant les nucléotides excisés par la polymérase  $\delta$  ou la polymérase  $\epsilon$  en combinaison avec les facteurs RPA, "Proliferating Cell Nuclear Antigen" [PCNA], et le facteur de réplication C [RP-C]. Par la suite il y a ligation de ce fragment en 5' et en 3' par l'ADN ligase I (de Laat, 1999).

Les récentes études sur le mode de fonctionnement de la REN ont permis de mieux comprendre le mécanisme par lequel les DCP sont réparés. Mais, il n'en demeure pas moins que le mode de régulation [activation ou inhibition] de la voie REN reste à être élucidé. L'étude du rôle des gènes suppresseurs de tumeurs, tel que p53 et pRb, dans la voie REN permettra possiblement de mieux comprendre le mécanisme par lequel la voie REN est régulée.

## **5. LA THÉORIE DES MUTATIONS SOMATIQUES**

La théorie de la mutagenèse somatique prédit que la fréquence avec laquelle une mutation induite au niveau d'un gène soit sélectionnée, donc associée au développement d'une cellule tumorale, est le produit de la probabilité ( $P$ ) de plusieurs étapes successives de la mutagenèse [i.e. fréquence du dommage, vitesse de réparation, erreur de lecture de la polymérase et la sélection] (Holmquist et Gao, 1997 ; Holmquist et Drouin, 1998). D'où l'équation :

$$P_i(\text{dommage}) \times P_i(\text{non-réparation}) \times P_i(\text{erreur de lecture}) \times P_i(\text{sélection}) \\ = P_i(\text{tumeur})$$

Cette formule a été développée par Thilly (Thilly, 1983), et modifiée par Holmquist (Holmquist et Gao, 1997 ; Holmquist et Drouin, 1998). Elle représente la probabilité ( $P_i$ ) qu'un nucléotide à une position " $i$ " dans une large population de cellules soit endommagé par un mutagène quelconque, que cette lésion ne soit pas réparée et que sa présence dans l'ADN cause une erreur de lecture de la part de la polymérase générant ainsi une mutation. Finalement, la probabilité que cette mutation soit sélectionnée pour amener la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. C'est la probabilité de chacune de ces différentes étapes successives qui vont déterminer la probabilité de développer une tumeur quelconque.

Donc trois facteurs affectent la probabilité qu'une mutation survienne à un site particulier : 1) la fréquence du dommage à ce site, 2) la vitesse de réparation du dommage, et 3) la mutagénicité du dommage. La fréquence des

dommages est un facteur parmi les plus importants et elle détermine la probabilité qu'une mutation survienne, d'où l'importance d'étudier les facteurs qui influencent la distribution des photoproduits. Comme déjà mentionné précédemment, ces facteurs sont : 1) le contexte de séquence, et 2) la structure de la chromatine. Quant à la vitesse de réparation, les facteurs influençant cette dernière sont : 1) la reconnaissance du dommage par les enzymes de réparation, 2) l'accessibilité au dommage par les enzymes de réparation [structure de la chromatine], et 3) la localisation du dommage, brin transcrit d'un gène actif vs région non-codante du génome. La mutagénicité du dommage correspond à la probabilité qu'une erreur de lecture soit produite par la polymérase, donc plus la polymérase a un taux d'erreur élevé pour un dommage X, plus ce dommage a un potentiel mutagénique élevé. La probabilité d'une erreur de lecture varie selon le contexte de séquence, la spécificité du brin, la variation possible de la structure de la chromatine, tandis que le genre d'erreur de lecture [transition vs transversion] peut dépendre du type de dommages et/ou de l'ADN polymérase impliqué (Gibbs et al., 1995 ; Holmquist et Gao, 1997 ; Thomas et al., 1996). Les mutations dites "avantageuses" pour la prolifération cellulaire seront responsables du développement des tumeurs et elles surviennent avant la sélection somatique (Holmquist et Gao, 1997). La fréquence et la vitesse de réparation des dommages sont deux paramètres qui peuvent être étudiés au niveau de la séquence nucléotidique par une technique extrêmement puissante, la technique du "Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction [LMPCR].

La Figure 5 représente la séquence des différentes étapes de la théorie des mutations somatiques associés au développement de cancers de peau. Les rayons UV du soleil représentent le mutagène et ils induisent des dommages à l'ADN, par exemple les DCP et les PP(6-4). Suite à une exposition au soleil, les

DCP sont formés préférentiellement au niveau de dimères de pyrimidines composés d'une ou de deux cytosines et plus particulièrement, si une cytosine est méthylée (Therrien et al., 1999a ; Tommasi et al., 1997). La vitesse de réparation des DCP varie d'un site dipyrimidinique à un autre (Gao et al., 1994 ; Tornaletti et Pfeifer, 1994) et ils sont réparés plus lentement que les PP(6-4) (Mitchell et Nairn, 1989). Les DCP tout comme les PP(6-4) ont un potentiel mutagénique très élevé (Brash, 1988), car ces deux types de dommages modifient la structure de l'ADN et bloquent l'ADN polymérase lors de son passage pouvant ainsi entraîner une erreur de lecture lors de la réplication. Donc, lorsque la fréquence du dommage est élevée, que sa réparation est lente, et que le dommage a un potentiel mutagénique élevé, la probabilité qu'une mutation survienne à un site particulier est élevée. À l'inverse, si la fréquence du dommage est faible, qu'il est réparé rapidement et de façon efficace, et qu'il a un potentiel mutagénique faible, alors la probabilité qu'une mutation se produise est faible. Par la suite intervient le processus de sélection des mutations, la ou les mutations formées doivent procurer un avantage prolifératif à la cellule atteinte pour ainsi la transformer en cellule tumorale. Les types de mutations les plus fréquemment retrouvées suite à une irradiation aux UV sont principalement la transition C→T et en plus faible proportion, environ 14%, la double transition CC→TT aux sites dipyrimidiniques, ceux-ci constituent le type de mutations dit "signature" des rayons UV (Daya-Grosjean et al., 1995 ; Dumaz et al., 1994).

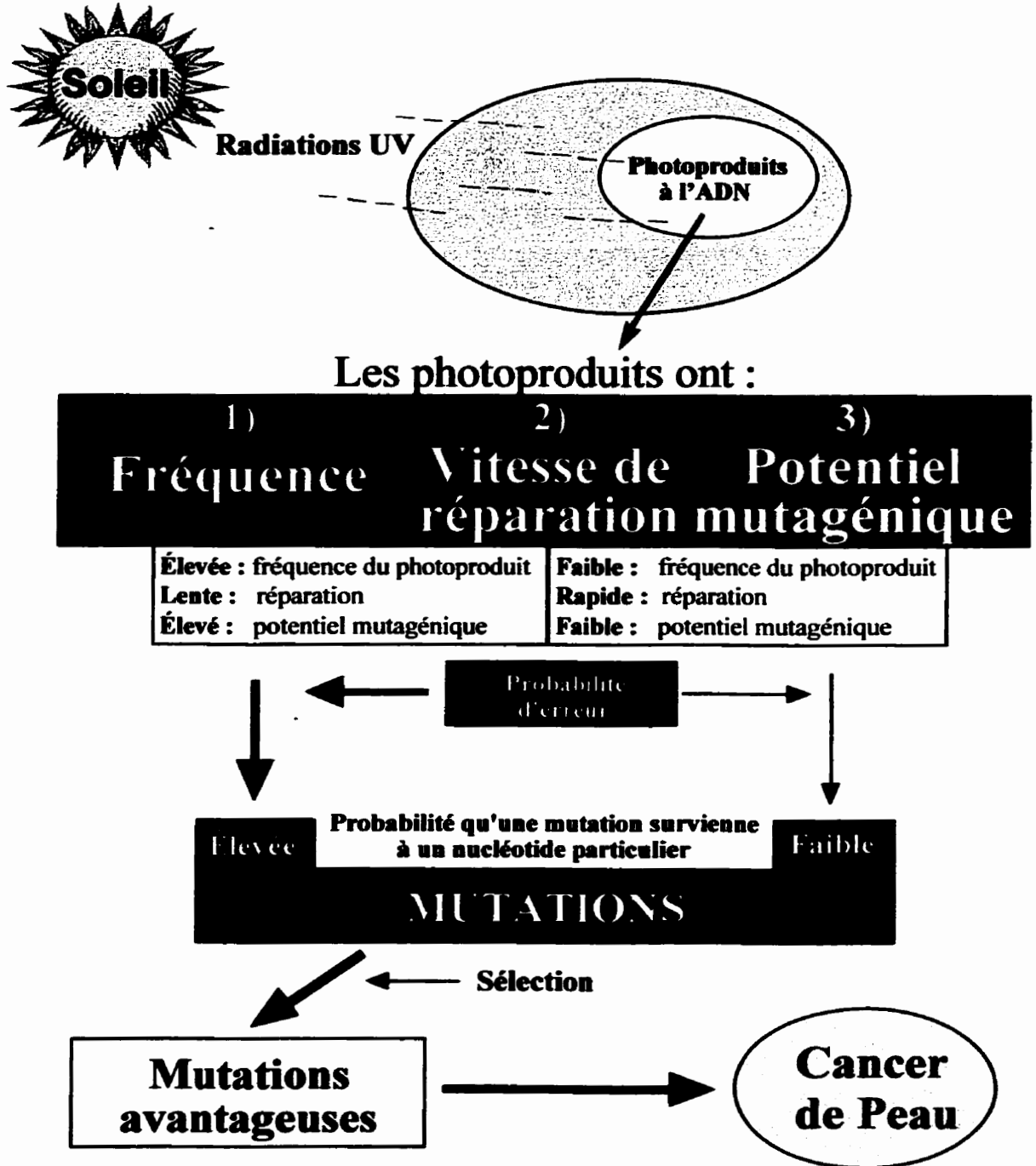


Figure 5. Représentation schématique de la théorie des mutations somatiques.



## **6. LA TECHNIQUE "LIGATION-MEDIATED POLYMERASE CHAIN REACTION" (LMPCR)**

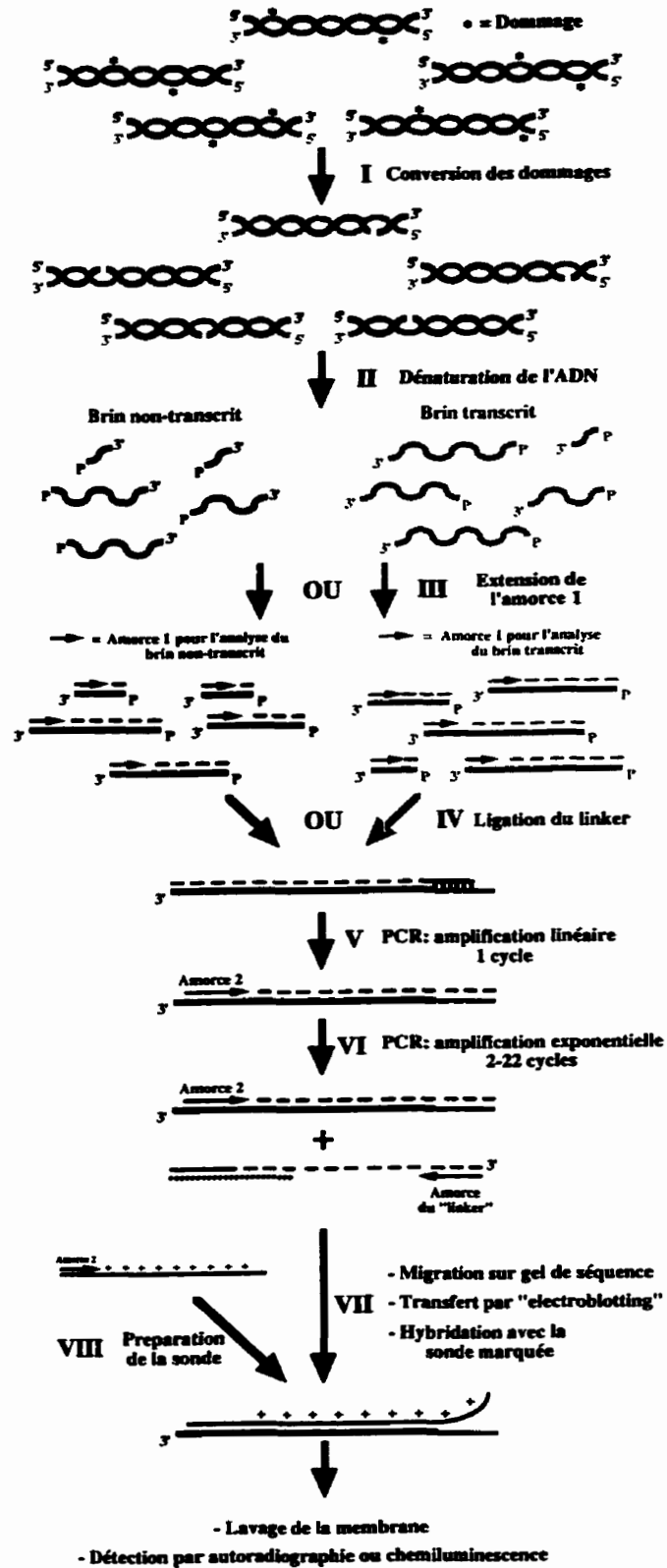
La technique LMPCR a d'abord été développée, par Mueller et Wold, pour l'étude *in vivo* [i.e. dans les cellules vivantes] d'empreintes protéiques ["footprinting"] sur l'ADN (Mueller et Wold, 1989 ; Pfeifer et Riggs, 1993 ; Rozek et Pfeifer, 1993), le séquençage génomique (Pfeifer et al., 1989), et pour la détermination du motif de méthylation de l'ADN (Pfeifer et al., 1989 ; Tornaletti et Pfeifer, 1995b). La technique LMPCR est une technique de séquençage génomique beaucoup plus sensible que celle initialement développée par Church et Gilbert en 1984. Elle requiert jusqu'à 30 fois moins d'ADN comparativement à la technique de Church et Gilbert, afin d'obtenir un signal intense et bien défini sur l'autoradiogramme final et ce avec un temps d'exposition beaucoup plus court. L'aspect unique de la technique LMPCR provient de la ligation d'un "linker" bicaténaire asymétrique [afin d'éviter qu'il se lie à lui-même ou dans le mauvais sens] au niveau de chaque fragment d'ADN bicaténaire avec une extrémité franche qui contient un phosphate en 5'. Ces fragments sont obtenus suite à la conversion des dommages à l'ADN en cassures monocaténares, la dénaturation de l'ADN et une première extension avec une amorce spécifique à la région d'intérêt. Ainsi, tous les fragments d'ADN bicaténaire comprenant un "linker" à leur extrémité peuvent être amplifiés de façon exponentielle [voir Figure 6]. C'est ce qui explique la grande sensibilité de la technique.

Par la suite, la technique LMPCR fût appliquée pour l'analyse de la distribution et de la réparation des dommages générés à l'ADN par les rayons UV et ce au niveau de la séquence nucléotidique de gènes spécifiques

(Dammann et Pfeifer, 1997 ; Drouin et Therrien, 1997 ; Pfeifer et al., 1991 ; Pfeifer et al., 1992 ; Therrien et al., 1999a, 1999b ; Tormanen et Pfeifer, 1992 ; Tornaletti et al, 1993 ; Tornaletti et Pfeifer, 1994 ; Tu et al., 1996, 1998). La technique LMPCR a été utilisée pour la détection des DCP et PP(6-4) (Pfeifer et al., 1991, 1992), ainsi que pour les DPO (Drouin et Holmquist, 1993).

La Figure 6 illustre les différentes étapes de la technique LMPCR. L'étape I, la conversion des dommages en cassures, est une étape limitante de la technique LMPCR, car afin de pouvoir étudier la distribution et la réparation d'un certain type de dommages avec cette technique, il faut pouvoir convertir le dommage en cassure monocaténaire contenant un phosphate en 5'. Il existe deux types de conversion, soit enzymatique ou chimique. Contrairement à la conversion chimique, la conversion enzymatique est beaucoup plus spécifique et permet d'obtenir peu ou pas de cassures non-spécifiques ["background"]. Les DCP peuvent être convertis spécifiquement par l'enzyme T4 endonucléase V, mais afin de pouvoir étudier ces dommages avec la technique LMPCR il faut enlever la pyrimidine en surplomb. Le traitement avec la photolyase produite par *E. coli* en combinaison avec les UV-A va permettre de photoréactiver le double lien covalent de la pyrimidine qui est restée en surplomb. Cette étape est essentielle pour la ligation ultérieure du "linker". Par la suite, une fois les dommages convertis en cassures monocaténaires, à l'étape II, l'ADN est dénaturé par la chaleur afin d'obtenir une population de fragments d'ADN monocaténaire de différentes longueurs contenant un phosphate en 5'. Puis, à l'étape III, à l'aide d'une amorce spécifique à la région ou au gène d'intérêt, une première extension est effectuée avec une polymérase n'ayant pas d'activité terminale transférase. De plus, à cette étape on peut sélectionner le brin d'ADN, transcrit ou non-transcrit, que l'on veut étudier. Ceci peut s'avérer très utile pour l'étude du rôle d'une

protéine dans la GREN ou la TCREN. L'étape IV consiste à lier un "linker" bicaténaire asymétrique à chaque fragment d'ADN bicaténaire contenant une extrémité franche avec un phosphate en 5'. De cette façon, on peut connaître la séquence en 3' et en 5' de chaque fragment d'ADN de la région ou du gène étudié. À l'étape V, on fait un premier cycle d'amplification par PCR avec une deuxième amorce adjacente en 3' de la première, pour augmenter la spécificité. Par la suite, à l'étape VI, les fragments d'ADN sont amplifiés de façon exponentielle à l'aide de la deuxième amorce et de l'amorce correspondant à la séquence du "linker". Les produits PCR obtenus sont séparés selon leur longueur suite à leur migration sur gel de polyacrylamide dénaturant, le gel est transféré sur une membrane de nylon par "electroblotting". L'étape VIII consiste à préparer une sonde radioactive ou non-isotopique [non-radioactive, voir Annexe I] par PCR. La membrane contenant les produits PCR est hybridée avec la sonde marquée. Ensuite, la membrane est lavée et le signal est détecté par autoradiographie ou chemiluminescence. De plus, pour l'analyse quantitative du signal obtenu, les membranes hybridées avec la sonde radioactive sont exposées sur une plaque "phosphorimager".



**Figure 6.** Représentation schématique des différentes étapes de la technique LMPCR.

## **7. LA PROBLÉMATIQUE ET LES OBJECTIFS**

### **LA PROBLÉMATIQUE**

Le génome d'une cellule humaine contient possiblement plus de 100 000 gènes, un de ces gènes est appelé *p53*. Le gène *p53* joue un rôle très important dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, c'est pourquoi il est considéré comme le gardien du génome. La protéine codée par le gène *p53* joue un rôle majeur dans : 1) le point de contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire (Cox et Lane, 1995 ; Geyer et al., 2000), 2) la réparation de l'ADN (Bertrand et al., 1997 ; Ford et Hanawalt, 1995 ; Leveillard et al., 1996 ; McKay et al., 1997 ; Smith et al., 1995 ; Sturzbecher et al., 1996 ; Therrien et al., 1999b ; Wang et al., 1994, 1995 ; Zhu et al., 2000), et 3) l'induction de l'apoptose (Geske et al., 2000 ; Yonish-Rouach et al., 1991). Donc, les cellules dépourvues de ce gène sont vulnérables à la transformation cellulaire. Le gène *p53* est muté dans plus de 90 % des cancers de peau non-mélanocytiques (Brash et al., 1991 ; Glass et Hoover, 1989 ; Urbach, 1989). Son inactivation est associée avec l'initiation et la progression de la tumeur. De plus, les mutations retrouvées dans le gène *p53* provenant de ces tumeurs cutanées sont spécifiques des rayons UV, soit principalement des transitions C→T et en plus faible proportion des transitions doubles CC→TT. Jusqu'à présent, de telles mutations ont été identifiés dans huit codons au niveau des exons 5 à 8 du gène *p53*, région qui correspond au domaine de liaison à l'ADN de la protéine *p53*, ces codons sont parmi les sites les plus fréquemment mutés dans les cancers de peau non-mélanocytiques. Ces huit points chauds pour les mutations correspondent aux codons 151, 177, 196, 245, 248, 278, 286 et 294, sept de ces sites sont réparés lentement [seul le codon 151 ne l'est pas] et seulement quatre de ces sites [les codons 151, 278, 286 et

294] sont fréquemment endommagés [DCP] par les UV-C (Tomaletti et Pfeifer, 1994). Ces résultats ne correspondent pas à la théorie de mutations somatiques décrite précédemment, aussi le type de rayons UV utilisés pour étudier la distribution des DCP, les UV-C, n'est pas approprié si on considère la lumière solaire.

Afin de mieux répondre à la théorie des mutations somatiques associée aux cancers de peau non-mélanocytiques, l'étude de la distribution des DCP au niveau de exons 5 à 8 du gène *p53* se doit d'être faite suite à l'irradiation de cellules humaines aux rayons UV-B. L'utilisation des rayons UV-B pour l'étude de la distribution des DCP à l'ADN génomique est plus appropriée que celle des UV-C, car ce sont les UV-B qui atteignent la surface terrestre et les UV-C sont complètement filtrés par la couche d'ozone. De plus, les résultats qui seront obtenus dans l'étude de la distribution des DCP avec les rayons UV-B au niveau des huit points chauds pour les mutations du gène *p53* pourront être combinés aux résultats précédents. Soit, ceux du spectres de mutation du gène *p53* dans les tumeurs de peau non-mélanocytiques et de la vitesse de réparation des DCP à ces sites. Tous ces résultats réunis permettront probablement d'établir un lien moléculaire étiologique entre les radiations solaires, les DCP et les mutations dans le gène *p53* retrouvés dans les cancers de peau non-mélanocytiques.

De plus, le rôle de la protéine p53, ainsi que ses effecteurs en aval, soit p21 et pRb, au niveau du contrôle de la vitesse de réparation des DCP par excision de nucléotides est encore controversé à ce jour. Comme mentionné auparavant la voie REN est divisée en deux voies d'initiation distinctes, soit la TCREN et la GREN. Il a été préalablement montré que la protéine p53 joue un rôle essentiel dans la GREN et qu'elle ne participe aucunement à la TCREN

(Ford et al., 1998 ; Ford et Hanawalt, 1995, 1997). Plusieurs autres évidences semblent indiquer un rôle de la protéine p53 dans la TCREN (Mckay et al., 1997, 1999). Un des objectifs spécifiques est de résoudre la controverse concernant le rôle de la protéine p53 dans la TCREN et ce à l'aide de la technique LMPCR. Des études préliminaires semblent indiquer un rôle pour la protéine pRb dans la réparation de l'ADN (Weichselbaum et al., 1978), mais jusqu'à présent aucune étude n'a investigué le rôle de pRb dans la réparation. Le rôle de la protéine p21waf1 au niveau de la REN est aussi controversé. En effet, il existe deux écoles, celle qui n'accorde aucun rôle à cette protéine dans la REN et celle qui suppose que cette protéine joue un rôle dans la REN. Selon cette dernière école, il existe deux lignes de pensées soit que la protéine p21waf1 stimule (Li et al., 1994, 1996 ; McDonald et al., 1996) ou inhibe (Cooper et al., 1999 ; Pan et al., 1995) la REN.

Des études plus approfondies sur la distribution des DCP au niveau des exons 5 à 8 du gène *p53* suite à une irradiation aux UV-B combinées à des études sur le rôle de la protéine p53 dans la réparation des DCP devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la mutagenèse solaire associée au développement des cancers de peau non-mélanocytiques

### **LES OBJECTIFS**

Les objectifs du chapitre II sont : 1) d'étudier la distribution des DCP au niveau des exons 5 à 8 du gène *p53* après irradiation de fibroblastes humains aux rayons UV-C et UV-B, 2) de déterminer la fréquence des DCP formés au niveau des 8 points chauds pour les mutations du gène *p53* après irradiation aux UV-B,

3) de vérifier la présence de nucléosomes dans l'ADN après irradiation aux UV, et 4) d'étudier l'effet de la méthylation de l'ADN sur la distribution des DCP.

Les objectifs du chapitre III sont : 1) de comparer la fréquence globale et la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN isolé ou provenant de cellules cultivées en monocouche [fibroblastes et kératinocytes humains] ou de cellules de peau humaine reconstruite en laboratoire par ingénierie tissulaire suite à une irradiation aux UV-C ou UV-B ou à la lumière solaire simulée [LSS], 2) de déterminer si la distribution varie selon le type cellulaire [fibroblastes vs kératinocytes], 3) de déterminer si l'organisation en multicouche de la peau, comparativement à l'organisation en monocouche des cultures cellulaires, affecte la fréquence globale et/ou la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN, 4) de déterminer si la distribution des DCP est affectée selon le type de longueur d'onde utilisé [UV-C vs UV-B vs LSS], et 5) de déterminer si la combinaison UV-B + UV-A + la lumière visible [soit la LSS] modifie la fréquence globale et la distribution des DCP comparativement aux UV-B seulement.

Les objectifs du chapitre IV sont : 1) d'investiguer, à l'aide de la technique LMPCR, le rôle de la protéine p53 au niveau du contrôle de la vitesse de réparation des DCP formés au niveau de l'ADN dans des cellules où la fonction de p53 est compromise, 2) de confirmer le rôle de p53 dans la GREN et vérifier si cette protéine joue un rôle dans la TCREN, 3) d'investiguer le rôle de la protéine pRb au niveau du contrôle de la vitesse de réparation des DCP formés au niveau de l'ADN dans des cellules où la fonction de pRb est compromise, 4) de déterminer à quel niveau pRb joue un rôle dans la REN, GREN vs TCREN ou au niveau des deux voies.



**L'objectif du chapitre V est d'investiguer, à l'aide de la technique LMPCR, le rôle du niveau basal de la protéine p21<sup>waf1/cip</sup> au niveau de la REN, de la survie clonogénique et de l'apoptose dans les lignées cellulaires déficientes en p53.**

**CHAPITRE II :**  
**UVB-INDUCED CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMER  
FREQUENCY CORRELATES WITH SKIN CANCER  
MUTATIONAL HOTSPOTS IN P53**

*[Photochemistry & Photobiology, 1997, 66(5) : 719-726]*

## **1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS**

Les rayons solaires ont été identifiés comme étant le principal carcinogène impliqué dans le développement des cancers de peau. Les rayons ultraviolets (UV) sont responsables de la formation de dommages à l'ADN, plus particulièrement des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP). Ces photoproduits lorsqu'ils sont fréquents à un site particulier peuvent induire des mutations lorsque la réparation de ces DCP est lente. Les UV induisent des mutations typiques, celles-ci sont des transitions simples C→T ou doubles CC→TT. Le gène suppresseur de tumeurs, *p53*, est muté dans la majorité des cancers de peau, à l'exception des mélanomes. Certains sites dans le gène *p53* sont mutés à une fréquence particulièrement élevée suite à une exposition aux UV ; ces 8 sites sont appelés points chauds ("hotspots") pour les mutations. Ces sites se situent à l'intérieur des exons 5 à 8 au niveau des codons 151, 177, 196, 245, 248, 278, 286 et 294. Après irradiation de l'ADN purifié et de fibroblastes aux UV-C et aux UV-B, la fréquence des DCP formés le long des exons 5 à 8 a été cartographiée au niveau de chaque nucléotide. Aux sites dipyrimidiniques contenant une 5-méthylcytosine, la fréquence des DCP est jusqu'à 9 fois plus élevée après irradiation aux UV-B qu'après irradiation aux UV-C. De plus, les 8 points chauds pour les mutations retrouvées dans les tumeurs de la peau (sauf le mélanome) sont aussi 8 points chauds pour les DCP après irradiation aux UV-B. Ces résultats sont très importants car nous sommes exposés aux UV-B et pas aux UV-C car ces derniers sont bloqués par la couche d'ozone. En conclusion, les UV-B induisent des DCP aux sites fréquemment mutés, ce qui implique les DCP dans la production des mutations et confirme le potentiel carcinogénique des UV-B.

1. **ARTICLE**

**UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in *P53***

**Régen DROUIN\* & Jean-Philippe THERRIEN**

Department of Medical Biology, Université Laval, Québec, Québec, Canada

1. **To whom correspondence should be addressed at:**

Unité de Recherche en Génétique Humaine et  
Moléculaire,  
Centre de Recherche,  
Pavillon Saint-François d'Assise, CHUQ  
10 rue de l'Espinay,  
Québec (Québec) G1L 3L5, Canada  
Tel.: (418) 525-4402  
Fax: (418) 525-4481  
email: [regen.drouin@crsfa.ulaval.ca](mailto:regen.drouin@crsfa.ulaval.ca)

† **Abbreviations** : BPDE, anti-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; DMS, dimethylsulfate; LMPCR, ligation-mediated polymerase chain reaction; mC, methylated cytosine; 6-4 photoproducts, pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts.

## **2.1 RÉSUMÉ**

Ultraviolet light has been identified as the major carcinogen in skin cancer and the *p53* tumor suppressor gene is a major target for UV-induced mutations. The mutations are probably caused by unrepaired UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and possibly by the less frequent pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts. While hot spots for *p53* mutations in human nonmelanoma skin tumors correspond quite well to slow spots for CPD repair in cultured cells irradiated with the model mutagen 254 nm UVC (which is not present in terrestrial sunlight), they do not all coincide with sequences that are initially frequently damaged by 254 nm UVC. Using LMPCR (ligation-mediated polymerase chain reaction), we show that environmentally relevant UVB light induces CPD at CC and Pyr<sup>m</sup>C positions much more frequently than does UVC light, and that all eight skin cancer hot spots in *p53* are also hot spots for UVB-induced CPD. Our results show that methylation of dipyrimidine sites (Pyr<sup>m</sup>CpG) is associated with an increase rate of CPD formation upon UVB irradiation. Consequently, DNA methylation may increase the mutagenic potential of UVB and explains that several *p53* mutation hot spots are found at Pyr<sup>m</sup>CpG. The distribution patterns of CPD formation and the photofingerprint patterns found along exons 5 and 6 of *p53* gene are suggestive of DNA folding into nucleosomes.

## **2.2 INTRODUCTION**

Skin cancer constitutes one of the most common and rapidly rising human neoplasms (1). The carcinogenic role of sunlight in skin cancer, mainly the highly genotoxic and environmentally relevant UVB (280-320 nm) component, is unquestionable (2,3). Irradiation of cellular DNA with UVC (200-280 nm), which is completely attenuated by stratospheric ozone, or with UVB induces several types of potentially mutagenic base modifications (2,4). The culpable premutagenic photoproducts are produced by direct absorption of UV radiation by DNA and subsequent covalent bond formation between two adjacent pyrimidines, *i.e.* cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)<sup>†</sup>, and the less frequent (15-30% of CPD levels) pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4 photoproducts). While it is evident that CPD exert significant premutagenic potential, a role for 6-4 photoproducts has been indicated (5). Indeed, either of these lesions can be misinstructional during replicative bypass, leading to the fixation of mutations (6-8).

In nonmelanoma skin cancer, mutations in the *p53* tumor suppressor gene occur early, contributing to tumor initiation and promotion (9-11). The *p53* mutations found in skin cancers correspond to unique UV "signature" mutations consisting of C→T transitions occurring at dipyrimidine sites and some CC→TT tandem transitions (9-13). The somatic mutation theory predicts that the frequency of unrepaired DNA lesions in mutagenized cells is a function of both frequency of damage deposition and the rate of repair (14). The *p53* mutational hot spots in nonmelanoma skin cancer coincide with nucleotide positions manifesting a slow CPD repair rate following irradiation with 254 nm UVC and not with positions showing a high UVC-induced damage frequency (15,16).

However, UVC is not the true etiological mutagen in skin cancer because it is absorbed by the ozone layer. For example, it has been demonstrated in cultured rodent cells that the types of mutations induced by broad-spectrum solar light differ significantly from those recovered after treatment with 254 nm UVC light (17). We therefore used ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) to determine if the pattern of environmentally relevant UVB-induced CPD coincides more closely with mutation hot spots than does the pattern induced by UVC light. Indeed, we found that all hot spots for *p53* mutations in human nonmelanoma skin tumors correspond to hot spots for UVB-induced CPD.

### **2.3 MATÉRIEL & MÉTHODES**

***Cell culture and UV irradiation.*** Human skin fibroblasts were grown to confluence in 150 mm petri dishes and irradiated on ice after replacing the medium with cold NaCl 0.9%. Naked DNA for *in vitro* exposure, diluted in 150 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 at a concentration of 65 µg/mL was irradiated on ice. The UVB light source consisted of two tubes (FS20T12/UVB/BP, Phillips) delivering 7.45 J/m<sup>2</sup>/s filtered through a screen of cellulose acetate (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch ; Eastman-Kodak Co.). The filter blocks transmission below 290 nm and was replaced after 220 min of irradiation due to solarization. The UVC light source consisted of one germicidal tube (TUV 15 W G 15 T8, Phillips) delivering 6.25 J/m<sup>2</sup>/s. The ratio of 50 to 1 (10 000 J/m<sup>2</sup> of UVB to 200 J/m<sup>2</sup> of UVC) regarding the CPD production efficiency was determined experimentally to generate equivalent CPD frequencies after UVB and UVC irradiation. The UVB and UVC doses, as well as the UV irradiation conditions for cells and naked DNA,

were established to produce one CPD per 1 kb. The CPD frequency in the total genomic DNA was determined with an alkaline 1.5% agarose gel after T4 endonuclease V cleavage of the CPD (18). Irradiated cells and cells for *in vitro* treatment were harvested as previously described (19). Nuclear DNA was extracted and the concentration measured by fluorometry after staining with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (19). Four sets of petri dishes were irradiated and harvested at four different times, and the results were highly reproducible.

***Conversion of CPD to ligatable DNA strand breaks.*** The CPD were cleaved and converted to single-strand breaks with T4 endonuclease V (20,21). The ligation-inhibiting 5'-pyrimidine overhang was removed by photoreactivation using *Escherichia coli* photolyase to generate ligatable ends (20, 21).

***In vivo dimethylsulfate (DMS) footprinting analysis.*** Human skin fibroblasts were grown to confluence and the culture medium was replaced with fresh unsupplemented medium containing 0.2% DMS (Aldrich) (22). After a 6 min incubation at room temperature, the cell monolayer was washed with Ca-Mg-free Hanks' balanced salt solution medium and detached by trypsinization. After cell lysis, nuclei were isolated and the DNA purified as described (19,22). The DMS-exposed DNA was treated with hot 1 M piperidine (Fluka) to convert the methylated bases to DNA strand breaks (23).

***LMPCR.*** The LMPCR is an extremely sensitive genomic sequencing method because it utilizes a single-sided exponential amplification PCR step (19,21). 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 linker provides a common sequence at all 5'-ends. 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 19-21 cycles of PCR, the DNA fragments are size-fractionated on a sequencing gel, electroblotted onto a nylon membrane and hybridized to a single-stranded, gene-specific  $^{32}\text{P}$ -labeled probe (synthesized by PCR with primer 3 (19,21)). On the final autoradiogram, each band represents a nucleotide position where a break was induced by cleavage of a CPD, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position. The LMPCR preserves the quantitative representation of each fragment of the sequence ladder in the original population of cleaved molecules and each sequence ladder can be amplified very reproducibly. Hence the quantification is possible with a phosphorimager.

Primers specific for the human *p53* gene were selected and used as previously described (16). Primer extension that was initiated with 0.55-0.8  $\mu\text{g}$  of DNA, ligation of the linker, PCR, gel electrophoresis, electroblotting transfer, probe preparation and hybridization were carried out as usual (19,21). First, each experimental sample using UV-irradiated and enzyme-treated DNA (lanes 5-8 of Fig. 1a, c, and the four lanes on the right of Fig. 1c) was done in triplicate. 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 triplicate, the three samples were pooled and a combined gel was done and the autoradiogram was analyzed on the phosphorimager. Each band represents an average of three

samples. The band intensity was quantified by phosphorimager, Fuji BAS 1000 (Fuji Medical Systems USA Inc., Stanford, CT). The nylon membranes were exposed to phosphor-sensitive imaging plate (type III-s). Lanes 9-13 of Fig. 1a show that the background was very low and does not contribute to the CPD frequency signal. The UVB and UVC irradiation and processing of DNA up to LMPCR cause neither single-strand breaks nor abasic sites.

The DNA for Maxam-Gilbert cleavage reactions was carried out as usual (23,24). The DNA for A lane was treated with  $K_2PdCl_4$  at pH 2.0 followed by piperidine treatment (25). Sequence standards contain 0.6  $\mu$ g of human leukocyte DNA chemically cleaved to 0.2 kb.

## **2.4 RÉSULTATS & DISCUSSION**

The position of the CPD along the human *p53* gene was mapped at the sequence level by LMPCR and the frequency of CPD at each dipyrimidine site was evaluated (20,21). The CPD distribution was strongly influenced by DNA sequence and UV wavelength (Fig. 1a). Ultraviolet B did not produce the same CPD distribution as does UVC. Indeed, compared to UVC, UVB radiation showed enhanced CPD formation at the vast majority of dipyrimidine sites containing cytosines, and this enhancement was on the average greater at cytosine homodimers. This observation is consistent with analysis of irradiated cloned naked DNA (26). Considering the availability of dipyrimidine sites, in exons 5 and 6, a 10-12 base periodicity of CPD was seen, suggesting that the DNA is wrapped into nucleosome structure (27,28).

In nonmelanoma skin cancer, eight hot spots for mutations have been previously identified in exons 5-8 of the *p53* gene (Table 1) (9-13). Four of these hot spots, at positions 151, 278, 286 and 294, are frequent sites for CPD formation following treatment with both UVC and UVB (Table 1, numbered I, VI, VII and VIII). We now show that the other four mutation hot spots, positions 177, 196, 245 and 248 (Table 1, numbered II, III, IV and V), are infrequent sites for CPD formation by UVC but frequent sites for CPD formation by UVB (Fig. 1 and Table 1). The greatest differences of CPD frequency between UVB and UVC were found at the three methylated dipyrimidine sites (Fig. 1 and Table 1). We refer here to dipyrimidine sites showing frequent CPD formation by UVB and infrequent CPD formation by UVC as UVB-enhanced dipyrimidine sites.

Exons 5-8 of the *p53* gene contain a total of 46 CpG dinucleotides on both DNA strands ; all are completely methylated in all tissues studied to date (30). The presence of 5-methylcytosine ( $5^m\text{C}$ ) was visualized as a missing band in the C lane (Fig. 1a,c, lane 4) because the C-specific Maxam-Gilbert hydrazine treatment does not cleave  $^m\text{C}$  (24). Out of these 46 CpG sites, 21 are either CCG or TCG sites (Tables 1, 2), which are possible sites for CPD formation. At these 21 sites, the CPD frequency was increased up to nine-fold after UVB relative to UVC irradiation (Fig. 1a,c and Tables 1, 2). After UVB exposure, 18 out of 21 sites become hot spots for damage (+++ to +++++), whereas after UVC exposure only 11 sites are considered hot spots for damage (Tables 1 and 2). The greatest differences in the CPD frequency between UVB and UVC were found at the methylated dipyrimidine sites.

Photofootprints can be seen as striking differences when the photoproduct distribution of irradiated purified DNA (*in vitro*) is compared with that obtained

after irradiation of living cells (*in vivo*). Positive photofootprints are defined as an increase in photoproduct frequency at specific nucleotide positions for DNA from irradiated cells as compared to that of irradiated naked DNA. On the other hand, the photofootprints are said to be negative when there is a decrease in photoproduct frequency at specific nucleotide positions for DNA from irradiated cells as compared to that of irradiated naked DNA. A comparison between CPD distribution along the *p53* gene after *in vivo* and *in vitro* irradiation revealed wavelength-specific differences (Fig. 1a,c and Table 1). Positive and negative photofootprints were seen at methylated (Table 1, sites 5 and 16 were seen with UVB and UVC) and unmethylated dipyrimidine sites (Fig. 1a,c, arrows). Generally, similar photofootprints obtained after both UVB and UVC exposure occurred at unmethylated dipyrimidine sites, whereas photofootprints that were seen only with UVB irradiation were located at several methylated dipyrimidine sites (Fig. 1c and Table 2, sites 8, 10, 15, 17 and 18). These UVB-induced photofootprints coincided with the UVB-enhanced dipyrimidine sites showing the greatest difference between UVB- and UVC-induced CPD formation. Because photofootprints are usually associated with transcription factor binding sites (20,31), we treated fibroblasts with DMS in order to investigate whether protein-DNA interactions exist in exons 5-8. *In vivo* DMS footprinting analysis did not reveal the presence of protein binding sequences (Fig. 2). The photofootprints are located mainly in exons 5 and 6 and their pattern is suggestive of DNA folding in nucleosomes (Fig. 3).

The CPD frequency and photofingerprint patterns observed in exons 5 and 6 are suggestive of nucleosome formation. *In vivo* micrococcal nuclease and DNase I footprint analysis did not show protein-DNA interactions, but suggested that exons 5 and 6 were possibly covered with nucleosomes (32).

Because CPD formation is determined by the degree of DNA flexibility which is in turn conferred by unwinding and bending of DNA (33-35), these photofootprints could indicate that nucleosome structures locally increase or decrease DNA flexibility at the sequence level. The DNA distortions induced by CPD in nucleosomes may modulate the cellular functions involved in the recognition and repair of CPD in chromatin, thereby partly explaining the differential CPD repair rates observed along the DNA sequence of *p53* (15).

Ultraviolet B can now be considered a tissue-selective carcinogen targeting methylated CpG sites. Indeed, three of the four mutation hot spots more significantly damaged by UVB than by UVC are methylated dipyrimidine sites (Table 1, sites III, IV and V). Methylation of DNA can contribute to UV mutagenesis in many ways. Indeed, cytosine-containing CPD rapidly deaminate (36), whereas the deamination rate of <sup>m</sup>C-containing CPD is dramatically decreased (37). Furthermore, replication enzymes are blocked at cytosine-containing CPD, but after deamination, are able to replicate with greater fidelity past uracil- or thymine-containing CPD (38). Model studies using nucleosides suggest that 5<sup>m</sup>C residues absorb a significantly higher proportion of the UVB photons captured by DNA than would be expected based solely on considerations of base composition (M. D. Shetlar, unpublished results). This is due to the fact that 5<sup>m</sup>C absorbs further in the UVB region of the UV spectrum than the other nucleobases. This explains the absence of cytosine methylation effect for UVC-induced CPD formation (20), while, at the same time, there is a noticeable two- to nine-fold enhancement effect of UVB-induced CPD formation (Tables 1, 2). Another study analyzing the (±) *anti-7β,8α*-dihydroxy-9α,10α-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene (BPDE) adduct distribution showed

that cytosine methylation has a strong positive effect on the BPDE adduct frequency (39).

We now show that four mutational hot spots are more significantly damaged by UVB light than by UVC. All eight mutational hot spots in *p53* are frequent sites of formation of UVB-induced CPD. This indicates that the UVB-induced CPD distribution is much more correlated with the mutational spectrum found in skin cancer than the UVC-induced CPD distribution. Our study thus provides a molecular etiological link between the UVB component of sunlight, CPD and human nonmelanoma skin cancer mutations in *p53*.

## **2.5 REMERCIEMENTS**

The authors are extremely grateful to Drs. M. Shetlar for communicating unpublished results and G. P. Holmquist for reviewing the manuscript and stimulating discussions. We thank N. Dallaire for assistance with fibroblast culture, A. Sancar for photolyase and R. S. Lloyd for T4 endonuclease V. Supported by the Medical Research Council (MRC, grant no. MT-12523) of Canada to R.D. and "La Fondation de l'Hôpital Saint-François d'Assise." "Le Centre de Recherche" is supported by "le Fonds de la Recherche en Santé du Québec." R.D. holds a scholarship from the Cancer Research Society Inc./MRC and J.-P.T. a studentship from "Le Centre de Recherche."

## **2.6 RÉFÉRENCES**

1. Glass, A. G. and R. N. Hoover (1989) The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *J. Am. Med. Assoc.* **262**, 2097-2100.
2. 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.
3. Urbach, F. (1989) Potential effects of altered solar ultraviolet radiation on human skin cancer. *Photochem. Photobiol.* **50**, 507-513.
4. Cadet, J., C. Anselmino, T. Douki and L. Voituriez (1992) Photochemistry of nucleic acids in cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **15**, 277-298.
5. LeClerc, J. E., A. Borden and C. W. Lawrence (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidinone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9685-9689.
6. Protic-Sabljić, M., N. Tuteja, P. J. Munson, J. Hauser, K. H. Kraemer and K. Dixon (1986) UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3349-3356.
7. Jiang, N. and J. S. Taylor (1993) *In vivo* evidence that UV-induced C $\rightarrow$ T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of *cis-syn* cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry* **32**, 472-481.
8. Gibbs, P. E. M., A. Borden and C. W. Lawrence (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.

9. Ziegler, A., A. S. Jonason, D. J. Leffell, J. A. Simon, H. W. Sharma, J. Kimmelman, L. Remington, T. Jacks and D. E. Brash (1994) Sunburn and *p53* in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773-776.
10. Daya-Grosjean, L., N. Dumaz and A. Sarasin (1995) The specificity of *p53* mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **28**, 115-124.
11. Nataraj, A. J., J. C. Trent II and H. N. Ananthaswamy (1995) *p53* gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* **62**, 218-230.
12. Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Pontén (1991) A role for sunlight in skin cancer : UV-induced *p53* mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10124-10128.
13. Ziegler, A., D. J. Leffell, S. Kunala, H. W. Sharma, M. Gailani, J. A. Simon, A. J. Halperin, H. P. Baden, P. E. Shapiro, A. E. Bale and D. E. Brash (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the *p53* gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4216-4220.
14. Thilly, W. J. (1983) Analysis of chemically induced mutation in single cell populations. In *Induced Mutagenesis, Molecular Mechanisms and Their Complications for Environmental Protection* (Edited by C. W. Lawrence), pp. 337-378. Plenum Press, New York.
15. Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at *p53* mutation hotspots in skin cancer. *Science* **263**, 1436-1438.
16. Tornaletti, S., D. Rozek and G. P. Pfeifer (1993) The distribution of UV photoproducts along the human *p53* gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* **8**, 2051-2057.



17. Drobetsky, E. A., J. Turcotte and A. Châteauneuf (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2350-2354.
18. Drouin, R., S. Gao and G. P. Holmquist (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.
19. Drouin, R., H. Rodriguez, G. P. Holmquist and S. A. Akman (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.
20. Pfeifer, G. P., R. Drouin, A. D. Riggs and G. P. Holmquist (1992) Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1798-1804.
21. Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (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.
22. Pfeifer, G. P. and A. D. Riggs (1993) Genomic footprinting by ligation mediated polymerase chain reaction. In *PCR Protocols : Current Methods and Applications. Methods in Molecular Biology*, Vol. 15 (Edited by B. White), pp. 153-168. Humana Press, Totowa, NJ.
23. Pfeifer, G. P. and A. D. Riggs (1993) Genomic sequencing. In *DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology*, Vol. 23 (Edited by G. H. Griffin and A. M. Griffin), pp. 169-181. Humana Press, Totowa, NJ.
24. Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**, 499-560.

25. Iverson, B. L. and P. B. Dervan (1987) Adenine specific DNA chemical sequencing reaction. *Nucleic Acids Res.* **19**, 7823-7830.
26. Mitchell, D. L., J. Jen and J. E. Cleaver (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.* **20**, 225-229.
27. Gale, J. M., K. A. Nissen and M. J. Smerdon (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. USA* **84**, 6644-6648.
28. Gale, J. M. and M. J. Smerdon (1990) UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem. Photobiol.* **51**, 411-417.
29. Pfeifer, G. P., R. Drouin, A. D. Riggs and G. P. Holmquist (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. USA* **88**, 1374-1378.
30. Tornaletti, S. and G. P. Pfeifer (1995) Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the *p53* gene : implications for mutations in human cancers *Oncogene* **10**, 1493-1499.
31. 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**, 714-728.
32. Tornaletti, S., S. Bates and G. P. Pfeifer (1996) A high-resolution analysis of chromatin structure along *p53* sequences. *Mol. Carcinogenesis* **17**, 192-201.

33. Brown, D. W., L. J. Libertini, C. Suquet, E. W. Small and M. J. Smerdon (1993) Unfolding of nucleosome cores dramatically changes the distribution of ultraviolet photoproducts in DNA. *Biochemistry* **32**, 10527-10531.
34. Suquet, C. and M. J. Smerdon (1993) UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *J. Biol. Chem.* **268**, 23755-23757.
35. Schieferstein, U. and F. Thoma (1996) Modulation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in a positioned nucleosome containing poly(dA.dT) tracts. *Biochemistry* **35**, 7705-7714.
36. Tessman, I., M. A. Kennedy and S.-K. Liu (1994) Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers. *J. Mol. Biol.* **235**, 807-812.
37. Douki, T. and J. Cadet (1994) Formation of cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts upon far-UV photolysis of 5-methylcytosine-containing dinucleoside monophosphates. *Biochemistry* **33**, 11942-11950.
38. Tessman, I., S.-K. Liu and M. A. Kennedy (1992) Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA : mostly error-free processing of deaminated cytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1159-1163.
39. Denissenko, M. F., J. X. Chen, M. Tang and G. P. Pfeifer (1997) Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human *p53* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3893-3898.

## 2.7 TABLE I

Table 1. Characteristics and quantification of the CPD frequency for the eight *p53* mutation hot spots for in nonmelanoma skin cancer.

No.	Exon No.	Strand*	Sequence (5'→3')	Codon no.	Ratio UVB/UVC†		Relative CPD frequency‡	
					<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	UVB	UVC
					I	5	US	C <sup>^</sup> CC
II		US	C <sup>^</sup> CC	177	1.23	1.06	+++	+++
III	6	US	C <sup>^</sup> C <sup>m</sup> GA	196	1.99	1.47	++++	+++
IV	7	BS	GC <sup>^</sup> C <sup>m</sup> G	245	2.73	3.55	+++	++
V		BS	C <sup>^</sup> C <sup>m</sup> G	248	1.52	2.41	++++	+++
VI	8	US	C <sup>^</sup> CT	278	1.69	1.70	+++	++
VII		BS	TT <sup>^</sup> C	286	1.07	1.23	+++++	+++++
VIII		BS	CT <sup>^</sup> C	294	1.17	0.89	++++	++++

\* US : upper strand; BS : bottom strand.

† Ratio of CPD frequencies as determined by LMPCR and quantified using a Phosphorimager.

‡ Qualitative evaluation of the CPD frequency relative to other dipyrimidine sites. The band at the same nucleotide position from the T + C lane was used to correct for the unequal efficiency of the LMPCR procedure to amplify each DNA fragment (16,29).

## 2.8 TABLE II

Table 2. Characteristics and quantification of the CPD frequency for 18 methylated dipyrimidine sites in *p53* gene.

No.	Exon no.	Strand*	Sequence (5'→3')	Codon no.	Ratio UVB/UVC†		Relative CPD frequency‡	
					<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	UVB	UVC
1	5	US	CCCC <sup>m</sup> G	151-152	2.66	4.16	++++	+++
2		US	CCC <sup>m</sup> GGC	153-154	5.31	4.21	+++	+
3		BS	GCC <sup>m</sup> GGG	154-153	7.92	5.24	++++	+
4		US	ACCC <sup>m</sup> GC	155-156	4.21	3.53	+++	+
5		US	GTCC <sup>m</sup> GC	157-158	4.48	4.41	++++	+++
6		BS	CTCC <sup>m</sup> GT	171-170	4.75	3.80	+++++	++++
7		BS	ATC <sup>m</sup> GCT	186-185	3.72	3.59	+++++	++++
8	6	BS	CACTC <sup>m</sup> G	197-196	3.09	7.25	+++	++
9		US	TTTC <sup>m</sup> GA	212-213	1.27	1.61	+++	+++
10		BS	ATGTC <sup>m</sup> G	214-213	3.74	9.36	++++	++
11		US	GAGCC <sup>m</sup> G	221-222	1.50	1.45	++	+
12	7	US	AACC <sup>m</sup> GG	247-248	5.75	2.91	++	+
13	8	BS	GTTCC <sup>m</sup> G	268-267	3.13	4.24	+++	++
14		US	GACC <sup>m</sup> GG	281-282	3.19	5.98	++++	+++
15		BS	GCGCC <sup>m</sup> G	283-282	0.71	4.1	+	+
16		US	CTCC <sup>m</sup> GC	289-290	3.53	3.48	+++	+++
17		BS	CTC <sup>m</sup> GTG	298-297	1.07	2.77	+++	+++
18		BS	ACCTC <sup>m</sup> G	307-306	1.41	4.32	+++++	++++

\* US : upper strand; BS : bottom strand.

† Ratio of CPD frequencies as determined by LMPCR and quantified using a Phosphorimager.

‡ Qualitative evaluation of the CPD frequency relative to other dipyrimidine sites. The band at the same nucleotide position from the T + C lane was used to correct for the unequal efficiency of the LMPCR procedure to amplify each DNA fragment (16,29).

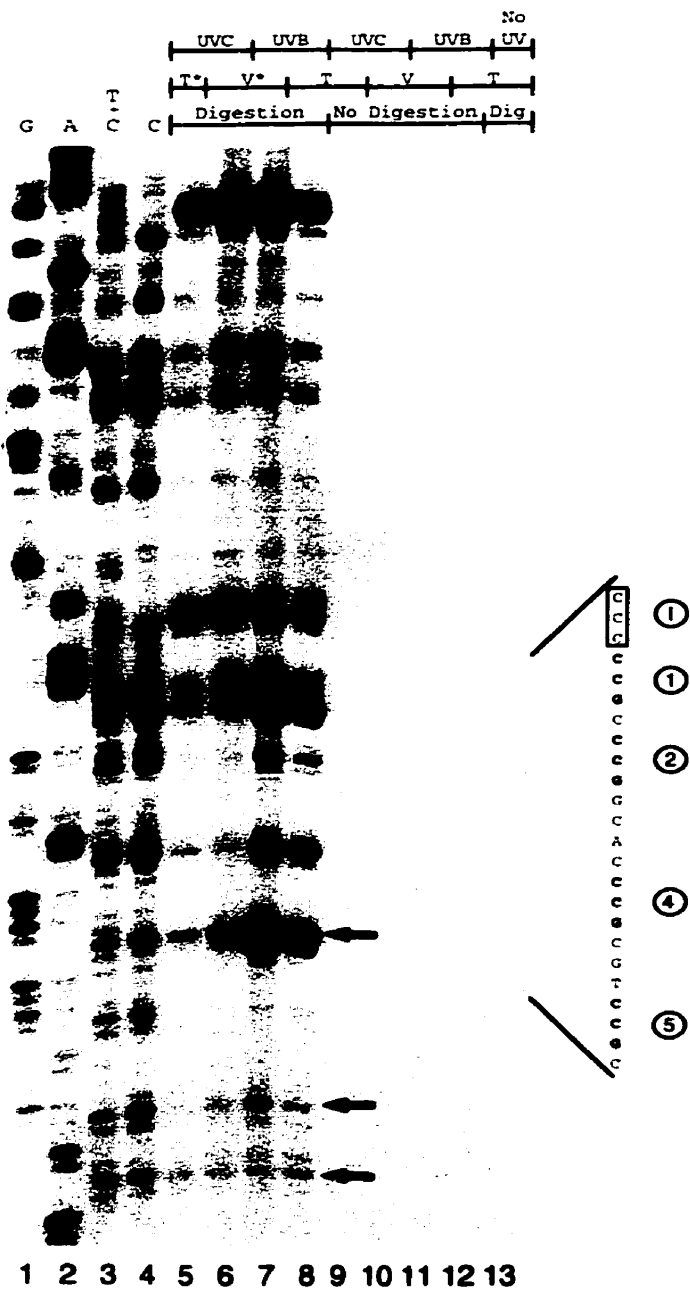
## 2.9 LÉGENDES

**Figure 1** Distribution of CPD along *p53* exons 5-8. As reference, a small portion of the Maxam-Gilbert-derived sequence is shown either on the right or on the left of the autoradiograms. The circled Roman numerals correspond to the mutation hot spots listed in Table 1. The boxed triplets represent the codons corresponding to the mutation hot spots listed in Table 1. The circled Arabic numerals correspond to the methylated dipyrimidine sites listed in Table 2. The arrows indicate bands showing photofootprints. (a) Exon 5, the upper strand (nontranscribed strand). Lanes 1-4, LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. Lanes 5-8, LMPCR of UVC- and UVB-irradiated naked DNA (T\* : *in vitro*) and cells (V\* : *in vivo*) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. Lanes 9-12, LMPCR of UVC- and UVB-irradiated naked DNA and cells followed by incubation in buffer only, no T4 endonuclease V digestion, but the DNA was photoreactivated with photolyase. Lane 13, LMPCR of unirradiated DNA followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. (b) Exons 5, 6 and 8, upper strand (US) and bottom strand (BS). This composite autoradiogram shows mutation hot spots II, III, VI, VII and VIII. Lanes 1-4, LMPCR of UVC- and UVB-irradiated naked DNA (T) and cells (V) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. (c) Exons 5-8, US and BS. Lanes 1-4, LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. Lanes 5-8 and the four lanes on the right, LMPCR of UVC-

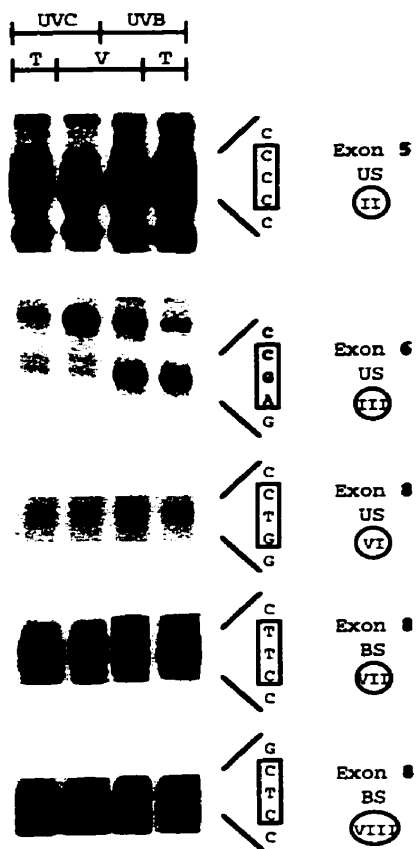
and UVB-irradiated naked DNA (T) and cells (V) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. Exon number and the strand, US or BS, are also indicated for each autoradiogram. For guidance, a small portion of the Maxam-Gilbert-derived sequence is shown on the left for exon 7 and on the right for the other exons. Methylated dipyrimidine sites no 8 and 10 show photofootprints only after UVB exposure (Table 2).

**Figure 2** Photofootprints in the exon 7 of *p53* gene. This figure shows five photofootprinted sites observed within the upper and bottom strand of exon 7. The photofootprints are defined by a different intensity of signal between *in vitro* (T) and *in vivo* (V) UV irradiation. Similar photofootprints were observed after UVC and UVB irradiation. The DMS treatment was used to verify if there were protein-DNA binding sites. The absence of DMS footprint suggests the absence of protein on the exon 7.

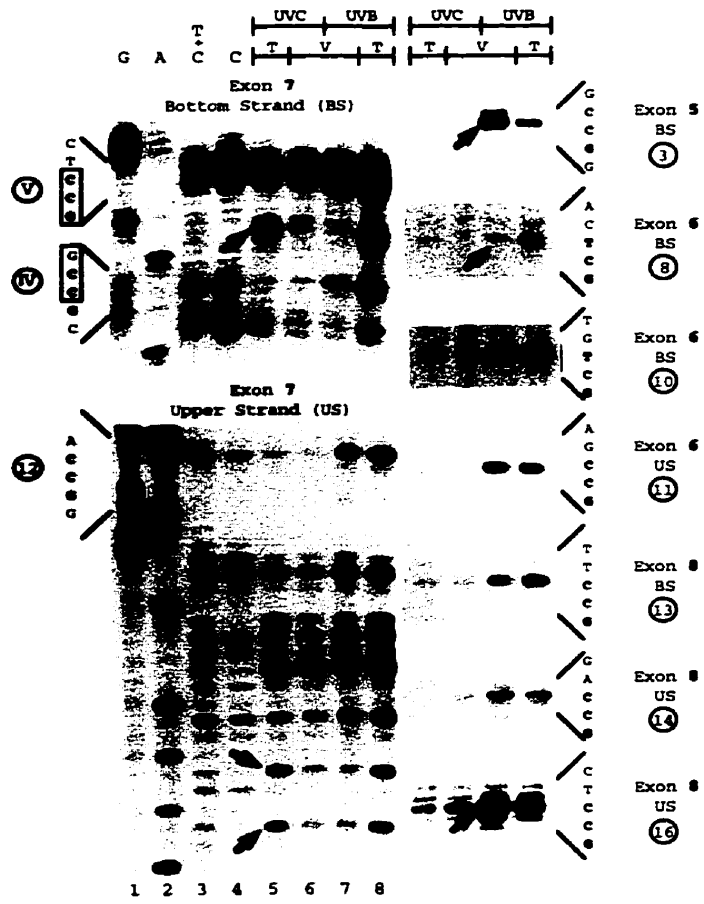
**Figure 3** Schematic map of photofootprints along exons 5-8 of the *p53* gene after UVB irradiation. This figure shows the positive ( $V/T > 1$ ) and negative ( $T/V > 1$ ) photofootprints with a ratio higher than 2.00. The brackets indicate sites of formation of CPDs, the squares mark the eight hot spots for mutation found in nonmelanoma skin cancer. The 21 methylated dipyrimidine sites are underlined.

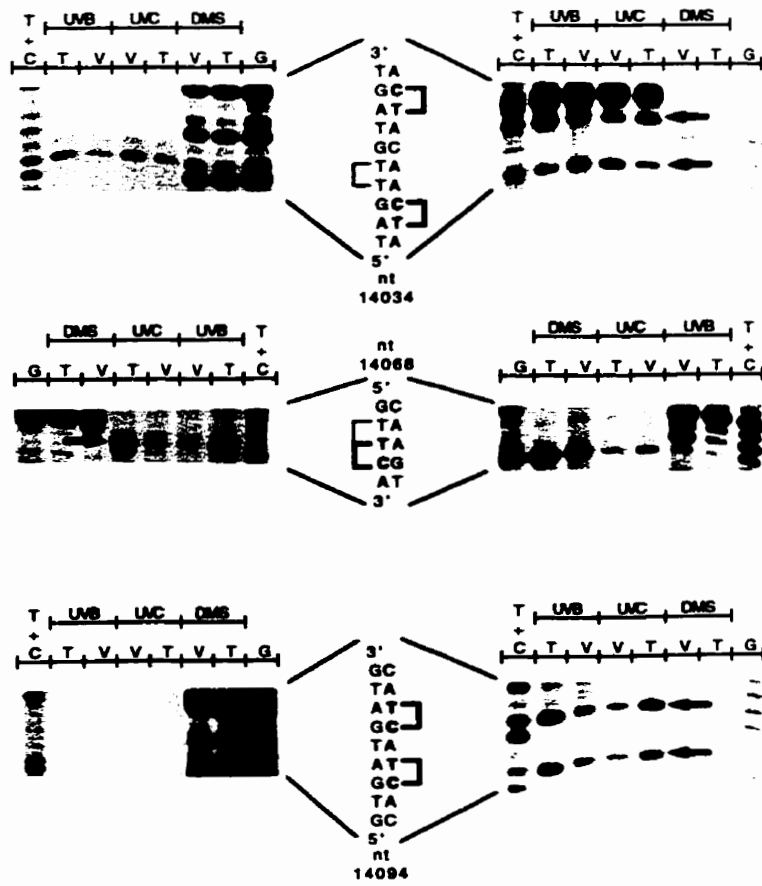
2.10 Figure 1A

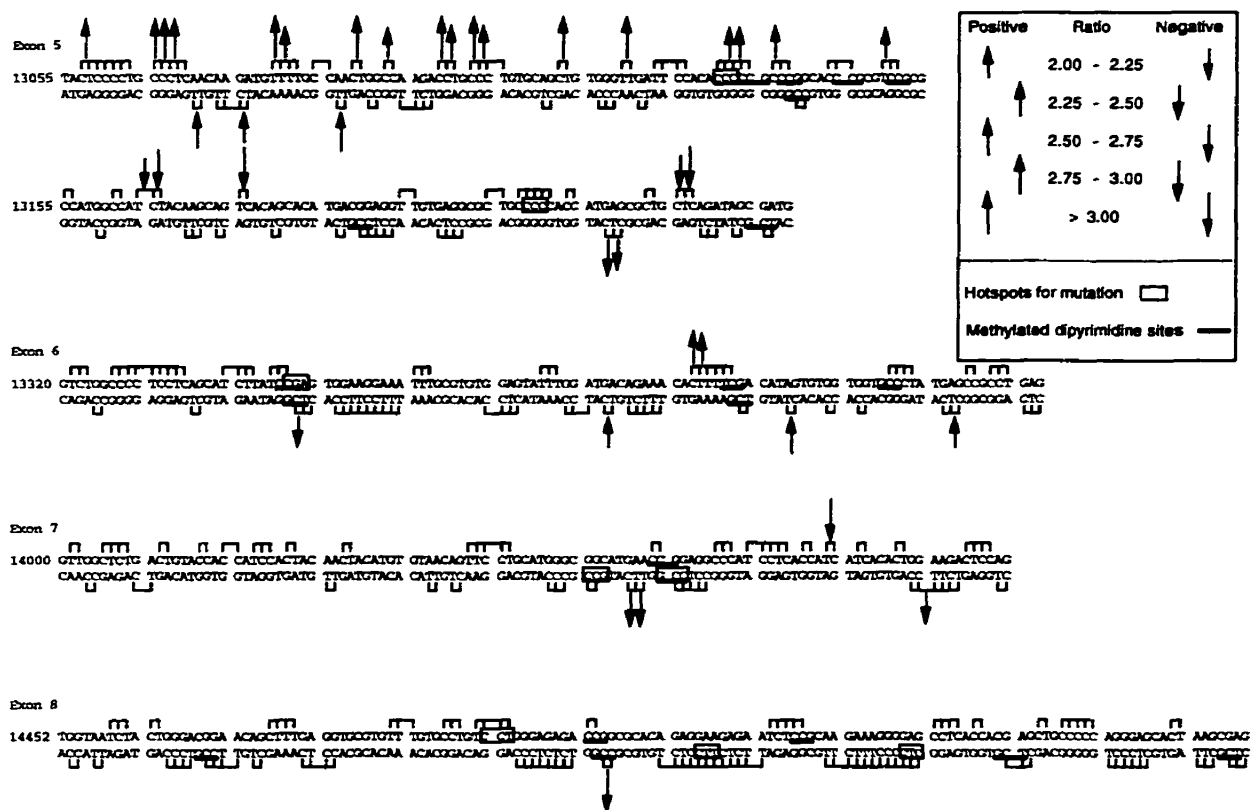


2.11 **Figure 1B**

2.12 Figure 1C



2.13 Figure 2

2.14 **Figure 3**

**CHAPITRE III :**

**THE MULTILAYERED ORGANIZATION OF ENGINEERED  
HUMAN SKIN DOES NOT INFLUENCE THE FORMATION  
OF SUNLIGHT-INDUCED CYCLOBUTANE PYRIMIDINE  
DIMERS IN CELLULAR DNA**

*[Cancer Research, 1999, 59 : 285-289]*

## **1. RÉSUMÉ EN FRANCAIS**

Les rayons UV-B du soleil sont à l'origine du cancer de peau principalement en générant des lésions, telles que les dimères cyclobutyliques de pyrimidines [DCP], qui sont responsables de l'apparition de mutations au niveau de gènes critiques pour le contrôle du cycle cellulaire. Il est généralement accepté que la couche supérieure de l'épiderme bloque une portion significative des rayons UV-B. Par conséquent, elle protège la couche basale de la peau, d'où originent les cellules tumorales, contre la formation éventuelle des DCP. L'utilisation de deux techniques très sensibles pour détecter les DCP formés au niveau de l'ADN cellulaire ont permis de confirmer que l'organisation en multicouche de la peau humaine reconstruite par ingénierie tissulaire protège de façon efficace la couche basale contre les rayons UV-C [lesquels n'atteignent pas la surface terrestre]. Mais, de manière vraiment inattendue, elle ne protège pratiquement pas contre les rayons UV-B [rayons auxquels la peau est exposée]. Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'utilisation régulière d'écrans solaires. Lesquels peuvent constituer, et ce de façon plus importante que précédemment supposé, une des premières lignes de défense contre la photocarcinogenèse.

## 2. ARTICLE

# The Multilayered Organization of Engineered Human Skin Does Not Influence the Formation of Sunlight-Induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Cellular DNA<sup>1</sup>

Jean-Philippe **THERRIEN**, Mahmoud **ROUABHIA**, Elliot A. **DROBETSKY** and Régen **DROUIN**<sup>2</sup>

Departments of Medical Biology [J-P.T., R.D.], and Surgery [M.R.], Faculty of Medicine, Laval University; Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire [J-P.T., R.D.], and Unité de Biotechnologie [M.R.], Centre de Recherche, CHUQ, Pavillon Saint-François d'Assise, 10 de l'Espinay, Québec, Québec, Canada G1L 3L5; and Faculty of Medicine, Université de Montréal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4 [E.A.D.]

Running Title : Sunlight-induced cyclobutane pyrimidine dimers

Five key words : Sunlight; UV irradiation; DNA damage; skin cancer; human skin

<sup>1</sup> This work was supported by operating grants from the Medical Research Council (MRC-MT-12523) of Canada and "La Fondation du Pavillon Saint-François d'Assise" to R.D., from the MRC (MRC-MT-12550) to M.R. and from the National Cancer Institute of Canada to E.A.D. M.R. holds a scholarship from the "Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec", E.A.D. a scholarship from the MRC, and R.D. a scholarship from the Cancer Research Society Inc./MRC.

<sup>2</sup> To whom requests for reprints should be addressed. Régen Drouin

Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire,  
Centre de Recherche,  
Pavillon Saint-François d'Assise, CHUQ  
10 rue de l'Espinay,  
Québec (Québec) G1L 3L5, Canada

Tel.: (418) 525-4402

Fax: (418) 525-4481

email: [regen.drouin@crsfa.ulaval.ca](mailto:regen.drouin@crsfa.ulaval.ca)

## **2.1 RÉSUMÉ**

Solar UVB initiates skin cancer mainly by generating highly premutagenic cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and subsequent mutations in critical growth-control genes. It is universally presumed that the upper epidermis in human skin blocks a significant portion of the incident UVB, thereby protecting the cancer-prone basal layer from CPD formation. Using two sensitive techniques for measuring CPD in cellular DNA, we confirmed that the multilayered organization of engineered human skin efficiently shields the basal layer against 254-nm UVC (which is not present in terrestrial sunlight) but, very unexpectedly, provides virtually no protection against environmentally relevant UVB. This underscores the importance of regular sunscreen use, which, in light of our data, may constitute a considerably more important first line of defence against photocarcinogenesis than previously believed.

**The abbreviations used are :** CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; DME, Dulbecco's modified Eagle; DMEH, Dulbecco's modified Eagle-Ham's; EHS, engineered human skin; LMPCR, ligation-mediated polymerase chain reaction; SSL, simulated sunlight.



## **2.2 INTRODUCTION**

The induction of CPDs<sup>3</sup> in DNA by the UVB component of sunlight is a preeminent determinant in the development of skin cancer, the most frequent neoplasia in Caucasian populations (1, 2). The initiation of most cutaneous tumors requires penetration of solar UV to the actively dividing (*i.e.*, cancer-prone) basal layer of the epidermis, where CPD and subsequent mutations are generated in oncogenes and tumor suppressor genes, including the *p53* tumor suppressor gene which is mutated specifically by sunlight in over 90% of nonmelanoma tumors (3-6). Basic scientific intuition dictates that the upper epidermal layers, most prominently the stratum corneum, passively protect the basal layer against CPD formation (and, hence, against sunlight-induced mutation and cancer) by scattering and absorbing a significant portion of the incident UVB (7). Here, we have used EHS tissue in addition to pure human keratinocyte or fibroblast monolayer cultures, that were irradiated with environmentally relevant UVB (290-320 nm) or broad-spectrum simulated sunlight (SSL ; 290 - 1100 nm) as well as with the model mutagen 254-nm UVC (which is vastly attenuated at the surface of the earth by stratospheric ozone). For each experimental condition, CPD formation was quantified at two levels : (a) within the genome overall (hereafter referred to as “global CPD frequency”) and (b) at nucleotide resolution (hereafter referred to as “CPD distribution”) along exons 5-8 of the *p53* tumor suppressor gene. This comparative analysis, *i.e.*, using different UV wavelengths in conjunction with diverse model systems, has permitted a direct evaluation of the UV shielding capacity of the upper epidermis. Our results indicate that the multilayered organization of cutaneous cells in the upper epidermis of human skin does not attenuate the formation of CPD induced by environmentally relevant solar wavelengths in the basal layer,

thus bringing into question a universally accepted maxim in the field of photocarcinogenesis.

### **2.3 MATÉRIEL & MÉTHODES**

***Cutaneous cell isolation.*** Keratinocytes and fibroblasts were isolated from normal human skin biopsies as previously described (8, 9). Briefly, fresh skin biopsies were immediately cut into 5-mm x 5-mm pieces and treated with 500 mg/ml thermolysin (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) overnight at 4°C, which allows complete separation of the epidermis from the dermis. The epidermis was treated with 0.05% trypsin-0.1% EDTA, and the dermis with collagenase (0.1%). The cells were then treated separately and adjusted to the desired concentration.

***Keratinocyte and fibroblast cultures.*** Both cell types were seeded into culture flasks (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). Keratinocytes were seeded at a concentration of  $9 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in DMEH medium as reported previously (9). Human fibroblasts were seeded at  $10^6$  cells/flask in growth-factor-supplemented DMEM. The medium was changed three times a week for both cell types. When the cultures reached 70-80% confluence for keratinocytes and 100% for fibroblasts, the cells were detached with trypsin-EDTA solution, washed twice, and then resuspended in DMEH or DMEM-supplemented medium for human skin preparation.

***EHS preparation.*** EHS was produced as previously described (9, 10). Briefly, bovine type-I collagen (2 mg/ml) was mixed with a normal human

fibroblast suspension ( $1.5 \times 10^6$  cells) and poured into a Petri dish (35 mm diameter) to produce dermis. These tissues were cultured in 10% FCS-supplemented culture medium for 4 days, and then keratinocytes ( $9 \times 10^4/\text{cm}^2$ ) were seeded on the dermis to obtain EHS. These were grown under submerged conditions in DMEH-supplemented culture medium lacking hydrocortisone. To generate an intact stratum corneum, the EHS were grown for 5 additional days at the air-medium interface.

**UV irradiation.** EHS, keratinocytes and fibroblasts for *in vivo* UV exposure as well as naked DNA for *in vitro* exposure were irradiated on ice. Naked DNA was diluted in physiological buffered solution consisting of 150 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) at a concentration of 65  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . For UV irradiation, pure fibroblast and keratinocyte monolayer cultures were grown to confluence and irradiated in Petri dishes after replacing the medium with cold 0.9% NaCl. The SSL was produced by a 2500-W xenon arc lamp (Hanovia) delivering  $1,042 \text{ J}/\text{m}^2/\text{s}$ . The incident light was filtered through a sheet of cellulose acetate (Kodacel TA-407 clear 0.015-inch ; Eastman-Kodak Co.), which efficiently blocks contaminating wavelengths below 290 nm. The UVB light source consisted of two tubes (FS20T12/UVB/BP ; Philips) delivering  $9.58 \text{ J}/\text{m}^2/\text{s}$  through a sheet of cellulose acetate. The 254-nm UVC light was provided by two germicidal tubes (TUV 15W G 15 T8 ; Philips) delivering  $12.66 \text{ J}/\text{m}^2/\text{s}$ . The doses of SSL, UVB and 254-nm UVC (*i.e.*, 5 000, 50, and  $1 \text{ kJ}/\text{m}^2$ , respectively) used for EHS, keratinocytes, fibroblasts and naked DNA were predetermined to produce equivalent CPD frequencies of 1 CPD per 150 nucleotides. Following UV exposure of EHS, the epidermis was separated from the dermis, and then the stratum corneum was peeled off using a

fine tweezer. The keratinocytes were isolated, and DNA was extracted as described (11). The global CPD frequency was determined with 1.5% alkaline agarose gels after T4 endonuclease V cleavage of the CPD, as described previously in detail (12).

**LMPCR.** Details of the LMPCR protocol have already been published (11, 13). Briefly, monolayer cells or EHS were irradiated with 254-nm UVC, UVB, and SSL. The genomic DNA was isolated immediately and digested with T4 endonuclease V to incise DNA at CPD, and the resulting 5'-pyrimidine overhang was removed by photoreactivation using *Escherichia coli* photolyase to generate ligatable ends (13, 14). A gene-specific oligonucleotide was annealed downstream of the break site, and a set of genomic cleavage products extended using Sequenase. 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. The longer oligonucleotide of this same linker, in conjunction with another gene-specific primer, was then used in a PCR reaction to amplify the cleavage products of interest. These products were visualized alongside a Maxam and Gilbert sequencing ladder, and the intensities of the bands produced in UV-irradiated DNA are proportional to the amount of damage at the corresponding sites on the sequencing ladder. Primers specific for the human *p53* gene were selected and used as described previously (4). Primer extension, which was initiated with 0.96 to 1.6  $\mu\text{g}$  of DNA, and ligation of the linker, PCR, gel electrophoresis, electroblotting transfer, probe preparation and hybridization were carried out as reported previously (11, 13). Each experimental condition was assayed in triplicate. A screening sequencing gel was run using a portion of the DNA to ensure that there was no significant variation

between samples. The three samples were then pooled on a combined gel, and the autoradiogram was analyzed using a PhosphorImager (15).

## **2.4 RÉSULTATS & DISCUSSION**

For investigations of sunlight-induced DNA damage and mutation, the use of either pure cutaneous monolayer cell cultures (*i.e.*, mainly keratinocytes or fibroblasts), animal models, or human skin biopsies presents major limitations : (a) pure monolayer cell cultures are clearly very different from multilayered human skin *in situ* ; (b) species differences often render extrapolations to the human situation extremely difficult ; and (c) the use of human volunteers is unreliable and entails ethical problems. The use of EHS significantly mitigates each of these limitations, thereby constituting a critical alternative model system. Indeed, as illustrated in Fig. 1 and confirmed by previous histological studies and electron microscopy (16, 17), EHS presents dermal and epidermal structures comparable to normal skin. The reconstructed dermis is composed of well-oriented fibroblasts within an extracellular matrix containing both type I and type III collagens. It is particularly pertinent in terms of this study to note that EHS presents a structurally intact epidermis manifesting normal keratin distribution (18, 19), together with well-organized desmosomes, stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum germinativum (basal layer ; Refs. 8 and 16). The stratum corneum in EHS, in a similar manner to normal skin, consists of many layers of flat, anucleate cells characterized by thickened plasma membranes, with the cytoplasm replaced by keratin. The processes by which cells were joined in the spiny layer are no longer visible, and the lifeless cells are closely packed together without any apparent interstices. Therefore, the stratum corneum and multilayered organization of the epidermal cells in EHS, as for

human skin *in situ*, would clearly be expected to attenuate UV penetration to the deepest layers of the stratum spinosum and stratum germinativum, thereby protecting these tissues against the formation of carcinogenic UV-induced photoproducts.

Preceding studies have examined CPD formation either in cultured cell lines, or in human or murine skin, following exposure to particular UV wavelengths (*i.e.*, usually either 254-nm UVC or polychromatic UVB). To our knowledge, no investigations have rigorously examined CPD formation following exposure to different wavelengths in diverse model systems, nor has EHS been used for such purposes. Such comparative analyses are necessary to directly evaluate the capacity of the upper epidermal layers to attenuate specific UV wavelengths. We, therefore, quantified the initial formation of CPD in monolayer cells (cutaneous fibroblasts and keratinocytes) as well as in EHS, following exposure to 254-nm UVC, UVB, and SSL. The measurement of CPD provides not only a highly relevant biological end point with respect to photocarcinogenesis but also a valid indicator of UVB penetration through skin, because CPDs are formed almost exclusively via direct absorption of UVB photons by DNA.

Following irradiation of purified DNA, monolayer cells, or EHS with either 254-nm UVC, UVB, or SSL, the DNA was immediately extracted and cleaved with the (CPD-specific) enzyme T4 endonuclease V, to convert virtually all of the CPD to single-strand breaks. The average break frequency was then directly correlated with the global CPD frequency within genomic DNA via gel-mobility shift analysis on denaturing agarose gels, as described previously (12, 20). Irradiation of purified DNA (*in vitro*) with 1 kJ/m<sup>2</sup> of 254-nm UV, 50

$\text{kJ/m}^2$  of UVB, and  $5\,000\ \text{kJ/m}^2$  of SSL each yielded equivalent CPD levels, *i.e.*, 64-68 adducts per 10 kb (Fig. 2, A, *Lanes 12-14* and B, *Lanes 12-14*). When pure fibroblast or keratinocyte monolayers were irradiated under the same conditions, between 35 and 68 CPDs per 10 kb were initially formed for each treatment (Fig. 2, A, *Lanes 15-20* and B, *Lanes 15-17*). A reduced amount of CPD (only 8 adducts per 10 kb) was generated when EHS was exposed to  $1\ \text{kJ/m}^2$  of 254-nm UV. This result was fully expected, and demonstrates that the stratum corneum and multilayered organization of the EHS protect against 254-nm UV-induced CPD (Fig.2B, *Lane 18*). However, fully 60-65 CPDs per 10 kb were generated when EHS is exposed to either  $50\ \text{kJ/m}^2$  of UVB or  $5\,000\ \text{kJ/m}^2$  of SSL (Fig. 2B, *Lanes 19* and *20*). Thus, in striking contrast to the situation for 254-nm UVC, CPD induction levels were virtually identical for EHS, keratinocytes, and fibroblasts, following irradiation with either UVB or SSL. It, therefore, appears that the stratum corneum and multilayered organization of human skin offer virtually no protection against penetration of environmentally relevant UVB and SSL to the cancer-prone basal layer of the epidermis.

In another approach, CPD formation was quantified at nucleotide resolution along exons 5-8 of the human *p53* gene using the LMPCR. The LMPCR protocol, which has been described in detail elsewhere (Refs. 11 and 13 ; see "Materials and Methods" for overview), can be used to investigate any DNA adduct (including CPDs) that can be converted to a ligatable strand break following enzymatic or chemical cleavage. Compared to the situation for 254-nm UV and in general agreement with previous studies (15, 21), UVB- and SSL-irradiated cells manifested enhanced CPD formation at the majority of cytosine homodimers along the *p53* gene, with a corresponding relative reduction in

damage levels at TT homodimers. This enhanced CPD formation was especially remarkable at methylated dipyrimidine sites, *i.e.*, CC<sup>m</sup>G and TC<sup>m</sup>G. Taking these differences into account, the comparative LMPCR data presented here clearly demonstrate, in accordance with the global CPD measurements presented above, that overall levels of CPD within the *p53* gene are significantly attenuated in EHS *versus* monolayer cells irradiated with 254-nm UVC but that there is virtually no such difference following treatment with either UVB or SSL (Figs. 3 and 4). It should also be mentioned that because fibroblasts, keratinocytes and EHS bear diverse cellular properties, one might expect differences in CPD distribution patterns at the DNA sequence level, *i.e.*, on a site-by-site basis. It is, therefore, noteworthy that the initial CPD distribution patterns were very similar for keratinocytes, fibroblasts, and EHS under all irradiation conditions, demonstrating that specific cellular properties do not significantly affect the sequence specificity of CPD formation (Figs. 3 and 4).

Our demonstration that the upper layers of the epidermis in EHS provide virtually no protection against carcinogenic DNA damage induced by environmentally relevant sunlight may have fundamental implications for the prevention of cutaneous tumours. Indeed, whereas skin cancer is currently the most frequent neoplasia in Caucasian populations, the incidence of this disease can be vastly reduced through heightened awareness, among clinicians and the public alike, of the necessity to avoid direct solar UV exposure. The possibility that the upper epidermis represents an ineffective barrier to solar UVB penetration provides powerful reinforcement for the importance of regular sunscreen use, which may constitute a far more critical (and highly) effective first line of defence against the initiation of photocarcinogenesis than previously believed. Moreover, in the case of fair-skinned individuals endowed with only



very low levels of melanin, sunscreens may indeed represent the only primary source of protection against the induction of DNA photoproducts in the skin cancer-prone basal layer of the epidermis.

## **2.5 REMERCIEMENTS**

The authors are extremely grateful to Geneviève Ross and Nathalie Bastien for technical assistance and A. Sancar and R.S. Lloyd for kindly supplying photolyase and T4 endonuclease V, respectively. This work was supported by operating grants from the Medical Research Council (MRC-MT-12523) of Canada and "La Fondation du Pavillon Saint-François d'Assise" to R.D., from the MRC (MRC-MT-12550) to M.R. and from the National Cancer Institute of Canada to E.A.D. M.R. holds a scholarship from the "Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec", E.A.D. a scholarship from the MRC, and R.D. a scholarship from the Cancer Research Society Inc./MRC.

## **2.6 RÉFÉRENCES**

1. Urbach, F. Potential effects of altered solar ultraviolet radiation on human skin cancer, *Photochem Photobiol.* 50 : 507-13, 1989.
2. Glass, A. G. and Hoover, R. N. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer [see comments], *Jama.* 262 : 2097-100, 1989.
3. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J., and Ponten, J. A role for sunlight in skin cancer : UV-induced *p53* mutations in squamous cell carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 : 10124-8, 1991.
4. Tornaletti, S., Rozek, D., and Pfeifer, G. P. The distribution of UV photoproducts along the human *p53* gene and its relation to mutations in skin cancer [published erratum appears in *Oncogene* 1993 Dec;8(12):3469], *Oncogene.* 8 : 2051-7, 1993.
5. Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E., and et al. Mutation hotspots due to sunlight in the *p53* gene of nonmelanoma skin cancers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 : 4216-20, 1993.
6. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. Slow repair of pyrimidine dimers at *p53* mutation hotspots in skin cancer [see comments], *Science.* 263 : 1436-8, 1994.
7. Anderson, R. R. and Parrish, J. A. The optics of human skin, *J Invest Dermatol.* 77 : 13-9, 1981.
8. Paquet, I., Chouinard, N., and Rouabhia, M. Cutaneous cell and extracellular matrix responses to ultraviolet-B irradiation, *J Cell Physiol.* 166 : 296-304, 1996.

9. Rouabhia, M., Jobin, N., Doucet, R., Jr., Bergeron, J., and Auger, F. A. CD36(+)-dendritic epidermal cells : a putative actor in the cutaneous immune system, *Cell Transplant.* 3 : 529-36, 1994.
10. Rouabhia, M. In vitro production and transplantation of immunologically active skin equivalents, *Lab Invest.* 75 : 503-17, 1996.
11. Drouin, R., Rodriguez, H., Holmquist, G. P., and Akman, S. A. Ligation-mediated PCR for analysis of oxidative DNA damage. *In* : G. P. Pfeifer (ed.) *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, pp. 211-225. New York : Plenum Press, 1996.
12. Drouin, R., Gao, S., and Holmquist, G. P. Agarose gel electrophoresis for DNA damage analysis. *In* : G. P. Pfeifer (ed.) *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, pp. 37-43. New York : Plenum Press, 1996.
13. Tornaletti, S. and Pfeifer, G. P. Ligation-mediated PCR for analysis of UV damage. *In* : G. P. Pfeifer (ed.) *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, pp. 199-209. New York : Plenum Press, 1996.
14. Pfeifer, G. P., Drouin, R., Riggs, A. D., and Holmquist, G. P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo, *Mol Cell Biol.* 12 : 1798-804, 1992.
15. Drouin, R. and Therrien, J. P. UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in *p53*, *Photochem Photobiol.* 66 : 719-26, 1997.
16. Font, J., Braut Boucher, F., Pichon, J., Noel Hudson, M. S., Muriel, M. P., Bonnet, M., Wepierre, J., and Aubery, M. A new three-dimensional culture of human keratinocytes : optimization of differentiation, *Cell Biol Toxicol.* 10 : 353-9, 1994.

17. Contard, P., Bartel, R. L., Jacobs, L. d., Perlish, J. S., MacDonald, E. D. d., Handler, L., Cone, D., and Fleischmajer, R. Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone, *J Invest Dermatol.* *100* : 35-9, 1993.
18. Rosdy, M. and Clauss, L. C. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface, *J Invest Dermatol.* *95* : 409-14, 1990.
19. Slivka, S. R., Landeen, L. K., Zeigler, F., Zimber, M. P., and Bartel, R. L. Characterization, barrier function, and drug metabolism of an in vitro skin model, *J Invest Dermatol.* *100* : 40-6, 1993.
20. Willis, C. E., Willis, D. G., and Holmquist, G. P. An equation for DNA electrophoretic mobility in agarose gels, *Appl Theor Electrophor.* *1* : 11-8, 1988.
21. Tommasi, S., Denissenko, M. F., and Pfeifer, G. P. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases, *Cancer Res.* *57* : 4727-30, 1997.

## 2.7 LÉGENDES

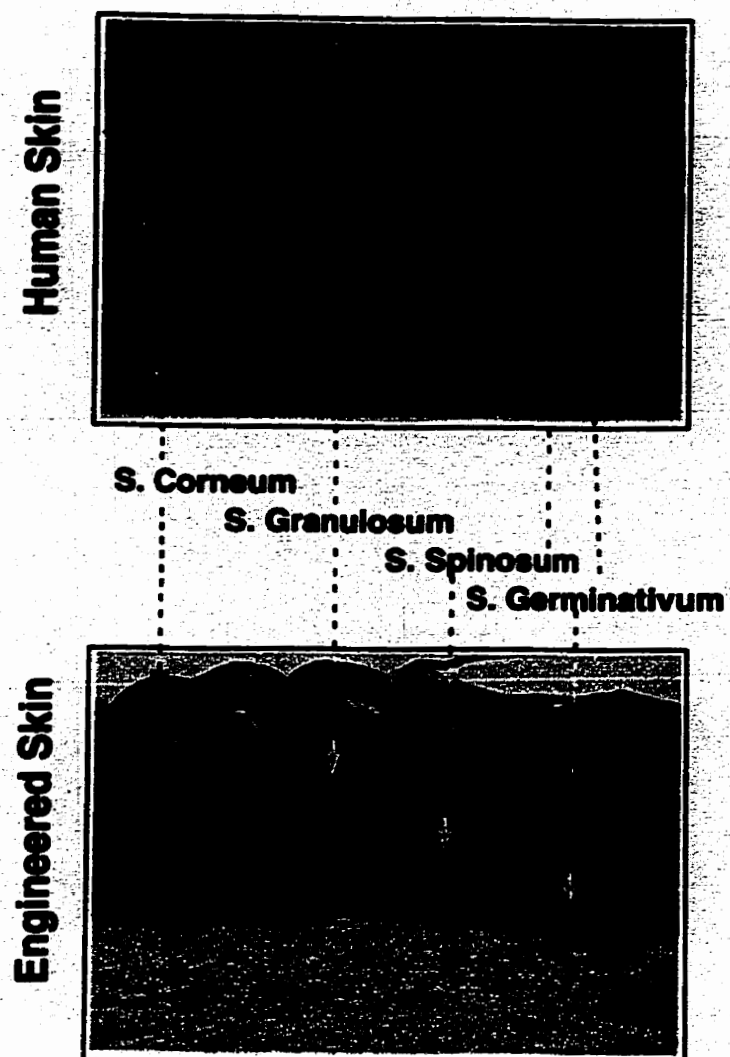
**Figure 1** Structural comparison of normal human skin (H&E Staining) with EHS (Trichrome de Masson Staining) showing the different strata (S.). Magnification, x300.

**Figure 2** Alkaline gel electrophoresis display of CPD frequency for fibroblasts (*Fibro*), keratinocytes (*Kerato1* and *Kerato2*) and EHS (*H Skin*) exposed to 254-nm UV (*C\**), UVB (*B\**) and simulated sunlight (*SL\**). A, purified DNA, not irradiated but digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*Lane 2*). Purified human keratinocyte DNA (*In Vitro*) was exposed to 254-nm UV, UVB, and SSL and treated with buffer alone (*No Digestion, Lanes 3-5*) or digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*T<sub>4</sub> endo V Digestion, Lanes 12-14*). Confluent human fibroblasts exposed to 254-nm UV, UVB, and SSL and treated with buffer alone (*Lanes 6-8*) or digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*Lanes 15-17*). Confluent human keratinocytes were exposed to 254-nm UV, UVB and SSL and treated with buffer alone (*Lanes 9-11*) or digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*Lanes 18-20*) and run on 1.2% agarose. B, human skin (*Control*) and keratinocytes (*No UV*) unirradiated but digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*Lanes 10 and 11*). Purified human keratinocyte DNA (*In Vitro*) exposed to 254-nm UV, UVB, and SSL and treated with buffer alone (*No Digestion, Lanes 2-4*) or digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*T<sub>4</sub> endo V Digestion, Lanes 12-14*). Confluent human keratinocytes from a different culture than part A exposed to 254-nm UV, UVB, and SSL and treated with buffer alone (*Lanes 5-7*) or digested with T<sub>4</sub> endonuclease V (*Lanes 15-17*). Human skin exposed to 254-nm UV, UVB, and SSL and treated with buffer alone (*Lanes 8 and 9*) or digested with T<sub>4</sub>

endonuclease V (*Lanes 18-20*) and run on 1.5% agarose. *Lanes 1 (A and B)*, *HindIII*  $\lambda$  bacteriophage plus *HaeIII*-digested  $\text{\O}X174$  DNA molecular weight standards (*M*). The doses used are : 1 kJ/m<sup>2</sup> of 254-nm UV, 50 kJ/m<sup>2</sup> of UVB, and 5 000 kJ/m<sup>2</sup> of SSL.

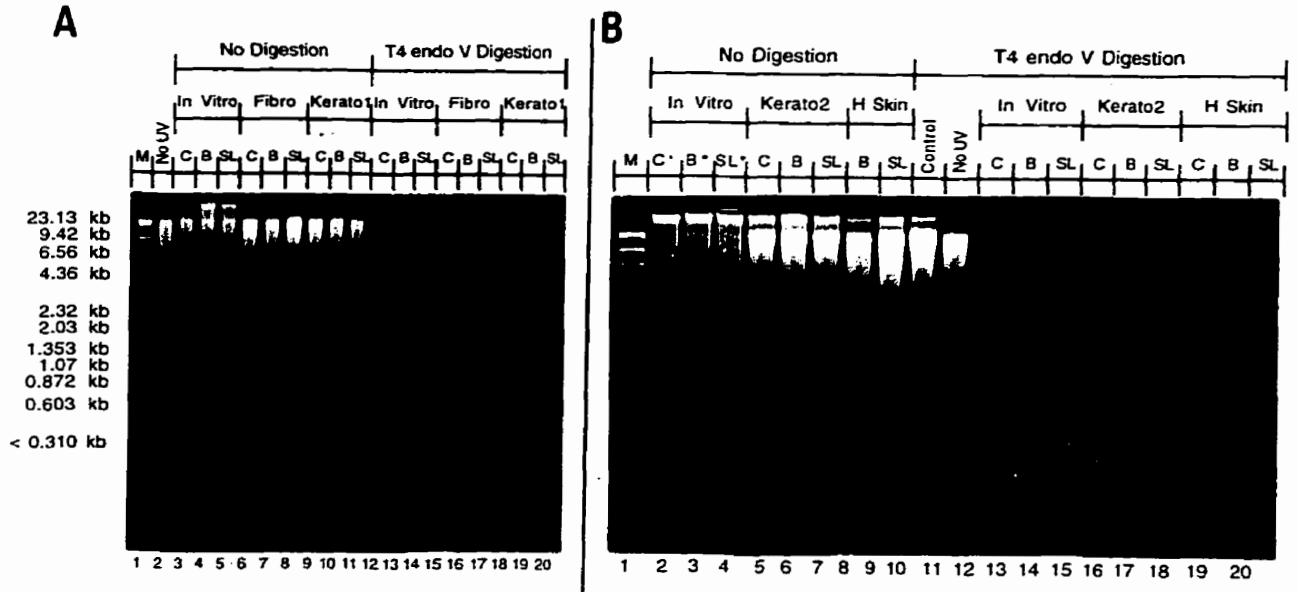
**Figure 3** Distribution of CPD along *p53* exon 7 on the nontranscribed strand (*A*) *p53* exon 5 on the transcribed strand (*B*). As a reference, a small portion of the Maxam-Gilbert-derived sequence is shown on the right. Codons 247-248 (*A*) and codons 154-153, 171-170, and 186-185 (*B*) are indicated ; *C<sup>m</sup>*, a methylated cytosine. *Lanes 1-4*, LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions ; *Lanes 5, 9 and 14*, LMPCR of 254-nm UV-, UVB-, and SSL-irradiated purified DNA (*T\** : *in vitro*) followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion. *Lanes 6, 10 and 15*, LMPCR of 254-nm UV-, UVB-, and SSL-irradiated fibroblasts (*F\**) followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion. *Lanes 7, 8, 11, 12, 16 and 17*, LMPCR of 254-nm UV-, UVB-, and SSL-irradiated keratinocytes (*K1\** and *K2\**) followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion ; *Lanes 13 and 18*, LMPCR of UVB- and SSL-irradiated human skin (*HS\**) followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion ; *Lane 19*, LMPCR of unirradiated DNA followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion. Keratinocytes K1 and K2 represent two sets of Petri dishes irradiated and harvested at different times, showing that the results are reproducible. *B*, *Lanes 5-9*, LMPCR of 254-nm UV-irradiated purified DNA, fibroblasts, keratinocytes and human skin followed by T<sub>4</sub> endonuclease V/photolyase digestion. Because the 254-nm UV-induced CPD formation is much less frequent in human skin than in fibroblasts and keratinocytes, there is much more DNA in *Lane 9* to achieve a comparable band intensity.

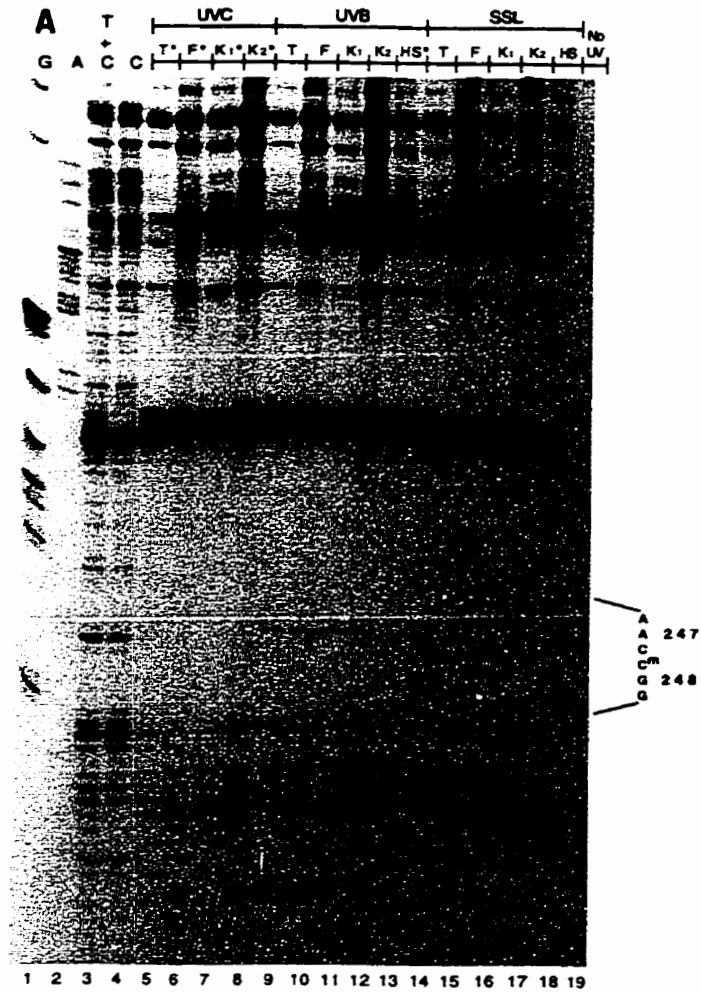
**Figure 4** Distribution of CPD along the transcribed strand of *p53* exon 7 (A) and *p53* exon 8 (B). As a reference, a small portion of the Maxam-Gilbert-derived sequence is shown on the *right*. *Lanes 1-4*, LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions ; *Lanes 5-7*, LMPCR of UV-irradiated purified DNA (*In Vitro*) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion ; *Lanes 8-13*, LMPCR of UV-irradiated fibroblasts (*Fibro*, *Lanes 8-10*) and keratinocytes (*Kerato1*, *Lanes 11-13*) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion ; *Lane 14*, LMPCR of unirradiated DNA followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. *Lanes C*, 254-nm UV ; *Lanes B*, UVB ; *Lanes SL*, SSL ; *C<sup>m</sup>*, methylated cytosine. Boxed triplets, codons 245 and 248 ; *arrows*, mutational hotspots in codons 245 and 248 (A). *Arrows*, dipyrimidine-methylated sites at codons 283-282, 298-297, and 307-306 (B).

**2.8 FIGURE 1**

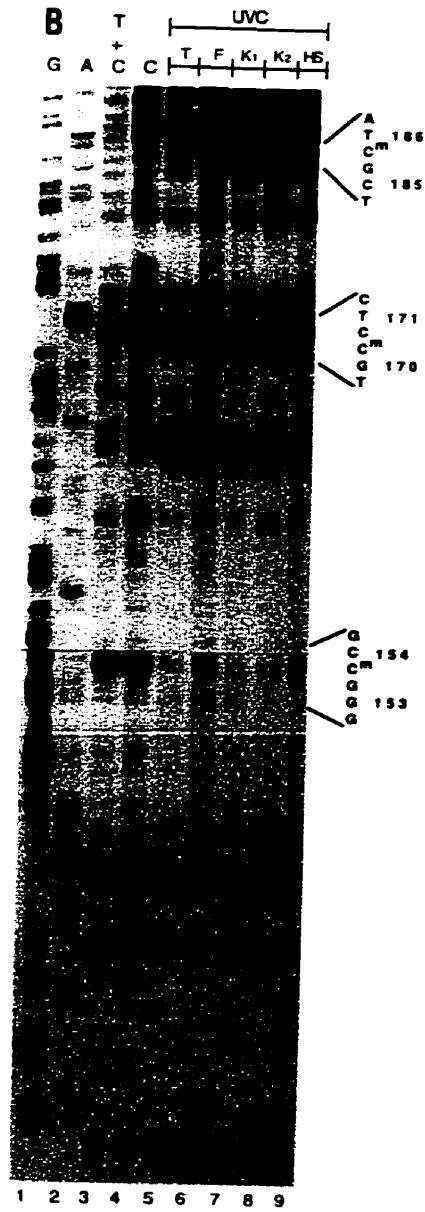


**2.9 FIGURE 2**

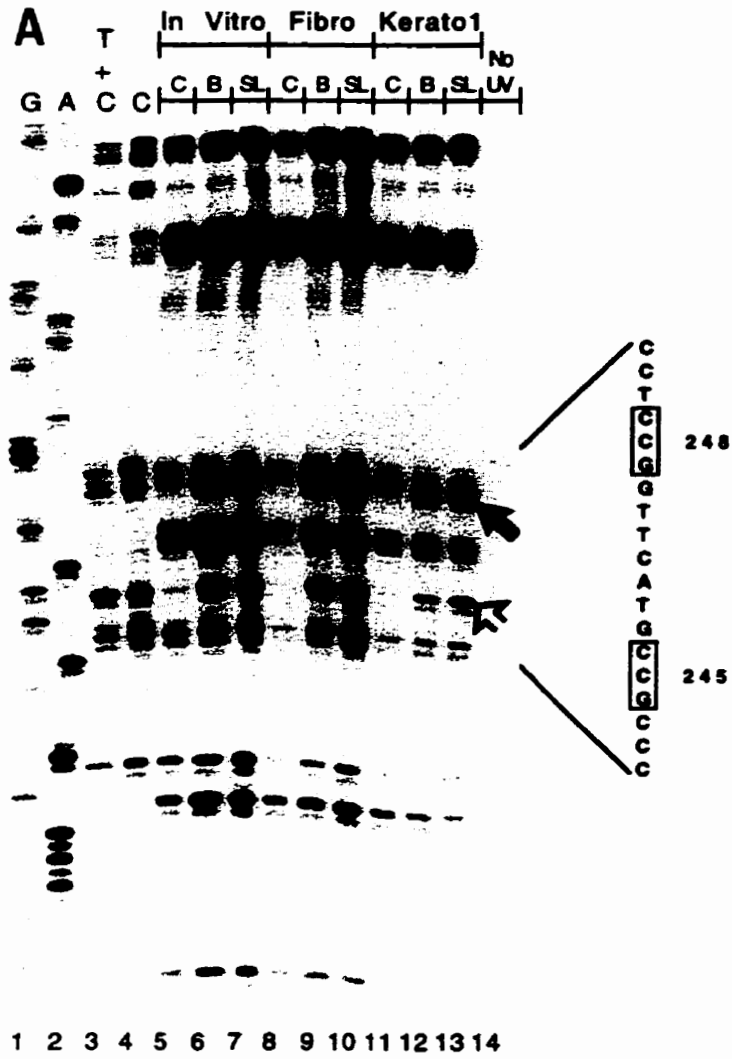


2.10 **FIGURE 3A**

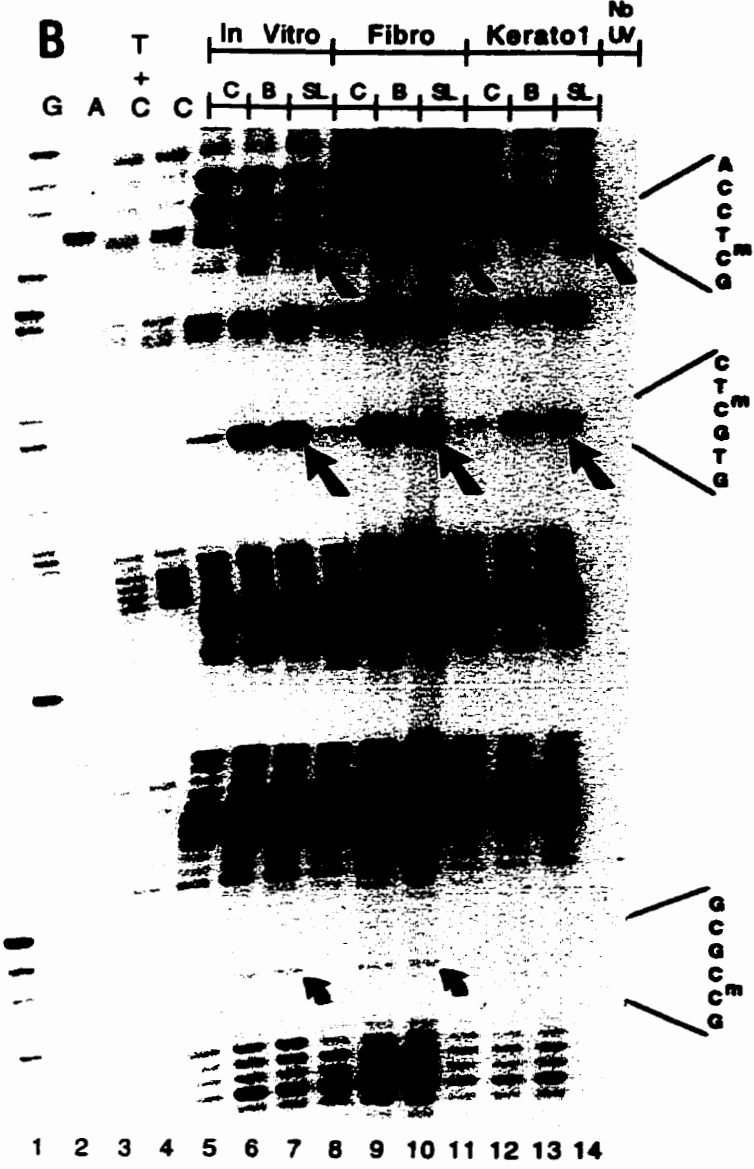
**2.11 FIGURE 3B**



2.12 FIGURE 4A



2.13 **FIGURE 4B**



## **CHAPITRE IV :**

**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**

*[Proceedings of the National Academy of Science in USA, 1999, 96(26) : 15038-15043]*

## **1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS**

L'exposition de l'ADN aux UV entraîne l'accumulation intracellulaire de la protéine p53. Cette dernière active la transcription des gènes impliqués dans 1) l'arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre la réparation de l'ADN avant l'entrée de la cellule en phase de synthèse, et 2) l'apoptose, afin de prévenir la formation de mutations dans une cellule qui a accumulé une trop grande quantité de dommages à l'ADN pour être réparés de façon efficace. Des résultats récents ont montré que p53 joue un rôle dans la réparation par excision de nucléotides (REN). Par contre, il a été postulé que la protéine du rétinoblastome (pRb) soit impliquée dans la REN, mais cela n'a jamais été montré expérimentalement. Afin de caractériser plus précisément le rôle des protéines p53 et pRb dans la REN, des cellules humaines primaires représentant les différentes combinaisons de déficience en p53 et pRb, ont été irradiées aux rayons UVB (450 J/m<sup>2</sup>). La technique LMPCR a été utilisée pour déterminer au niveau de chaque nucléotide la vitesse de réparation des dimères cyclobutyliques de pyrimidines (DCP) au niveau des gènes *p53* et *c-jun*. Après irradiation aux UVB, une diminution majeure de la REN a été observée au niveau des brins transcrit (réparation couplée à la transcription ; TCREN) et non-transcrit (réparation globale, GREN) dans les cellules déficientes en p53. Dans les cellules p53+/+ mais déficientes en pRb, la réparation globale des DCP est significativement retardée. En conclusion, ces résultats constituent la première démonstration directe du rôle majeur de p53 dans la TCREN, ainsi que du rôle possible de pRb dans la réparation de lésions pré-mutagéniques induites à l'ADN par les rayons UVB.

**2. ARTICLE**

**Human Cells Compromised For P53 Function Exhibit Defective Global- And Transcription Coupled-Nucleotide Excision Repair Whereas Cells Compromised For pRb Function are Defective Only in Global Repair**

**Jean-Philippe THERRIEN\*, Régen DROUIN\*, Caroline BARIL†, and Elliot A. DROBETSKY†**

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

† Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada

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

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 : [drobetse@ere.umontreal.ca](mailto:drobetse@ere.umontreal.ca)



## **2.1 RÉSUMÉ**

After exposure to DNA damaging agents, the p53 tumor suppressor protects against neoplastic transformation by inducing growth arrest and apoptosis. A series of investigations has also demonstrated that, in UV-exposed cells, p53 regulates the removal of DNA photoproducts from the genome overall (global nucleotide excision repair), but does not participate in an overlapping pathway that removes damage specifically from the transcribed strand of active genes (transcription-coupled nucleotide excision repair). Here, the highly sensitive ligation-mediated PCR was employed to quantify, at nucleotide resolution, the repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in genetically p53-deficient Li-Fraumeni skin fibroblasts, as well as in human lung fibroblasts expressing the human papillomavirus (HPV) E6 oncoprotein that functionally inactivates p53. Lung fibroblasts expressing the HPV E7 gene product, which similarly inactivates the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRb), were also investigated. pRb acts downstream of p53 to mediate G1 arrest, but has no demonstrated role in DNA repair. Relative to normal cells, HPV E6-expressing lung fibroblasts and Li-Fraumeni skin fibroblasts each manifested defective CPD repair along both the transcribed and nontranscribed strands of the *p53* and/or *c-jun* loci. HPV E7-expressing lung fibroblasts also exhibited reduced CPD removal, but only along the nontranscribed strand. Our results provide striking evidence that transcription-coupled repair, in addition to global repair, are p53-dependent in UV-exposed human fibroblasts. Moreover, the observed DNA repair defect in HPV E7-expressing cells reveals a novel function for this oncoprotein in HPV-mediated carcinogenesis, and may suggest a role for pRb in global nucleotide excision repair.

## **2.2 INTRODUCTION**

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

After exposure of cells to DNA damaging agents, p53 triggers multiple protective pathways, i.e., through transactivation of genes, and through protein-protein interactions, that regulate growth arrest and apoptosis (5, 6). Moreover, different lines of evidence (see below) demonstrate that p53 participates directly in nucleotide excision repair (NER), a major pathway for the removal of carcinogenic DNA damage inflicted by diverse mutagenic agents. The physiological importance of NER is exemplified by the autosomal recessive disease Xeroderma pigmentosum (XP), in which affected individuals manifest defective removal of UV-induced DNA photoproducts and a concomitant 2000-fold increase in the frequency of sunlight-induced skin cancers (7). Two distinct, but overlapping NER pathways have been identified : one for the removal of damage from the genome overall [global NER (GNER)], and another, which is mechanistically linked to transcription, that brings about rapid, preferential repair

of adducts specifically on the transcribed strand (TS) of active genes [transcription-coupled NER (TCNER)] (8).

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

In a manner analogous to HPV E6, intracellular expression of the HPV E7 oncogene product plays a major role in the molecular development of HPV-positive malignancies by binding and functionally inactivating (also through accelerated proteasomal degradation) the retinoblastoma tumor suppressor (pRb) (20). This latter protein, which is frequently altered in a wide variety of sporadic tumor types (21), acts downstream of p53, as well as through p53-independent pathways, to regulate G<sub>1</sub> arrest in cells exposed to DNA damaging agents (22). Preliminary investigations suggesting a role for pRb in DNA repair (ref., 23) have not been adequately substantiated or refuted to date. However, it should be noted that HPV E7 interacts with a considerable number of proteins aside from pRb, some of which may conceivably be involved in DNA repair (see *Discussion*).

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

GNER. In addition, we show for the first time that HPV E7-expressing fibroblasts are deficient in GNER, but not TCNER, revealing a role for this oncoprotein in the pathogenesis of HPV-positive tumors.

### **2.3 MATÉRIEL & MÉTHODES**

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

***UV irradiation*** Cells were grown to confluence on 150-mm Petri dishes and irradiated with UVB (290-320nm) at room temperature after replacing the medium with 0.9% NaCl. The UVB source consisted of two tubes (FS20T12/UVB/BP, Phillips) delivering a fluence of 7.45 J/m<sup>2</sup>/s that was filtered through a screen of cellulose acetate (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch ; Eastman-Kodak). All cells were irradiated with 1 kJ/m<sup>2</sup> of UVB and allowed to repair for various times in freshly prepared culture medium. Cells were harvested, nuclear DNA extracted and quantified, and the global CPD frequency was determined in T4-endonuclease V-digested total genomic DNA by alkaline gel electrophoresis (26, 27)

***Ligation-mediated polymerase chain reaction*** The LMPCR protocol has been described previously in detail (26, 28). Briefly, after irradiation and incubation of cells, genomic DNA was isolated and digested with T4 endonuclease V to efficiently incise the DNA at CPD sites. The resulting 5'-pyrimidine overhangs were then removed by photoreactivation using *Escherichia coli* photolyase to generate ligatable ends. A gene-specific oligonucleotide was annealed downstream of the break site, and the set of genomic cleavage products extended using Sequenase. An asymmetric double-stranded linker was ligated to the phosphate groups at the fragment termini, providing a common sequence on the 5' end of all fragments. The longer oligonucleotide of this same linker, in conjunction with another gene-specific primer, 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 <sup>32</sup>P-labelled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. Each experimental condition was assayed in duplicate. A

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

## **2.4 RÉSULTATS & DISCUSSION**

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

incised strands (28). We therefore utilized LMPCR to investigate the repair of UVB-induced CPDs in human fibroblasts differing in p53 status.

Fig. 1 shows a representative autoradiogram and accompanying histogram that reflect CPD removal along the NTS of the *p53* tumor-suppressor gene at different time points up to 32 hr postirradiation in LF041- vs. normal-skin fibroblasts. It should be emphasized that the LF041 strain employed here is the same as that used in previous investigations to demonstrate p53 dependence for GNER, but not for TCNER (18). As expected, our data revealed that most of the CPDs were removed from the NTS strand of the *p53* gene in wild-type skin fibroblasts by 24 hr postirradiation, whereas LF041 cells manifested a significant impairment in this respect, i.e., quantification by phosphorimager and averaging of repair rates for 10 different dipyrimidine sites revealed that there was a delay, relative to normal cells, of approximately 3-fold in the time needed to achieve 50% repair (Table 1).

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



Because the immortalized LF041- and normal primary-skin fibroblasts were not isogenic, and to elucidate the role of HPV in tumorigenesis, we investigated repair at different sites along the TS vs. the NTS of the *p53* gene in HPV E6-expressing primary lung fibroblasts (which are functionally compromised for p53 protein, but which retain a normal p53 genotype). We also studied repair rates along the TS of the *c-jun* promoter region (located downstream of the transcription start site ; nucleotides -40 to -10) which is very rapidly repaired by TCNER (32). HPV E6-expressing cells manifested extremely low basal levels of p53 protein on Western blots, which did not increase after treatment with ionizing radiation or UVB, unlike the wild-type strain, where p53 protein was strongly up-regulated after DNA damage (data not shown). In agreement with results for genetically p53-deficient LF041 fibroblasts, HPV E6-expressing lung fibroblasts presented, relative to the normal isogenic counterpart, (i) an approximately 4-fold slower rate of repair along the NTS of the *p53* gene, and (ii) a similar 4-fold delay in repair along the TS of *p53* and of the *c-jun* promoter region (autoradiograms not shown, Table 1 ; compare histograms in Figs. 3 and 4).

Taken together, these data demonstrate that p53 deficiency, whether genetically or functionally imposed, engenders a profound defect in TCNER as well as in GNER, as measured along two different target genes (*p53* and *c-jun*), and in cells derived from different tissues (skin and lung). This result is consistent with studies supporting a role for p53 in TCNER, based on host-cell reactivation of a reporter gene carried on an adenovirus vector in p53-proficient vs. -deficient cell lines (33, 34). Remarkably however, our results are in complete disagreement with the persuasive studies cited earlier showing that p53 modulates only GNER, which used a strand-specific DNA repair assay. While

this Southern blot-based assay is certainly capable of detecting differences in TCNER *vs.* GNER, we emphasize that the LMPCR technique employed here is PCR-based, and, therefore, much more sensitive. In addition, LMPCR measures repair at nucleotide resolution, *i.e.*, at many different sites simultaneously, compared with only one overall measurement at the gene level in the previous studies. Formal explanations for the discrepancy could also be related to the different genetic targets employed (dihydrofolate reductase gene *vs.* *p53* and *c-jun*) or to the different UV wavelengths used to irradiate cells, *i.e.*, 254-nm UV in the previous studies *vs.* polychromatic UVB here, as these wavelengths exhibit dissimilar properties with respect to both genotoxicity and patterns of gene activation (35). However, it should be noted that the doses of 254-nm UV and UVB employed in the respective studies, *i.e.*, 20 J/m<sup>2</sup> of 254-nm UV compared with 1 kJ/m<sup>2</sup> of UVB, would be expected, according to predictions based on UV action spectra in human fibroblasts (36), to induce very similar yields of total CPD in the genome. Finally, in complete contrast with our own findings, Wani *et al.* (37) have recently presented LMPCR data which indicate defective GNER, but normal TCNER, in the same LFS skin fibroblast strain, and using one of the the same target genes (*i.e.*, *p53*), employed here. Aside from emphasizing that we have presented a much more extensive set of LMPCR results relative to the latter study, we are unable to provide an explanation for this discrepancy.

To explore the possibility that HPV E7 contributes to carcinogenesis by interfering with DNA repair, primary lung fibroblasts expressing this oncoprotein were investigated for rates of CPD removal along the NTS strand of the *p53* gene, and along the TS strands of *p53* and the *c-jun* promoter. Levels of pRb were barely detectable by Western blotting in HPV E7-expressing lung

fibroblasts, and were at drastically reduced levels relative to wild-type lung fibroblasts (data not shown). An autoradiogram reflecting CPD-repair rates along the NTS of the *p53* gene in HPV E7-expressing- vs. wild type-lung fibroblasts is presented in Fig. 3. The accompanying histogram reflects quantification of one representative dipyrimidine site ( TT, exon 8 of *p53*, codon 286) for LXSNI-, HPVE6-, E7-, and E6/E7-expressing cells. Averaging of repair rates for at least 10 different sites in each case revealed that HPV E7-expressing cells exhibit an approximate 3.6-fold delay, relative to cells expressing an empty LXSNI vector, in the time required to achieve 50% repair along the NTS of *p53* (Table 1). However, HPV E7 expression did not significantly affect CPD repair along the TS of the *p53* gene or the *c-jun* promoter (Fig. 4 and Table 1). Cells coexpressing HPV E6 and HPV E7 exhibited a very similar NER deficiency compared with cells expressing HPV E6 alone (Table 1), suggesting that these oncoproteins interfere in the same pathway leading to the global removal of UV-induced CPDs.

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

On the other hand, the precise molecular basis for the observed GNER defect in HPV E7-expressing cells remains to be determined. Because HPV E7 binds and inactivates pRb, as well as the functionally related “pocket proteins” p107 and p130 (42, 43), it is tempting to speculate that pRb (and/or pRb family members) plays a role in GNER. This might occur in a number of ways. For example, both pRb and HPV E7 are known to interact with histone deacetylases (44-45), and, furthermore, HPV E7 has been shown to associate with the nuclear matrix (46). This raises the interesting speculation that HPV E7-mediated modification of chromatin structure, possibly by means of pRb binding, leads to transcriptional repression of DNA-repair genes, and/or to alterations in repair-protein accessibility to damaged DNA, which may significantly compromise GNER (47). In addition, pRb is known to bind and possibly modulate the activity of topoisomerase II  $\alpha$  protein (48), which is clearly involved in DNA replication and recombination (49), and evidently in DNA repair (50, 51). Finally, pRb binds and stimulates the ubiquitous transcription factor AP-1, and HPV E7 abolishes this interaction (52). This abolition may certainly have important consequences with respect to the current findings, because cellular signalling mediated by AP-1 has a major impact on the DNA damage response, i.e., by modulating apoptosis, cell cycle arrest, and possibly DNA repair (53).

The situation is further complicated since HPV E7 influences proteins, other than pRb, which could affect DNA-repair rates. HPV E7 expression leads to elevated basal p53 protein expression (54), as well as upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1 independently of p53 (55, 56). This may have consequences for CPD removal, since p21waf1 may negatively regulate NER (57), although this protein has also been shown to stimulate NER in cultured cells (11). Finally, HPV E7 also interacts with TATA box-binding

protein (58, 59), thereby suggesting that various genes involved in GNER might be transcriptionally modulated in HPV E7-expressing cells.

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

## **2.5 REMERCIEMENTS**

We thank Mrs. Nathalie Bastien and Isabelle Paradis for technical assistance, and to Drs. R. Stephen Lloyd and Aziz Sancar for kindly supplying T4 endonuclease V and UV photolyase, respectively. This work was supported by grants (held separately by E.A.D. and R.D.) from the National Cancer Institute of Canada (with funds from the Canadian Cancer Society), and from the Medical Research Council of Canada. E.A.D. is a scholar of the Medical Research Council of Canada and R.D. is a scholar of the Cancer Research

Society Inc./ Medical Research Council of Canada. C.B. is supported by a graduate student fellowship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Quebec).

## **2.6 RÉFÉRENCES**

1. Harris, C. C. (1996) *Environmental Health Perspectives* **104**, 435-439.
2. Malkin, D. (1994) *Biochim Biophys Acta* **1198**, 197-213.
3. Kesisis, T. D., Slebos, R. J., Nelson, W. G., Kastan, M. B., Plunkett, B. S., Han, S. M., Lorincz, A. T., Hedrick, L. & Cho, K. R. (1993) *Proc Natl Acad Sci (USA)* **90**, 3988-3992.
4. Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H. U. & O'Connor, M. J. (1999) *J Virol* **73**, 6209-6219.
5. Prives, C. & Hall, P. A. (1999) *J Pathol* **187**, 112-126.
6. Giaccia, A. J. & Kastan, M. B. (1998) *Genes Dev* **12**, 2973-2983.
7. Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. (1984) *Carcinogenesis* **5**, 511-514.
8. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. (1999) *Genes Dev* **13**, 768-785.
9. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O. Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1995) *Oncogene* **10**, 1053-1059.
10. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., PM, O. C. & Fornace, A. J., Jr. (1994) *Science* **266**, 1376-1380.
11. Sheikh, M. S., Chen, Y. Q., Smith, M. L. & Fornace, A. J., Jr. (1997) *Oncogene* **14**, 1875-1882.
12. Shivji, K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. (1992) *Cell* **69**, 367-374.

13. Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C. & Winchester, E. (1993) *Nature* **365**, 79-82.
14. Coverley, D., Kenny, M. K., Munn, M., Rupp, W. D., Lane, D. P. & Wood, R. D. (1991) *Nature* **349**, 538-541.
15. Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G. & et al. (1995) *Nature Genetics* **10**, 188-195.
16. Ford, J. M., Baron, E. L. & Hanawalt, P. C. (1998) *Cancer Res* **58**, 599-603.
17. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997) *J Biol Chem* **272**, 28073-28080.
18. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1995) *Proc Natl Acad Sci (USA)* **92**, 8876-8880.
19. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. (1999) *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **96**, 424-428.
20. Boyer, S. N., Wazer, D. E. & Band, V. (1996) *Cancer Res* **56**, 4620-4624.
21. Bookstein, R. & Lee, W. H. (1991) *Crit Rev Oncog* **2**, 211-227.
22. Sherr, C. J. (1996) *Science* **274**, 1672-1677.
23. Weichselbaum, R. R., Nove, J. & Little, J. B. (1978) *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **75**, 3962-3964.
24. McKay, B. C., Ljungman, M. & Rainbow, A. J. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 1389-1396.
25. Foster, S. A. & Galloway, D. A. (1996) *Oncogene* **12**, 1773-1779.

26. Drouin, R., Rodriguez, H., Holmquist, G. P., & Akman, S. A. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P., (Plenum Press, New York), pp. 211-225.
27. Drouin, R., Gao, S., & Holmquist, G. P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G. P., (Plenum Press, New York), pp. 37-43.
28. Tornaletti, S. & Pfeifer, G.P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer, G.P., (Plenum Press, New York), pp. 211-225.
29. Rozek, D. & Pfeifer, G. P. (1993) *Mol Cell Biol* **13**, 5490-5499.
30. Tornaletti, S., Rozek, D. & Pfeifer, G. P. (1993) *Oncogene* **8**, 2051-2057.
31. Gordon, L. K. & Haseltine, W. A. (1982) *Radiat Res* **89**, 99-112.
32. Tu, Y., Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996) *Embo J* **15**, 675-683.
33. McKay, B. C., Winrow, C. & Rainbow, A. J. (1997) *Photochem Photobiol* **66**, 659-664.
34. McKay, B. C., Francis, M. A. & Rainbow, A. J. (1997) *Carcinogenesis* **18**, 245-249.
35. Tyrrell, R. M. (1996) *Bioessays* **18**, 139-148.
36. Rosenstein, B.S. & Mitchell, D.L. (1989) *Photochem Photobiol* **45**, 775-780.
37. Wani, M. A., Zhu, Q. Z., El-Mahdy, M. & Wani, A. A. (1999) *Carcinogenesis* **20**, 765-772.
38. Garbe, J., Wong, M., Wigington, D., Yaswen, P. & Stampfer, M. R. (1999) *Oncogene* **18**, 2169-80.
39. Gross-Mesilaty, S., Reinstein, E., Bercovich, B., Tobias, K. E., Schwartz, A. L., Kahana, C. & Ciechanover, A. (1998) *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **95**, 8058-63.



40. Greider, C. W. (1999) *Trends Genet* **15**, 109-112.
41. McIntyre, M. C., Ruesch, M. N. & Laimins, L. A. (1996) *Virology* **215**, 73-82.
42. Jones, D. L. & Munger, K. (1997) *J Virol* **71**, 2905-2912.
43. Hu, T. S., Ferril, S. C., Snider, A. M. & Barbosa, M. S. (1995) *Int J Oncol* **6**, 167-174.
44. Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1998) *Nature* **391**, 597-601.
45. Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1999) *Embo J* **18**, 2449-2458.
46. Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S. & Stanley, M. (1991) *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **88**, 11217-11221.
47. Smerdon, M. J. & Conconi, A. (1999) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 227-55.
48. Bhat, U. G., Raychaudhuri, P. & Beck, W. T. (1999) *Proc Natl Acad Sci (U S A)* **96**, 7859-7864.
49. Wang, J. C. (1996) *Annu Rev Biochem* **65**, 635-692.
50. Dresler, S. L. & Robinson-Hill, R. M. (1987) *Carcinogenesis* **8**, 813-817.
51. Stevnsner, T. & Bohr, V. A. (1993) *Carcinogenesis* **14**, 1841-5180.
52. Nead, M. A., Baglia, L. A., Antinore, M. J., Ludlow, J. W. & McCance, D. J. (1998) *Embo J* **17**, 2342-2352.
53. Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. & Rahmsdorf, H. J. (1997) *J Photochem Photobiol B - Biology* **37**, 1-17.
54. Jones, D. L., Thompson, D. A. & Munger, K. (1997) *Virology* **239**, 97-107.
55. Jones, D. L., Thompson, D. A., Suh-Burgmann, E., Grace, M. & Munger, K. (1999) *Virology* **258**, 406-414.

56. Jian, Y., Schmidt-Grimminger, D. C., Chien, W. M., Wu, X., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1998) *Oncogene* **17**, 2027-2038.
57. Cooper, M. P., Balajee, A. S. & Bohr, V. A. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 2119-2129.
58. Massimi, P., Pim, D. & Banks, L. (1997) *J Gen Virol* **78**, 2607-2613.
59. Phillips, A. C. & Vousden, K. H. (1997) *J Gen Virol* **78**, 905-909.
60. zur Hausen, H. (1996) *Biochim Biophys Acta* **1288**, F55-78.
61. Shamanin, V., zur Hausen, H., Lavergne, D., Proby, C. M., Leigh, I. M., Neumann, C., Hamm, H., Goos, M., Haustein, U. F., Jung, E. G. & et al. (1996) *J Natl Cancer Inst* **88**, 802-811.

## 2.7 TABLE I

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

Fibroblast Type	Strand	Average 50% repair time (h)*	Fold-delay in repair	Number and location of sites analyzed
Normal Skin	TS	3 (1, 8)	1	16 (exon 1 <i>c-jun</i> ) ; 5 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	10 (4, 16)	1	10 (exon 5 <i>p53</i> )
LF041 Skin	TS	14 (4, 28)	6.1±2.8	16 (exon 1 <i>c-jun</i> ) ; 5 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	28 (16, 32)	3.1±1.1	10 (exon 5 <i>p53</i> )
LXSN-Lung	TS	3.5 (1, 8)	1	9 ( <i>c-jun</i> promoter) ; 4 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	6 (2, 16)	1	7 (exon 5 <i>p53</i> ) ; 9 (exon 8 <i>p53</i> )
E6-Lung	TS	12 (6, 24)	3.8±1.4	9 ( <i>c-jun</i> promoter) ; 4 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	18 (8, 24)	4.1±1.3	7 (exon 5 <i>p53</i> ) ; 9 (exon 8 <i>p53</i> )
E7-Lung	TS	4 (1, 8)	1.5±0.8	9 ( <i>c-jun</i> promoter) ; 4 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	16 (4, 32)	3.6±1.9	5 (exon 5 <i>p53</i> ) ; 5 (exon 8 <i>p53</i> )
E6E7-Lung	TS	13 (4, 28)	4.1±0.9	9 ( <i>c-jun</i> promoter) ; 4 (exon 7 <i>p53</i> )
	NTS	17 (6, 32)	4.1±1.3	5 (exon 5 <i>p53</i> ) ; 5 (exon 8 <i>p53</i> )

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

## 2.8 LÉGENDES

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

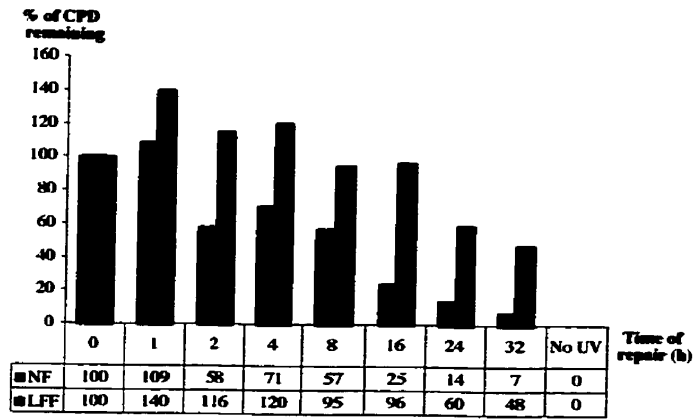
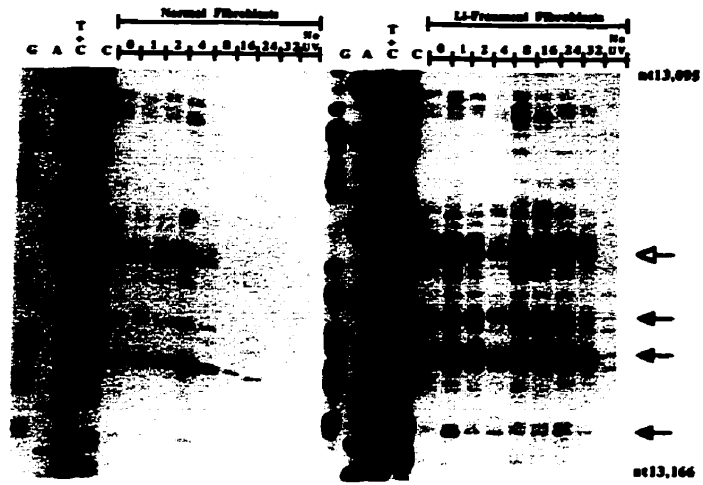
**Figure 2** Repair of UVB-induced CPD at individual nucleotide positions along the TS of the human *c-jun* protooncogene (exon 1 ; nucleotides +30 to +117). The lane designations, arrow indications, and the histogram below the autoradiograms are as for Fig. 1. The representative dipyrimidine site depicted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

**Figure 3** Repair of UVB-induced CPDs at nucleotide resolution along the NTS of the human *p53* gene (exon 8, nucleotides 14,510 to 14,575). The lane and arrow designations are as for Figs. 1 and 2, except note that the autoradiograms are presented in an inverse orientation. The accompanying histogram shows

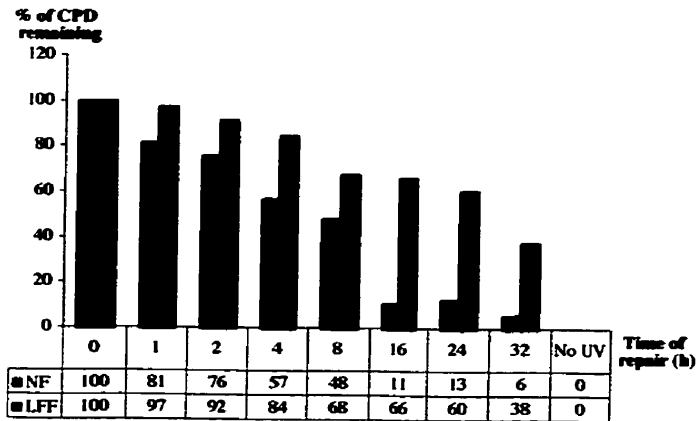
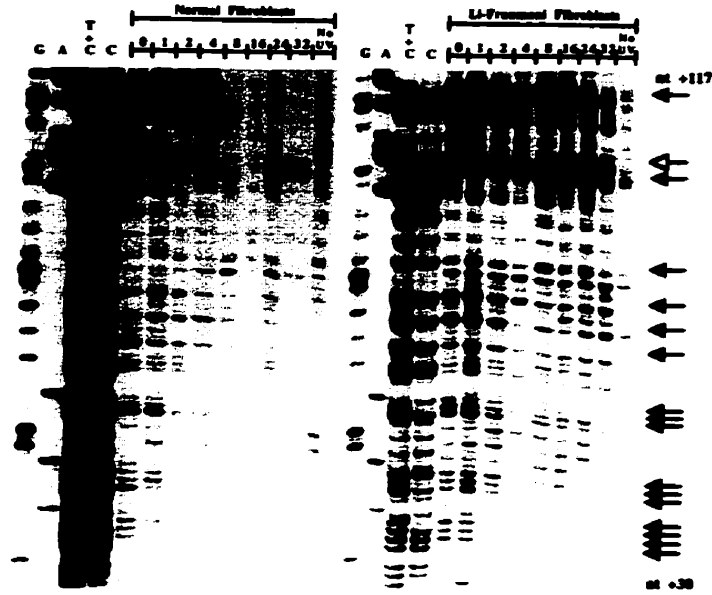
repair rates at one representative CC dipyrimidine site quantified by phosphorimager (5'-CACCCAC-3', codon 296-297) for each of LXS<sup>N</sup>-, HPVE6-, HPVE7-, and HPVE6/E7-expressing lung fibroblasts.

**Figure 4** Graphical representation of UVB-induced CPD-repair rates at a representative CC dipyrimidine site (5'-CCTCCG-3', exon 7, codon 248) on the TS of the human *p53* gene for LXS<sup>N</sup>-, HPVE6-, HPVE7-, and HPVE6/E7-expressing lung fibroblasts.

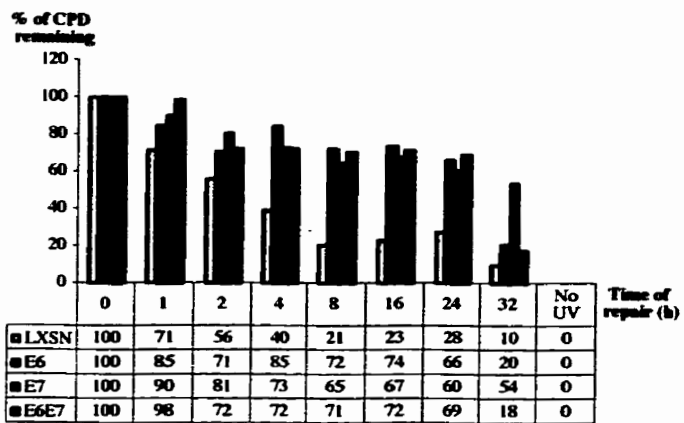
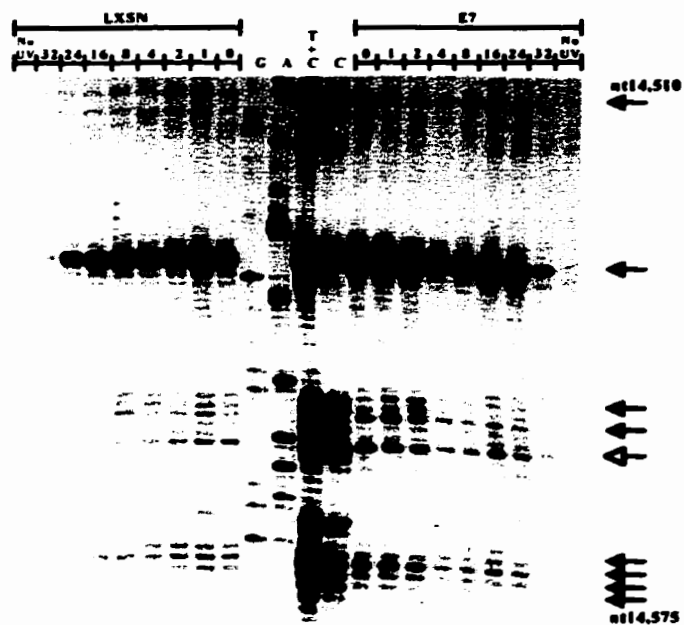
**2.9 FIGURE 1**



**2.10 FIGURE 2**

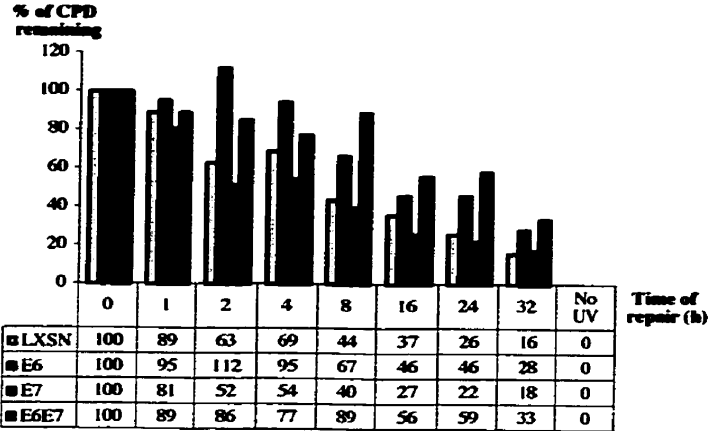


2.11 **FIGURE 3**





**2.12 FIGURE 4**



## **CHAPITRE V :**

# **ABLATION OF P21WAF1 ENHANCES THE CAPACITY OF P53-DEFICIENT HUMAN TUMOUR CELLS TO REPAIR UVB-INDUCED DNA DAMAGE**

*[Soumis à la revue Proceedings of the National Academy of Science in USA]*

## 1. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Les cellules humaines et de souris qui n'ont pas le gène suppresseur de tumeurs *p53* montre un retard important au niveau de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides [REN]. La REN est une voie essentielle dans la prévention du développement de tumeurs, elle permet d'éliminer les dommages à l'ADN induits par des agents génotoxiques comme les UV. De plus, *p53* est reconnue pour activer en *trans* certains gènes spécifiques, et elle est aussi impliquée dans plusieurs interactions protéine-protéine, pouvant être directement responsables du contrôle de la voie REN. Par exemple *p21waf1*, un effecteur en aval de *p53* qui est reconnu pour réguler l'arrêt du cycle cellulaire lors de dommages à l'ADN, et qui semble jouer un rôle dans la REN. Toutefois le rôle précis de *p21waf1* au niveau de la REN reste extrêmement controversé. À l'aide de la technique LMPCR, on montre ici que les cellules humaines d'adénocarcinomes de colon DLD-1 *p53*<sup>-/-</sup>*p21*<sup>+/+</sup> éliminent les dimères cyclobutyliques de pyrimidines induits par les rayons UV-B au niveau des brins transcrit et non-transcrit du proto-oncogène actif *c-jun* à une vitesse significativement plus lente que leurs homologues isogéniques DLD-1 *p53*<sup>-/-</sup>*p21*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sur le mode de régulation de la réparation de l'ADN par *p21waf1* sont cohérents avec l'augmentation de la survie clonogénique, et une réduction de l'apoptose, observées chez les cellules DLD-1 *p21*<sup>-/-</sup> vs *p21*<sup>+/+</sup> suite à une irradiation aux UV-B. Comme les cellules DLD-1 sont *p53*<sup>-/-</sup>, elles sont aussi déficientes pour induire *p21waf1* suite aux dommages à l'ADN, donc nos résultats montrent que le niveau basal de *p21waf1* peut inhiber la REN indépendamment de *p53* dans les cellules tumorales. Il est évident que l'élimination de la protéine *p21waf1* dans les cellules DLD-1 contribue largement à la restauration de la REN qui était originalement compromise, en

apparence via la perte des fonctions de la protéine p53, dans cette lignée cellulaire.

## 2. ARTICLE

# Ablation of p21waf1 Enhances the Capacity of p53-Deficient Human Tumour Cells to Repair UVB-Induced DNA Damage

Jean-Philippe Therrien\*, Martin Loignon †, Régen Drouin\*, and Elliot A. Drobetsky†

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

† Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada

Classification: Biological Sciences: Genetics

Manuscript Information : 18 text pages; 6 figures; 1 table.

Word and Character Counts: **abstract:** 249 words; 1795 characters with spaces; **complete manuscript** including figures, figure legends, and tables (see breakdown): 46,714 characters with spaces.

Abbreviations: NER, nucleotide excision repair; GNER, global nucleotide excision repair; TCNER, transcription-coupled nucleotide excision repair; TS, transcribed strand; NTS, nontranscribed strand; LMPCR, ligation-mediated polymerase chain reaction; CPD, 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: drobetse@ere.umontreal.ca

## 2.1 RÉSUMÉ

During periods of genotoxic stress, the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1 is transcriptionally upregulated by the p53 tumour suppressor, and subsequently plays an essential role in the initiation of cellular growth arrest. Investigations have indicated that p21waf1 also regulates nucleotide excision repair (NER), a critical pathway that removes carcinogenic DNA damage induced by UV light and other mutagens. However these investigations, largely employing cell-free systems or indirect measurements of NER capacity, have yielded highly conflicting results. No previous studies have directly assessed the role of p21waf1 in DNA repair in human cells *in vivo*. Here, we examined whether basal levels of endogenous p21waf1 expression can modulate NER in living cells following UV exposure. For this purpose, we employed the p21waf1<sup>+/+</sup> adenocarcinoma cell line DLD1, and its isogenic p21waf1-null counterpart. Since DLD1 bears inactivating mutations in both copies of p53, and is defective in p21waf1 induction following mutagen exposure, this strain has been considered functionally p21waf1 deficient in the cellular response to DNA damage. Nonetheless, using the highly sensitive ligation-mediated PCR, we demonstrate, at nucleotide resolution, that p21waf1<sup>+/+</sup> DLD1 removes UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers from the *c-jun* protooncogene at a significantly lower rate than the isogenic p21waf1-null derivative. The higher efficiency of DNA repair in UV-exposed p21waf1-null cells is accompanied by increased clonogenic survival and reduced levels of apoptosis relative to the p21waf1<sup>+/+</sup> counterpart. Our results show that ablation of basal p21waf1 expression can significantly enhance the capacity of p53-deficient human tumour cells to repair UV-induced DNA damage.

## **2.2 INTRODUCTION**

Nucleotide excision repair (NER) is a critical antineoplastic pathway that removes helix-distorting DNA lesions generated by diverse mutagenic agents. These include highly genotoxic UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPD), which play a major role in the molecular etiology of sunlight-associated skin cancer (1, 2). Humans afflicted with the autosomal recessive disease Xeroderma pigmentosum are defective in NER of UVB-induced CPD, and manifest extreme sensitivity to cutaneous tumourigenesis (3). The NER process is comprised, sequentially, of: (i) DNA damage recognition, followed by incision in a number of nucleotides on either side of the damaged base; (ii) excision of the damaged base as part of an oligonucleotide approximately 30 nucleotides in length; and, finally (iii) DNA resynthesis (gap-filling) and ligation, using normal DNA replication factors and the intact daughter strand as template. Two overlapping NER subpathways have been identified that essentially differ only in the initial (lesion-recognition) step, i.e., global NER (GNER) which removes DNA damage from transcriptionally inactive regions of the genome, and transcription-coupled NER (TCNER) which rapidly repairs DNA lesions located specifically on the transcribed strand of active genes (for a comprehensive review of human NER see (4)).

A series of investigations has directly demonstrated that the capacity of human cells to efficiently remove UV-induced CPD *via* NER requires the presence of a functional p53 tumor suppressor (5-9). While the underlying mechanism remains to be completely elucidated, p53 apparently stimulates CPD removal through transactivation of genes that encode proteins involved in the NER process (10-12). However p53 may also inhibit DNA repair either by

directly binding, or by upregulating proteins that directly bind, to essential NER proteins (13-15). Of major interest in this latter regard is the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1, which is transcriptionally upregulated by p53 following exposure to DNA damaging agents, and was initially shown to play a key role in the initiation of G1 arrest by preventing phosphorylation of retinoblastoma protein (16). However, p21waf1 has also been postulated to inhibit the gap-filling step of NER, as well as semiconservative DNA replication, by binding the DNA polymerase  $\delta/\epsilon$  auxiliary factor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (17, 18) that is required for each of these replicative processes (17, 18).

Early studies that specifically measured PCNA-dependent DNA repair synthesis in human cell-free extracts concluded that while p21waf1 has no effect on NER, it nonetheless significantly inhibits normal DNA replication (19, 20). Using a similar *in vitro* approach, but in strong contrast, it was subsequently shown that p21waf1 strongly interferes with NER gap-filling, as well as with semiconservative DNA replication (21). A more recent investigation confirmed an inhibitory role for p21waf1 in PCNA-dependent NER gap-filling *in vitro*, and at the same time demonstrated essentially the same effect *in vivo* by quantifying levels of unscheduled DNA synthesis in primary human cells following introduction (through permeabilization or electroporation) of purified p21waf1 and PCNA proteins (22). The overall issue has been further complicated by investigations in intact human tumor cells (utilizing indirect determinations of DNA repair capacity, i.e., host-cell reactivation of damaged reporter plasmids, and/or clonogenic survival assays), which suggest that p21waf1, when expressed at high levels, may actually stimulate rather than inhibit the removal of UV-induced genotoxic damage (23, 24). Finally, it was very recently shown that



p21waf1 does not appear to influence the repair of UV-induced CPD in murine embryonic fibroblasts (25).

The role of p21waf1 in DNA repair is thus highly controversial. No previous studies have directly assessed the role of endogenous p21waf1 in human DNA repair *in vivo*. We therefore employed the highly sensitive ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) to measure, at nucleotide resolution, the rate of removal of UVB-induced CPD from the transcriptionally active *c-jun* protooncogene in the well characterized p21waf1 +/+ human adenocarcinoma cell line DLD1, and in its isogenic counterpart carrying a homozygous knockout for p21waf1. Since DLD1 is devoid of functional p53, and unable to upregulate p21waf1 following mutagen exposure, this strain has been regarded as functionally p21waf1-deficient in the cellular response to genotoxic damage (24, 26, 27). Nonetheless, we were able to employ the p21waf1-null isogenic DLD1 derivative to show the unexpected result that basal levels of endogenous p21waf1 can significantly modulate the capacity of p53-deficient human tumor cells to repair UVB-induced genotoxic damage.

### **2.3 MATÉRIEL & MÉTHODES**

***Cell Strains and UV Irradiation Conditions*** The p53<sup>-/-</sup>-p21waf1<sup>+/+</sup> DLD-1 human colon carcinoma strain, and its isogenic p21waf1-null derivative (kindly provided by Dr. B. Vogelstein, Johns Hopkins University) were grown in MEM culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, plus antibiotics. For all experiments, cells were grown to approximately 50-70% confluency, and irradiated with UVB (290-320nm) at room temperature after replacing the medium with 0.9% NaCl. The UVB source consisted of two

fluorescent tubes (FS20T12/ UVB/BP, Phillips) delivering a dose rate of  $3.39 \text{ Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$  which was filtered through a sheet of cellulose acetate to eliminate wavelengths below 290nm (Kodacel TA-407 clear 0.015 inch; Eastman-Kodak Co.)

***Ligation-mediated polymerase chain reaction*** The LMPCR protocol has been described previously in detail (39). Briefly, cells growing on 150-mm petri dishes were irradiated with  $450 \text{ Jm}^{-2}$  of UVB and allowed to repair for various times in freshly prepared culture medium. After harvesting of cells, genomic DNA was immediately 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 *Escherichia 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* 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. The longer oligonucleotide of this same linker, 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  $^{32}\text{P}$ -labelled gene-specific probe, and visualized by autoradiography. Each experimental condition was assayed in duplicate. A screening sequencing gel was run using a portion of the DNA to ensure that there was no significant variation between samples. The two samples were then pooled on a combined gel, and the resulting autoradiogram analyzed using a Fuji BAS 1000 phosphorimager (Fuji Medical Systems, Stanford, CT). Each band represents a nucleotide position where a

break was induced by CPD cleavage, and the intensity of the band reflects the number of DNA molecules with ligatable ends terminating at that position. To assess proficiency in GNER and TCNER, relative repair rates for each strain (Table I) were determined along (i) the transcribed strand of the *c-jun* protooncogene between nucleotides +29 to +1857, and/or (ii) the nontranscribed strand of *c-jun* between nucleotides -145 to +1756. The LMPCR primer sets used for studying repair at the *c-jun* locus have been described previously (40).

***Clonogenic survival assay*** DLD-1 p21waf1+/+ and p21waf1-null cells, at 50-70% confluency on 60-mm dishes, were irradiated with various doses of UVB light. Cells were immediately trypsinized, counted with a hemocytometer, diluted appropriately, and seeded on 100-mm dishes. After 12 days, colonies were counted following staining with 50% v/v methanol containing 0.5% w/v methylene blue.

***Cellular Proliferation Assay*** Determination of cellular proliferation was achieved on UVB-exposed DLD1 cells at 50-70% confluency on 60-mm dishes by indirect BrdU immunofluorescence. Two hours preceding various times post-irradiation, 10  $\mu$ M of BrdU (Boehringer) was added to the culture media. Cells were washed with PBS/50 mM EDTA, collected in 1 ml of PBS/EDTA, and fixed by addition of 3 ml ice-cold 100% ethanol. Fixed cells were centrifuged and resuspended in 1mL of 2N HCl containing 0,5% Triton X-100 (v/v) and incubated at room temperature for 30 min followed by centrifugation. Cells were then resuspended in PBS plus 1% BSA (w/v) and 0,5% Tween 20 (v/v), and incubated at room temperature for 1h with 10 $\mu$ L of the monoclonal IgG<sub>1</sub> anti-BrdU antibody (Becton Dickinson). Cells were washed with PBS/BSA/Tween 20 and incubated with 10  $\mu$ L of FITC-labeled anti-mouse

antibody (Sigma) at room temperature for 30 min, centrifuged, and resuspended in PBS containing 5mg/mL of propidium iodide (PI; Molecular Probes). Bivariate analysis was performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

***Apoptosis Determination*** The early apoptotic fraction was determined by AnnexinV/PI labeling using a kit according to the manufacturer's specifications (R&D Systems). Briefly, cells on 60-mm dishes at 50-70% confluence were irradiated with 450Jm<sup>-2</sup> UVB, followed by collection of adherent and floating cells at various times post-treatment. Cells (25 X 10<sup>4</sup>/analysis) were incubated at room temperature for 15 min in 50µL of binding buffer containing AnnexinV/PI. Cells were then diluted with 150µl of binding buffer, and bivariate analysis performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

## **2.4 RÉSULTATS & DISCUSSION**

LMPCR is a highly sensitive genomic sequencing method that has been successfully adapted for measuring DNA repair rates *in vivo* at nucleotide resolution in chromosomal genes, following exposure to UV light and other DNA damaging agents (28). We therefore employed this technique to assess the influence of endogenous p21 protein on the removal of UVB-induced CPD in the absence of functional p53. The well characterized p21waf1+/+ human adenocarcinoma line DLD1 and its p21waf1-null counterpart were employed for this purpose. DLD1 bears inactivating mutations in both copies of the *p53* tumor suppressor gene, and is therefore considered defective in the upregulation of p21waf1 protein following exposure to DNA damaging agents. In agreement with previous studies (26, 27), Western blotting using the parental DLD1 strain

revealed low levels of p21waf1 expression (which was not be upregulated following treatment with 5 Gy of ionizing radiation), while no p21waf1 protein could be detected in the p21waf1-null derivative (data not shown). Furthermore, p21waf1-specific DNA sequences could be detected by PCR only in the p21+/+ derivative. Finally, although it has been reported that p21waf1 can, under certain circumstances, be induced by UV light independently of p53 (29-31), UVB-treated p21waf1+/+ DLD1 cells failed to manifest any p21waf1 protein accumulation up to 32 hr post-irradiation with 450 Jm<sup>-2</sup> of UVB, i.e., under the same irradiation and growth conditions used to measure DNA repair in the current investigation.

Figures 1 and 2 depict representative LMPCR autoradiograms that reflect the rate of CPD removal along portions of the transcribed strand (TS; nucleotides +318 to +392) and the nontranscribed strand (NTS; nucleotides +1788 to +1880) of the active *c-jun* protooncogene in p21waf1+/+ DLD1 and p21waf1-null DLD1 cells treated with 450Jm<sup>-2</sup> UVB. Repair rates for at least 30-40 dipyrimidine sites from each strand (chosen randomly from Figures 1 and 2, as well as from other autoradiograms not shown), spanning virtually the entire promoter and coding region of *c-jun* (nucleotides -145 to +1857), were quantified by phosphorimager. The average time required to achieve 50% repair at each individual site was extrapolated from the data. The results reveal a significant delay in CPD removal from both strands of *c-jun* in p21waf1+/+ DLD1 relative to the p21waf1-null counterpart, i.e., reductions of approximately 2.1- and 2.9-fold in the time needed to achieve 50% repair for the TS and NTS, respectively (Table I). As expected from previous DNA repair studies employing LMPCR in primary human fibroblasts (28), considerable site-to-site variation in repair capacity was observed in DLD1 tumor cells (Figure 3). Furthermore, while most individual sites along the NTS and TS of *c-jun* in the p21waf1+/+

strain were repaired significantly more slowly relative to the p21waf1-null counterpart, some sites manifested little, or essentially no difference. It is critical to emphasize that the divergence in NER rates observed here does not reflect any disparity in growth rates between the two DLD1 derivatives (i.e. resulting in possible dilution of the LMPCR signal due to newly-replicated DNA generated during post UV-incubation). Figure 4 depicts the quantification of cells exposed to  $450\text{Jm}^{-2}$  UVB, followed by double-staining with BrdU and propidium iodide, and analysis by flow cytometry. The fraction of BrdU positive cells actually decreased in both p21waf1-null and p21waf1+/+ strains during the time period and under the growth conditions that repair of CPD was monitored. In addition, virtually no difference was noted in the frequency distribution of S-phase cells in the two cell strains over time, suggesting that each manifests a similar pattern of UVB-induced growth arrest.

The above data show that basal levels of endogenous p21waf1 can inhibit the removal of UVB-induced CPD in p53-deficient human tumor cells. This had physiological consequences consistent with modulation of NER capacity, including a decrease in clonogenic survival for p21waf1+/+ cells relative to the p21waf1-null counterpart (Figure 5). The doses of UVB required to reduce relative survival to 10% (i.e., the  $D_{10}$  values extrapolated from Figure 5) for p21waf1+/+ and p21waf1-null cells were  $435\text{Jm}^{-2}$  and  $530\text{Jm}^{-2}$ , respectively. However, this decrease in clonogenic survival, while statistically significant, may be considered modest based on the observed disparity in DNA repair capacity. In this regard, it is critical to emphasize that in the current situation, CPD removal has been investigated specifically in p53-deficient cells, i.e., where apoptosis, and not DNA repair, is the primary determinant of clonogenic survival. Indeed, p53-deficient human and murine cells, although severely

compromised for NER capacity (as cited earlier), are actually highly resistant to UV-induced clonogenic death due to loss of p53-dependent apoptosis (9, 38). It follows that the decrease in DNA repair capacity of 2-3 fold observed here for p21waf1+/+ cells (while ostensibly having important implications for genomic stability) may not be sufficient to overwhelm the powerful resistance to clonogenic death conferred by loss of p53-dependent apoptosis.

In accord with a preeminent role for p53 in programmed cell death following exposure to DNA damaging agents, we have shown here that p53-/- p21waf1-null DLD1 cells appear highly resistant to UVB-induced apoptosis, with only 3% of the population staining positively for annexin V (indicating early apoptotic cell death) at either 24, 48, or 72 hr post irradiation (Figure 6). In contrast, the p21+/+ DLD1 derivative was significantly more sensitive to apoptosis following UV irradiation, with approximately 15% of the cell population staining positively for annexin V at each of the time points analyzed. We do not attribute this difference in apoptotic potential to any direct role for p21waf1 in programmed cell death. Indeed, despite our demonstration that basal p21waf1 expression can significantly influence DNA repair in p53-deficient DLD1 cells, this expression level may be insufficient to modulate any p21waf1-dependent apoptotic response. We therefore suggest that p21waf1+/+ DLD1 cells undergo apoptosis more readily than the p21waf1-null derivative following UVB exposure by virtue of their relative inability to efficiently remove CPD from the TS of active genes. Indeed, it has been proposed that blockage of transcription constitutes a primary signal to initiate cellular responses to DNA damage, including programmed cell death (32). In support of this notion, it was demonstrated that, after UV treatment, TCNER-deficient Cockayne's syndrome cells undergo apoptosis much more readily than either their DNA repair-

proficient counterparts, or than XP-C cells that are defective only in GNER (33, 34).

Notwithstanding the p53-independent inhibitory effect of p21waf1 on DNA repair rates revealed here, previous investigations have collectively demonstrated that p53 protein *per se* plays a critical role in NER. Indeed, as cited earlier, p53 induces various downstream effectors aside from p21waf1, and engages in multiple protein-protein interactions, that together would be expected to impact both GNER and TCNER. Although a series of studies has indicated that p53 regulates only GNER (7-9), we have recently provided evidence that p53-deficient human cells are significantly compromised for both NER subpathways (5). Specifically, using LMPCR, we demonstrated that p53-null/p21waf1+/+ Li-Fraumeni skin fibroblasts required approximately 14 and 28 hours to repair 50% of UVB-induced CPD along the TS vs. NTS strand of active genes, respectively, while these times for p53+/+p21waf1+/+ normal human fibroblasts were 3 and 10 hours. We show here, in general agreement with the situation for Li-Fraumeni fibroblasts, that p53-/-p21waf1+/+ DLD1 cells achieve 50% CPD removal after 12 and 23 hours for the TS and NTS strand of *c-jun*, respectively (Table 1). Remarkably, on the other hand, the isogenic p21waf1-null derivative exhibits average 50% repair times of 6 and 10 hours, which approximate those manifested by the p53+/+ skin fibroblasts used in the preceding study. These data, taken together, intriguingly indicate that ablation of basal p21waf1 expression can largely rescue, to near normal levels, the NER defect ostensibly conferred by p53-deficiency in human tumor cells.

The p21-mediated effect on DNA repair in DLD1 cells is apparently specific for NER, since, to our knowledge, there is no strong evidence that human cells utilize other pathways (e.g., photoreactivation, base excision repair,



or recombinational repair) that are employed by prokaryotic and other eukaryotic organisms for the repair of CPD. Furthermore, our results shed light on the actual mechanism whereby p21 inhibits NER in a p53-deficient background. Specifically, we emphasize that the LMPCR method employed here does not measure post-excision events including gap-filling, but rather only the preceding steps of NER, including lesion recognition/incision. This is in contrast to techniques used in previous investigations on the role of p21waf1 in human DNA repair, which specifically measured DNA resynthesis, either in cell free extracts (19-22), or, in the case of living cells, by quantifying levels of unscheduled DNA synthesis (22). In short, our results using LMPCR indicate that p21-mediated inhibition of DNA repair in p53-deficient human cells reflects PCNA-independent aspects of the NER process, i.e., at the level of DNA lesion recognition/incision, rather than of gap-filling. Significant inhibition of PCNA-dependent repair by p21waf1 may be more likely to occur in a p53-proficient background (i.e., where p21waf1 is strongly upregulated after DNA damage), since *in vitro* and *in vivo* studies have indicated that high molar p21waf1:PCNA ratios would be required to interfere with gap-filling (22).

The majority of human tumors *in vivo*, like the situation for cultured DLD1 cells, bear inactivating mutations in p53 (or otherwise express a nonfunctional p53 pathway), while still retaining a normal p21waf1 genotype (35-37). This situation can be readily explained on the presumption that cells lacking p53 are also functionally p21waf1-deficient, i.e., due to the inability of such cells to upregulate p21waf1 after DNA damage, thus precluding the necessity of generating p21waf1 mutations during tumor development. Our demonstration here that DNA repair is significantly more efficient in p53<sup>-/-</sup>-p21-null DLD1 cells, relative to their isogenic p21waf1<sup>+/+</sup> counterparts expressing

only basal levels of this protein, may provide an alternative explanation for the infrequent recovery of p21waf1 gene mutations in human cancers. Indeed, as cited earlier, cells lacking functional p53 (but retaining a normal p21waf1 genotype) are significantly compromised in the removal of CPD *via* NER. Furthermore, for example, p53 inactivation is an early initiating event in solar UVB-induced skin cell transformation, and subsequently plays a critical role in tumor promotion through dysregulation of p53-dependent apoptosis (38). The accompanying NER defect in p53-mutated skin cells presumably also contributes, in a highly significant manner, to the initiation and promotion of UVB-induced cutaneous tumors. Therefore, the acquisition of p21 mutations in precancerous skin cells that lack functional p53 may not favour tumour development, since, in light of our results, such mutations may effectively restore much of the DNA repair capacity previously lost in these cells through prior p53 inactivation.

## **2.5 REMERCIEMENTS**

This work was supported by grants (held separately by E.A.D. and R.D.) from the National Cancer Institute of Canada (with funds from the Canadian Cancer Society), and from the Medical Research Council of Canada. We are grateful to Mrs. Nathalie Bastien, Isabelle Paradis, and Anne Christine Goulet for valuable technical assistance, and to Dr. R. Stephen Lloyd for kindly supplying T4 endonuclease V. We are especially grateful to Dr. Gerd P. Pfeifer for his valuable criticisms.

## 2.6 RÉFÉRENCES

1. Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. & Ponten, J. (1991) *Proc Natl Acad Sci* **88**, 10124-10128.
2. Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E. & et al. (1993) *Proc Natl Acad Sci* **90**, 4216-4220.
3. Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. (1984) *Carcinogenesis* **5**, 511-514.
4. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. (1999) *Genes Dev* **13**, 768-785.
5. Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C. & Drobetsky, E. A. (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**, 15038-15043.
6. Zhu, Q., Wani, M. A., El-Mahdy, M. & Wani, A. A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 11492-11497.
7. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1997) *J Biol Chem* **272**, 28073-28080.
8. Ford, J. M., Baron, E. L. & Hanawalt, P. C. (1998) *Cancer Res* **58**, 599-603.
9. Ford, J. M. & Hanawalt, P. C. (1995) *Proc Natl Acad Sci* **92**, 8876-8880.
10. Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. & Chu, G. (1999) *Proc Natl Acad Sci* **96**, 424-428.
11. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. & Nakamura, Y. (2000) *Nature* **404**, 42-49.
12. Shivakumar, C. V., Brown, D. R., Deb, S. & Deb, S. P. (1995) *Mol Cell Biol* **15**, 6785-6793.

13. Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G. & et al. (1995) *Nature Genetics* **10**, 188-895.
14. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M. & Fornace, A. J., Jr. (1994) *Science* **266**, 1376-1380.
15. Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C. & Winchester, E. (1993) *Nature* **365**, 79-82.
16. Slebos, R. J., Lee, M. H., Plunkett, B. S., Kesis, T. D., Williams, B. O., Jacks, T., Hedrick, L., Kastan, M. B. & Cho, K. R. (1994) *Proc Natl Acad Sci* **91**, 5320-5324.
17. Shivji, K. K., Kenny, M. K. & Wood, R. D. (1992) *Cell* **69**, 367-374.
18. Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. (1994) *Nature* **369**, 574-8.
19. Shivji, M. K., Grey, S. J., Strausfeld, U. P., Wood, R. D. & Blow, J. J. (1994) *Current Biology* **4**, 1062-1068.
20. Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B. (1994) *Nature* **371**, 534-537.
21. Pan, Z. Q., Reardon, J. T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A. & Hurwitz, J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 22008-22016.
22. Cooper, M. P., Balajee, A. S. & Bohr, V. A. (1999) *Mol Biol Cell* **10**, 2119-29.
23. McDonald, E. R., 3rd, Wu, G. S., Waldman, T. & El-Deiry, W. S. (1996) *Cancer Res* **56**, 2250-2255.
24. Sheikh, M. S., Chen, Y. Q., Smith, M. L. & Fornace, A. J., Jr. (1997) *Oncogene* **14**, 1875-1882.

25. Smith, M. L., Ford, J. M., Hollander, M. C., Bortnick, R. A., Amundson, S. A., Seo, Y. R., Deng, C. X., Hanawalt, P. C. & Fornace, A. J., Jr. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 3705-3714.
26. Polyak, K., Waldman, T., He, T. C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1996) *Genes & Dev* **10**, 1945-1952.
27. Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1996) *Nature* **381**, 713-716.
28. Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1994) *Science* **263**, 1436-1438.
29. Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J. & Drobetsky, E. A. (1997) *Cancer Res* **57**, 3390-3394.
30. Liu, M., Wikonkal, N. M. & Brash, D. E. (1999) *J Invest Dermatol* **113**, 283-284.
31. Haapajarvi, T., Kivinen, L., Heiskanen, A., des Bordes, C., Datto, M. B., Wang, X. F. & Laiho, M. (1999) *Exp Cell Res* **248**, 272-279.
32. Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A. J. & McKay, B. C. (1999) *Oncogene* **18**, 583-92.
33. McKay, B. C., Ljungman, M. & Rainbow, A. J. (1998) *Oncogene* **17**, 545-555.
34. Ljungman, M. & Zhang, F. (1996) *Oncogene* **13**, 823-831.
35. Li, Y. J., Laurent-Puig, P., Salmon, R. J., Thomas, G. & Hamelin, R. (1995) *Oncogene* **10**, 599-601.
36. Shiohara, M., el-Deiry, W. S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D. L., Vogelstein, B. & Koeffler, H. P. (1994) *Blood* **84**, 3781-3784.
37. Watanabe, H., Fukuchi, K., Takagi, Y., Tomoyasu, S., Tsuruoka, N. & Gomi, K. (1995) *Biochim Biophys Acta* **1263**, 275-280.

38. Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S. & Leffell, D. J. (1996) *J Investig Dermatol Symp Proc* **1**, 136-142.
39. Tornaletti, S. & Pfeifer, G.P. (1996) in *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, ed. Pfeifer G.P., (Plenum, New York), pp. 199-209.
40. Tu, Y., Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996) *EMBO J* **15**, 675-683.

## 2.7 LÉGENDES

**Figure 1. Repair of UVB-induced CPD at nucleotide resolution along a portion of the transcribed strand of the human *c-jun* protooncogene.** Repair rates at individual sites (nucleotides +318 to +392) are depicted for p21waf1+/+ DLD1 cells (left side of the LMPCR autoradiogram) and p21waf1-null DLD1 derivative (right side). The four center lanes show LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. On either side of the sequencing ladder are eight lanes showing LMPCR of DNA isolated from UVB-irradiated cells which have undergone repair for the indicated times. Note that visualization of CPDs remaining after 24hr in p21-null cells in this particular representative gel was precluded by a DNA sample loading error. The far right and far left lanes show LMPCR of unirradiated DNA followed by T4 endonuclease V / photolyase digestion. The arrows indicate dipyrimidine sites quantified using a Fuji BAS 1000 Phosphorimager, equipped with the Image Gauge V3.0 program.

**Figure 2. Repair of UVB-induced CPD at individual nucleotide positions along the nontranscribed strand of *c-jun*.** Repair rates at individual sites between nucleotides +1,788 - +1,880 are depicted for each DLD1 derivative. The lane designations and arrow indications are as for Figure 1.

**Figure 3. Summary of DNA repair rates at individual nucleotide positions along the *c-jun* protooncogene (nucleotides -145 to +1857).** The times needed to achieve 50% removal of CPD along both strands of *c-jun* in each DLD1 derivative were extrapolated for each dipyrimidine site (underlined) along the

sequence. A front slash indicates a break in the sequence. °, p21waf1-null DLD1; •, p21waf1+/+ DLD1.

**Figure 4. Determination of Cellular Proliferation in UVB-irradiated p21waf1+/+ vs p21waf1-null DLD1 Cells.** p21waf1+/+ and p21waf1-null cells were plated to attain 50-70% confluence at the time of irradiation. Both strains were irradiated with 450 Jm<sup>-2</sup> of UVB, incubated for different times, and labeled with BrdU for 2h preceding each time point. Incorporated BrdU was detected by flow cytometry using indirect immunofluorescence. A) Dot plots of p21+/+ vs. - null cells double-labeled with BrdU and PI . B) Graphical representation of UVB-exposed BrdU positive cells over time.

**Figure 5. UVB-induced Cytotoxicity DLD1 p21waf1+/+ vs p21waf1-null DLD1 Cells.** The relative survival after treatment with various doses of UVB was calculated as the mean number of surviving colonies for irradiated cells relative to mock-irradiated controls. Each time point represents the average of at least 3 independent experiments.

**Figure 6. Apoptosis in UVB-irradiated p21waf1+/+ vs p21waf1-null DLD1 Cells.** Subconfluent cells were irradiated with 450 Jm<sup>-2</sup> UVB and double-labeled with Annexin V and PI at the indicated times. A) AnnexinV/PI profiles of p21+/+ and p21-null cells at 0 and 24h post- UVB irradiation. Annexin V positive cells (i.e., undergoing early apoptotic cell death) are gated in the lower right quadrant of the dot plots. B) Graphical representation of Annexin V positive cells at 0, 24, 48, and 72h.

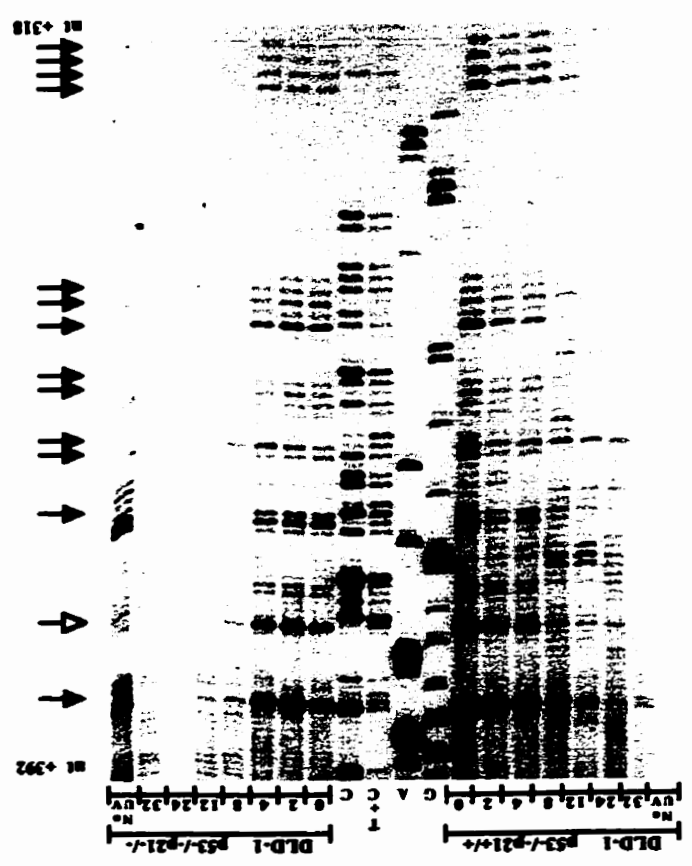
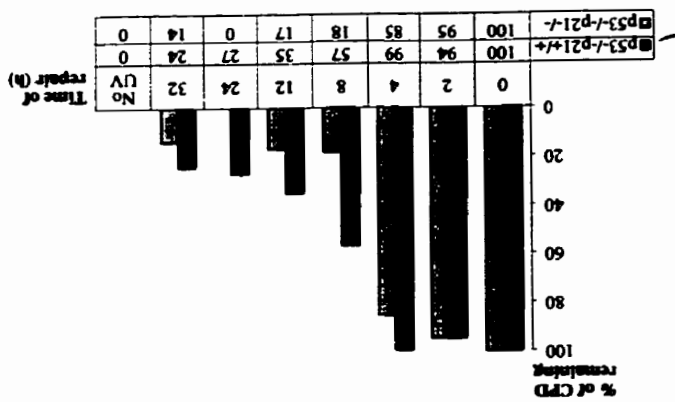


## 2.8 TABLE I

**TABLE 1** : Relative delay in CPD removal for p53-deficient DLD-1 colon carcinoma cell lines differing in p21 status.

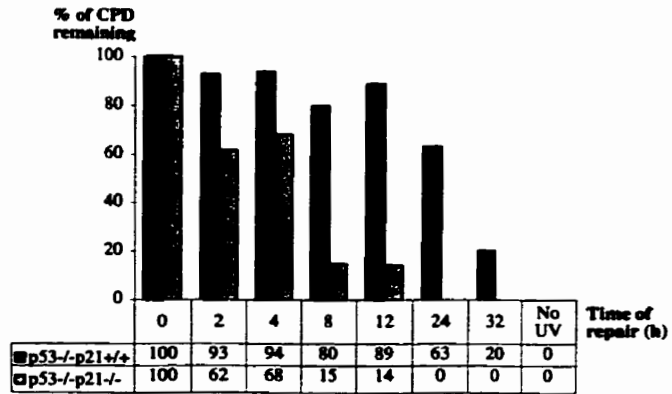
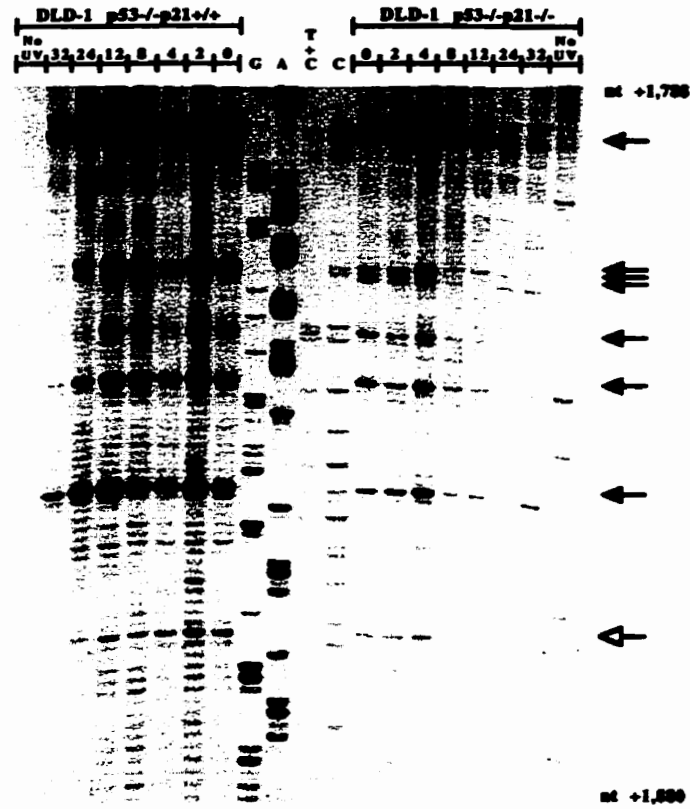
Fibroblast Type	Strand	Average 50% repair time (h)*	Fold-delay in repair	number and location of sites analyzed
p53 <sup>-/-</sup> p21 <sup>+/+</sup>	TS	11.6 (4, 28)	2.1±1.1	40 (nt +29 to +1857)
	NTS	23.1 (8, 32)	2.9±1.7	30 (nt -145 to +1756)
p53 <sup>-/-</sup> p21 <sup>-/-</sup>	TS	5.6 (2, 12)	1	40 (nt +29 to +1857)
	NTS	9.8 (3, 24)	1	30 (nt -145 to +1756)

\* Each value reflects the average time required to achieve 50% repair, and was extrapolated from repair rate determinations for at least 30 different dipyrimidine sites pooled from different gels. For example (as indicated by the first entry in the column at the far right), the average 50% repair time for the TS strand of DLD-1 p53<sup>-/-</sup>p21<sup>+/+</sup> was calculated by pooling repair rate calculations from 40 sites along the *c-jun* protooncogene between nucleotide +29 to +1857. The bracketed values represent the slowest and fastest 50% repair times, in order to indicate the site to site variation in repair rates.



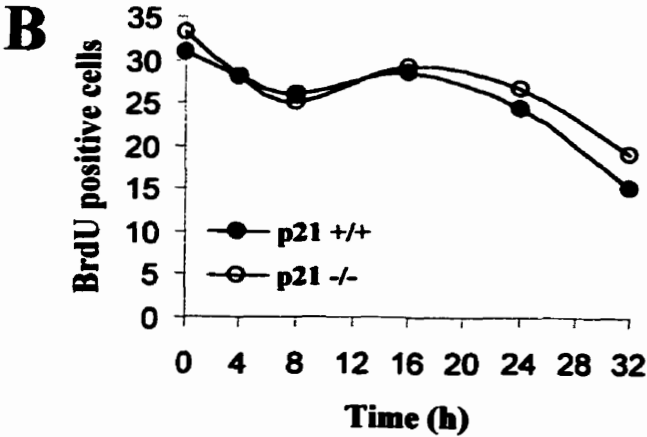
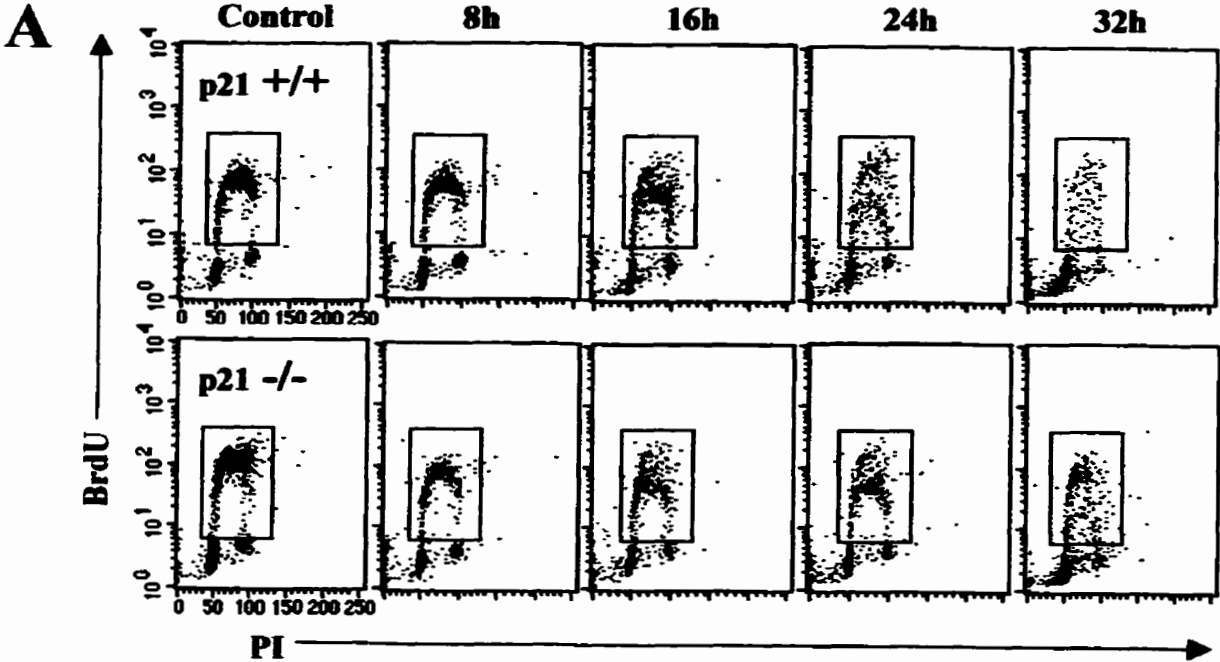
2.9 FIGURE 1

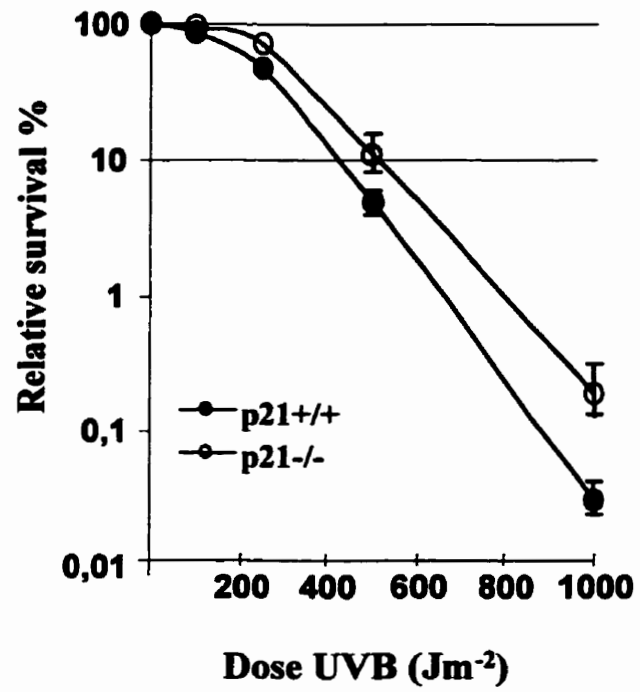
2.10 **FIGURE 2**

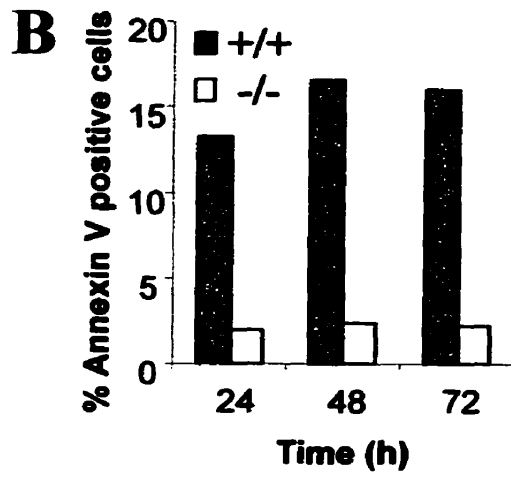
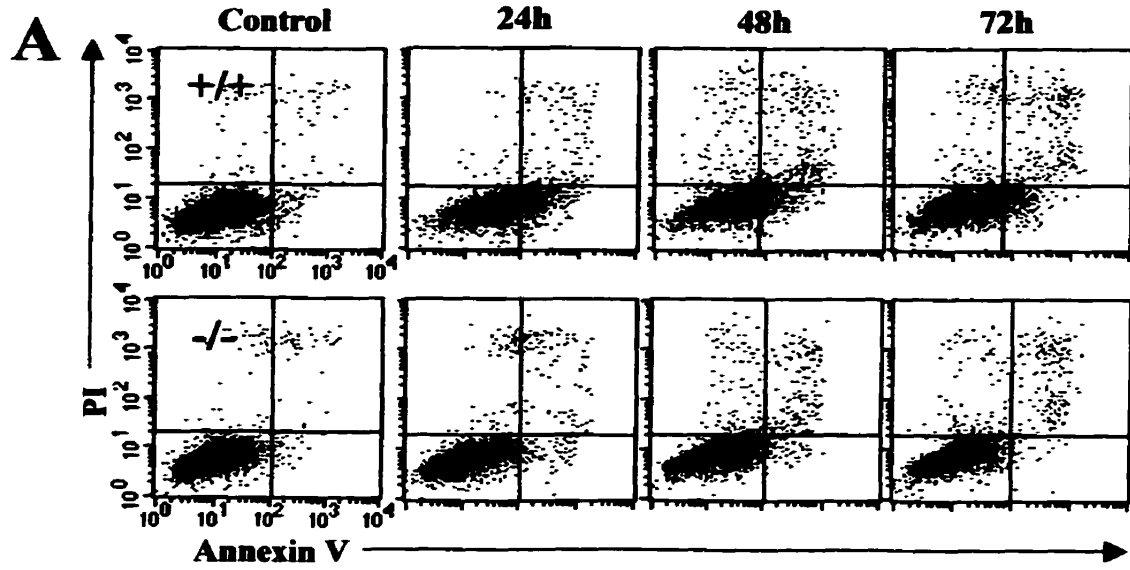




2.12 **FIGURE 4**



**2.13 FIGURE 5**

2.14 **FIGURE 6**

**CHAPITRE VI :**  
**DISCUSSION ET**  
**CONCLUSION GÉNÉRALE**



## **DISCUSSION SUR LE CHAPITRE II**

La cartographie des DCP au niveau de chaque site dipyrimidinique des exons 5 à 8 du gène *p53* par la technique LMPCR a montré que la distribution des DCP est fortement influencée par la séquence nucléotidique et la  $\lambda$  des UV. Ces résultats ont permis de répondre à notre premier objectif. Nous avons observé que la fréquence des DCP formés est particulièrement élevée au niveau des 8 sites ["hotspots"] du gène *p53* les plus fréquemment mutés dans les cancers de peau non-mélanocytiques. Ces sites correspondent aux codons 151, 177, 196, 245, 248, 278, 286 et 294. Il a été montré précédemment que tous ces sites sont réparés lentement à l'exception du codon 151 et que seulement quatre de ces sites, les codons 151, 278, 286 et 294, sont fréquemment endommagés par les UV-C (Tomaletti et al., 1993 ; Tomaletti et Pfeifer, 1994). Ces résultats ne correspondaient pas aux principes de la théorie des mutations somatiques. Maintenant en combinant les résultats obtenus précédemment sur la vitesse de réparation et nos résultats obtenus avec les UV-B sur la fréquence des DCP, la théorie de la mutagenèse somatique peut s'appliquer. Cette théorie veut que la probabilité qu'une mutation survienne à un site spécifique est fonction de la fréquence du dommage formé à ce site, de la vitesse avec laquelle il est réparé et de la mutagénicité du dommage. Le DCP est un dommage très mutagénique, au niveau des 8 "hotspots" du gène *p53* il est formé à une fréquence très élevée par les rayons UV-B et il est lentement réparé, donc la probabilité qu'une mutation survienne à un de ces sites est très élevée. Ce sont les rayons UV-B qui génèrent les DCP au niveau de l'ADN contenu dans les cellules de la peau humaine, car les UV-C sont absorbés par la couche d'ozone. Ces résultats montrent un lien étiologique moléculaire possible entre la composante UV-B du soleil, les DCP et

les mutations retrouvés au niveau du gène *p53* dans les cancers de peau non-mélanocytiques.

Cette étude a permis d'observer d'autres phénomènes importants. Les deux brins d'ADN des exons 5 à 8 du gène *p53* englobent un total de 21 sites dipyrimidiniques contenant une cytosine méthylée en position 5 [5<sup>m</sup>C]. Ces 21 sites sont soit un C<sup>m</sup>CG ou un T<sup>m</sup>CG, ce type de séquence permet la formation des DCP. Nous avons observé que la fréquence des DCP formés à ces sites était jusqu'à neuf fois plus importante après une irradiation aux UV-B comparativement à une irradiation aux UV-C. De plus, après irradiation aux UV-B, la fréquence des DCP formés au niveau des sites dipyrimidiniques méthylés est plus importante que la fréquence observée au niveau des autres sites dipyrimidiniques non-méthylés. Ces résultats montrent que la distribution des DCP varie non seulement avec la longueur d'onde utilisée mais aussi selon la séquence nucléotidique [cytosine méthylée vs non-méthylée].

Lors de la comparaison de la distribution des DCP au niveau de l'ADN isolé [*in vitro*] et de cellules [*in vivo*], nous avons observé des différences importantes entre la fréquence d'un DCP pour un même site *in vitro* vs *in vivo*. Ces différences sont appelées "photofootprint" et ils sont observés lorsque pour un même site dipyrimidinique la fréquence des DCP formés *in vitro* est supérieure ou inférieure à la fréquence observée *in vivo*. Si la fréquence des DCP formés *in vivo* est inférieure à la fréquence *in vitro*, c'est un "photofootprint" négatif. À l'inverse, si la fréquence des DCP formés *in vivo* est supérieure à la fréquence *in vitro*, c'est un "photofootprint" positif. Ces différences observées entre la distribution des DCP *in vitro* vs *in vivo* sont attribuables à la structure de la chromatine et à la présence de protéines sur l'ADN. Lors de cette étude nous

avons observé la présence de "photofootprints" au niveau des exons 5 et 6 du gène *p53*. Ces "photofootprints" correspondent possiblement à la présence de nucléosomes au niveau de ces deux exons. Nous avons exclu que les "photofootprints" aient pu être attribués à la présence de protéines, par analyse de la distribution *in vitro* et *in vivo* des dommages induits par le DMS. La distribution des dommages induits par le DMS n'est pas affectée par la présence de nucléosomes, mais elle est affectée par la présence de protéines liées à l'ADN. L'absence de différences entre la distribution des dommages induits *in vitro* et *in vivo* par le DMS nous permet de conclure qu'il n'y a pas de protéines liées à l'ADN dans cette région du gène *p53*. De plus, les analyses *in vivo* de "footprint" avec la nucléase de *Micrococcus* et la DNaseI n'ont pas montré d'interactions protéine-ADN au niveau de exon 5 et 6 : du gène *p53* (Tornaletti et al., 1996). Ceci suggère que les "photofootprints" observés sont attribuables à la présence de nucléosomes. Comme il a déjà été montré, on observe une périodicité d'environ 10 à 12 pb au niveau des "photofootprints". En conclusion, nos résultats montrent clairement que la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN est dépendante de la  $\lambda$  utilisée, de la séquence nucléotidique et de la structure de la chromatine.

Les perspectives futures de ce projet sont nombreuses, mais le lien moléculaire montré ici entre les rayons UV-B du soleil, les DCP formés au niveau de l'ADN et les mutations dans le gène *p53* retrouvés dans les cancers de peau non-mélanocytiques peut s'appliquer à d'autres types de cancers. Par exemple, il a été montré que le gène *BNCC* humain, analogue du gène *patched* chez la drosophile, est fréquemment muté dans les cancers de peau du type basocellulaire, les CBC (Gailani et al., 1996). L'étude de la distribution et de la réparation des DCP ou autres dommages, par exemple les DPO, formés au

niveau du gène *BNCC* combiné au spectre de mutations observé dans les tumeurs CBC permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés au développement des CBC.

### **DISCUSSIONS SUR LE CHAPITRE III**

Afin d'étudier la fréquence globale et la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN dans un contexte qui se rapproche le plus possible de la réalité et de confirmer les résultats précédemment obtenus avec des cellules cultivées en monocouche et irradiées aux UV-B, nous avons utilisé de la peau humaine reconstruite en laboratoire par ingénierie tissulaire [PHIT] irradiée à l'aide d'un simulateur solaire. Le simulateur solaire reproduit avec fidélité le spectre solaire auquel les humains sont exposés. Après irradiation aux UV-B et à la LSS, nous avons observé que la fréquence globale des DCP formés au niveau de l'ADN dans les cultures cellulaires en monocouche [fibroblastes et kératinocytes] est identique à celle observée dans les cellules de la PHIT. Ce qui n'est pas vrai pour les UV-C, on observe une différence majeure entre la fréquence globale des DCP formés au niveau de l'ADN dans les cultures cellulaires en monocouche comparativement à celle observée dans les cellules de la PHIT. Ces résultats signifient que la couche cornée [stratum corneum] ainsi que les cellules de l'épiderme supérieur bloquent une portion importante des rayons UV-C. Mais, par contre l'organisation en multicouche de la peau n'a peu ou aucun effet de protection contre les rayons UV-B ou ceux de la LSS. Il est important de mentionner que les doses de rayons UV utilisés pour cette étude sont très élevées. Rendant ainsi négligeable l'effet de protection des cellules de l'épiderme supérieur pour les cellules de la couche basale. Il est toutefois possible d'accumuler ces doses lors d'une surexposition solaire. La fréquence

globale a été déterminée après conversion des DCP en cassures monocaténaïres par la T4 endonucléase V et à l'aide d'un gel d'électrophorèse alcalin (Drouin et al., 1996). L'étude, à l'aide la technique LMPCR, de la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN dans les cultures cellulaires en monocouche est identique à celle observée dans les cellules de la PHIT après irradiation aux UV-B ou à la LSS. Il n'y a pas non plus de différences observables entre la distribution des DCP formés au niveau de l'ADN après irradiation aux UV-B comparativement à la LSS, et que ce soit dans les cellules en monocouche ou dans la PHIT. Ces résultats montrent l'importance de bien se protéger lors d'une exposition solaire. Soit par l'utilisation d'écrans solaires ou de vêtements qui protègent contre les rayons solaires [ex : chapeau, T-shirt, casquette, etc.]. Car, contrairement à la croyance populaire, la couche cornée de la peau ne semble pas protéger nos cellules cutanées contre la formation de DCP par les rayons UV-B du soleil.

L'utilisation de la PHIT offre la possibilité de faire plusieurs autres types d'expériences qui impliquent l'étude des dommages générés à l'ADN. En effet, d'un point vue éthique, il est préférable d'utiliser la PHIT plutôt que des prélèvements cutanés de volontaires humains pour les différentes études, quelles soient biochimiques ou moléculaires. Comme par exemple, lors d'études portant sur l'efficacité des écrans solaires. Il peut même être envisageable de produire de la PHIT avec des mélanocytes particuliers à chaque type de peau pour étudier l'efficacité protectrice du type de mélanine [eumélanine ou pheomélanine] contre les rayons solaires.

## DISCUSSIONS SUR LE CHAPITRE IV

L'étude du rôle des protéines p53 et pRb au niveau du contrôle de la vitesse de réparation des DCP par excision de nucléotides a montré que ces deux protéines participent à la régulation de la voie REN. Les résultats obtenus en comparant la vitesse à laquelle les DCP sont réparés dans les cellules p53+/+ et dans les cellules p53-/-, ont montré que la protéine p53 joue un rôle critique au niveau de la vitesse de réparation des DCP par la voie REN. Ce rôle implique les deux voies de la REN, soit la TCREN et la GREN. Il avait été précédemment montré par Ford et Hanawalt que la protéine p53 jouait un rôle dans la GREN uniquement. La contradiction apparente entre nos résultats et ceux de Ford et Hanawalt peut s'expliquer par les différences suivantes : 1) les gènes étudiés, *p53* et *c-jun* vs *DHFR*, 2) le type de rayons UV utilisé, UV-B vs UV-C, 3) la dose de rayons UV utilisée, 1 kJ/m<sup>2</sup> d'UV-B vs 10 J/m<sup>2</sup> d'UV-C, et 4) la méthodologie utilisée, la technique LMPCR vs la méthode de Bohr. Nous pensons que la différence des résultats est attribuable en majeure partie à la méthode utilisée. La technique LMPCR permet l'étude de la vitesse de réparation au niveau de chaque nucléotide spécifiquement pour chaque brin [transcrit ou non-transcrit]. Quant à la méthode de Bohr, elle permet l'étude de la vitesse de réparation au niveau d'un fragment d'ADN spécifiquement pour chaque brin, impliquant donc une moyenne de plusieurs sites. Comme la vitesse de réparation varie d'un site à un autre, comme montré dans le chapitre IV, il faut étudier chaque site indépendamment des autres. Donc, la méthode de choix pour étudier la vitesse de réparation de dommages à l'ADN est la technique LMPCR. De plus, nos résultats sont en accord avec les expériences qui montrent que la protéine p53 interagit avec l'ARN pol II et la protéine CSB (McKay et al., 1999), deux protéines importantes de la voie TCREN. La protéine p53 interagit aussi avec le

complexe TFIID (McKay et al., 1999 ; Wang et al., 1995), une interaction commune aux deux voies de la REN, soit la TCREN et la GREN.

Les résultats obtenus en comparant les cellules qui ont un pRb actif vs inactif ont montré que pRb jouerait un rôle dans la voie GREN. On parle ici d'un rôle possible car l'inactivation de pRb a été faite via la protéine E7 du virus humain du papillome [HPV]. Cette protéine inactive aussi d'autres membres de la famille pRb, soit p107 et p130. Le mécanisme hypothétique par lequel pRb pourrait contrôler la GREN et non la TCREN, implique une interaction avec la protéine XPC qui formerait le complexe de reconnaissance du dommage. Il faut se rappeler que la protéine XPC est spécifique à la voie GREN [voir Figure 4 de la section "Introduction Générale"].

Il serait souhaitable de poursuivre les études dans des cellules humaines dont le gène pRb serait délété ou la protéine serait absente, afin de confirmer que pRb joue bel et bien un rôle dans la GREN. Ceci pourrait être fait dans une lignée cellulaire stable où il n'y aurait que le gène pRb qui serait délété par une technique de biologie moléculaire appelée "promotorless gene targeting". L'autre possibilité est d'utiliser des ARN anti-sens afin d'inhiber l'expression de la protéine pRb dans les cellules. Par la suite, ces cellules pourraient être soumises aux mêmes analyses que celle exécutées dans le chapitre V.

## **DISCUSSIONS SUR LE CHAPITRE V**

Dans ce chapitre, nous avons montré que le niveau basal de la protéine p21waf1 peut inhiber la REN lorsque la protéine p53 est absente. À l'aide de la technique LMPCR, nous montrons que les cellules déficientes en p53 [les

cellules DLD-1 provenant d'un adénocarcinome du colon humain] sont beaucoup plus lentes pour réparer les DCP par la voie REN au même titre que les cellules Li-Fraumeni [cellules déficientes en p53, voir chapitre V]. Le temps moyen requis pour atteindre 50% de la réparation des DCP par les cellules DLD-1 p21+/+ est respectivement de 12 et 23 heures pour les brins transcrit et non-transcrit. Ce qui ressemble au temps moyen requis par les cellules Li-Fraumeni [déficientes en p53 mais p21+/+] qui sont respectivement de 14 et 28 heures pour les brins transcrit et non-transcrit. Donc, les cellules déficientes pour la protéine p53 et qui expriment la protéine p21waf1 sont inefficace à réparer rapidement les DCP formés au niveau de l'ADN. De façon surprenante et inattendue, les cellules DLD-1 p53-/- et p21 -/- réparent les DCP plus rapidement que les cellules DLD-1 p53-/- et p21+/+. La vitesse à laquelle les cellules DLD-1 p21-/- réparent les DCP se rapproche de celle observée dans les cellules humaines normales [fibroblastes normaux, voir chapitre V]. Le temps moyen requis pour les cellules DLD-1 p21-/- pour atteindre 50% de la réparation des DCP est de 6 et 10 heures et il est respectivement de 3 et 10 heures pour les fibroblastes normaux au niveau des brins transcrit et non-transcrit. Ce qui signifie que la perte de p21waf1 dans les cellules déjà déficientes en p53 rétablit la réparation de l'ADN à la normale, diminuant ainsi l'instabilité génétique dans ces cellules, ce qui est désavantageux pour la progression tumorale. C'est ce qui peut expliquer pourquoi dans les tumeurs où p53 est muté p21waf1cip ne l'est pas. Nos résultats obtenus dans les études de réparation avec les cellules DLD-1 sont en accord avec ceux concernant la survie clonogénique et l'apoptose.

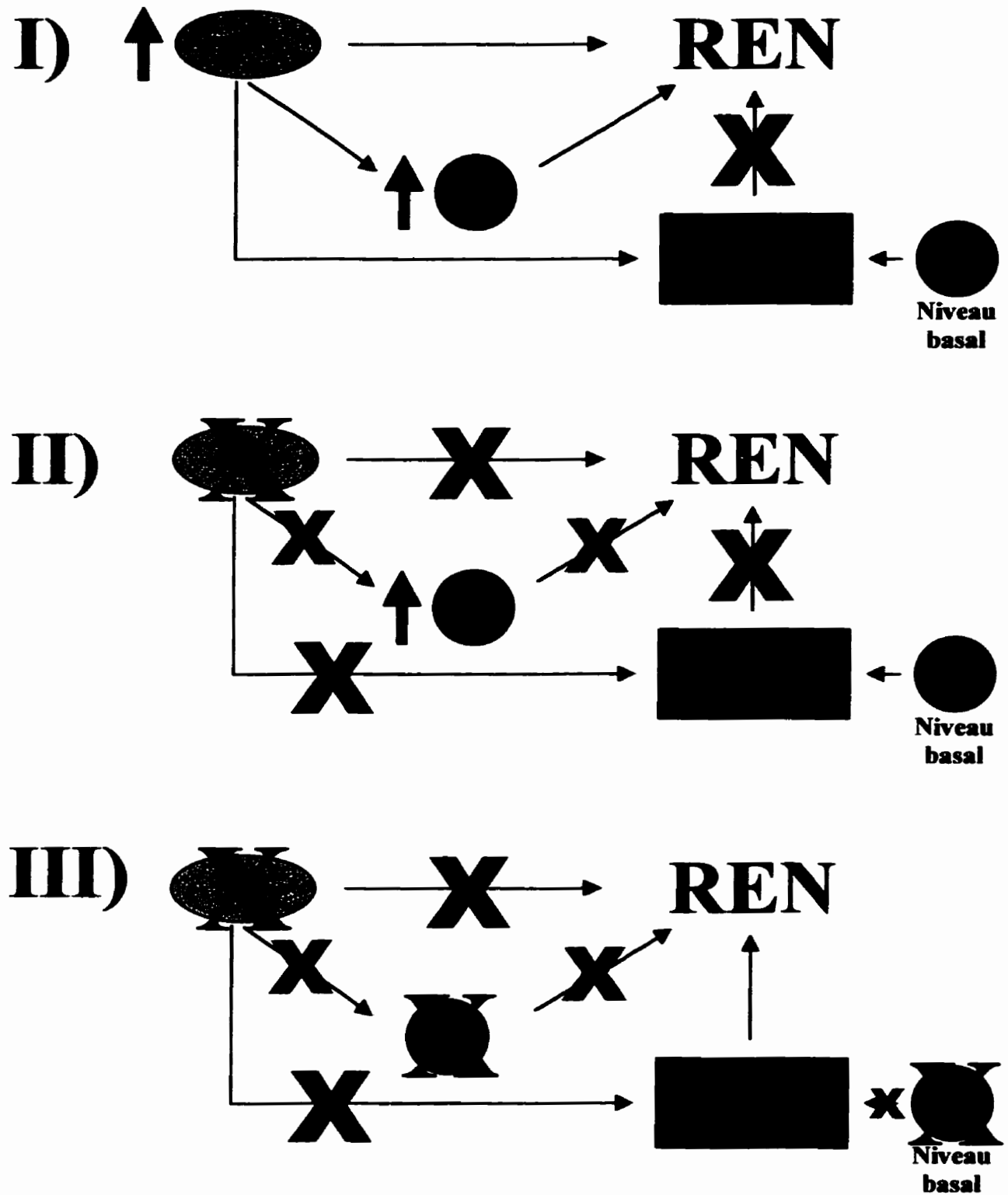


## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les différentes études incluses dans cette thèse permettent maintenant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de tumeurs cutanées. Notre travail montre de façon convaincante que les rayons UV-B du soleil sont responsables des DCP formés au niveau de l'ADN des cellules basales. Les kératinocytes sont des cellules qui composent la couche basale et ce sont eux qui sont à l'origine des cancers de peau non-mélanocytiques. La fréquence et la distribution des DCP formés au niveau de ces kératinocytes ne sont nullement affectées par l'organisation en multicouche de la peau. La persistance des DCP au niveau de l'ADN est responsable de l'apparition des mutations dans le gène *p53* qui est muté dans plus de 90% des cancers de peau non-mélanocytiques. Le fait de perdre la fonction du gène *p53* via les mutations entraîne une incapacité à réparer les DCP de façon efficace. Donc, il y a augmentation de l'instabilité génétique dans les cellules qui ont perdu la fonction du gène *p53*. L'instabilité génétique est associée avec la progression des cellules tumorales. Les résultats que nous présentons permettent maintenant de mieux répondre aux principes de la théorie des mutations somatiques dans le cas des cancers de peau non-mélanocytiques.

De plus, nos études concernant le rôle des protéines *p53* et *p21waf1* au niveau de la régulation de la voie REN semblent montrer qu'il pourrait exister une autre voie d'activation de la REN qui serait active seulement lorsque ces deux protéines sont absentes. La figure 7 illustre le modèle hypothétique du mode de régulation de la voie REN par les protéines *p53* et *p21waf1* que nous proposons. En D), lorsque les deux protéines sont présentes dans la cellule, la voie REN peut être activée directement par l'accumulation intracellulaire de la

protéine p53 et/ou par l'accumulation de la protéine p21waf1 provoquée par la protéine p53. On pense aussi que p53 pourrait avoir aussi une voie de régulation négative dans la REN en interagissant avec certains facteurs non-identifiés [Facteurs X] pour empêcher l'activation de la REN. Cette hypothèse découle d'expériences qui n'ont pas été présentées dans cette thèse où l'on observe un léger ralentissement de la vitesse de réparation par la voie REN dans les cellules déficientes pour la protéine p21waf1, mais où la protéine p53 est présente. Probablement que dans ces cellules, l'activation de la voie REN se fait uniquement par l'action directe de la protéine p53, c'est ce qui pourrait expliquer le léger ralentissement. En II), si on enlève le gène *p53* uniquement, nos résultats montrent que la voie REN est sérieusement compromise ou retardée. La perte de la protéine p53 a pour effet d'inhiber toutes les voies d'activation de la voie REN. En III), nos résultats montrent que la perte des deux protéines p53 et p21waf1 dans les cellules a pour effet de rétablir l'efficacité de la voie REN au niveau normal, ce qui nous laisse croire qu'il existe probablement une voie alternative d'activation de la REN. Cette voie serait inhibée lorsqu'il y a présence des protéines p53 et/ou p21waf1cip. Il semble que le niveau basal de la protéine p21waf1 est suffisant pour inhiber cette voie. Cette voie alternative d'activation de la voie REN que nous proposons est purement hypothétique et elle devra d'être étudiée plus en détails afin de bien comprendre le ou les modes de régulation de la voie REN.



**Figure 7.** Modèle hypothétique du mode de régulation de la voie REN par les protéines p53 et p21waf1/cip1.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M.K. Shivji, J.A. Vilpo, V. Moncollin, V.N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J.M. Egly, and R.D. Wood. 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**: 859-868.
- Asahina, H., I. Kuraoka, M. Shirakawa, E.H. Morita, N. Miura, I. Miyamoto, E. Ohtsuka, Y. Okada, and K. Tanaka. 1994. The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutat Res* **315**: 229-237.
- Bertrand, P., D. Rouillard, A. Boulet, C. Levalois, T. Soussi, and B.S. Lopez. 1997. Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* **14**: 1117-22.
- Bohr, V.A., C.A. Smith, D.S. Okumoto, and P.C. Hanawalt. 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**: 359-369.
- 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.
- Brown, D.W., L.J. Libertini, C. Suquet, E.W. Small, and M.J. Smerdon. 1993. Unfolding of nucleosome cores dramatically changes the distribution of ultraviolet photoproducts in DNA. *Biochemistry* **32**: 10527-10531.
- Cadet, J. and P. Vigny. 1990. The photochemistry of nucleic acids. In *Bioorganic Photochemistry, Photochemistry and the Nucleic Acids* (ed. H. Morrison), pp. 1-272. Wiley, New York.
- Carrier, W.L., W.H. Lee, and J.D. Regan. 1983. Proceedings of the 7th International Congress of Radiation Research. (ed. J.J. Broerse, G.W. Barendsen, H.B. Kal, and A.J. van der Kogel). Martinus Nijhoff, The Hague.
- Ciarrocchi, G. and A.M. Pedrini. 1982. Determination of pyrimidine dimer unwinding angle by measurement of DNA electrophoretic mobility. *J Mol Biol* **155**: 177-183.

- Clingen, P.H., C.F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, and M.H. Green. 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**: 2245-2248.
- Cleaver, J.E. 1968. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**: 652-6.
- Cole, C.A., P.D. Forbes, and R.E. Davies. 1986. An action spectrum for UV photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* **43**: 275-284.
- Comité de Santé Environnementale du Québec. 1995. Rayonnement UV et le cancer. Dans *Oncogénèse environnementale au Québec*. pp. 13-26.
- Cooper, M.P., A.S. Balajee, and V.A. Bohr. 1999. The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair In vitro and In vivo. *Mol Biol Cell* **10**: 2119-2129.
- Cox, L.S. and D.P. Lane. 1995. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* **17**: 501-8.
- Dammann, R. and G.P. Pfeifer. 1997. Lack of gene- and strand-specific DNA repair in RNA polymerase III- transcribed human tRNA genes. *Mol Cell Biol* **17**: 219-229.
- Daya-Grosjean, L., N. Dumaz, and A. Sarasin. 1995. The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J Photochem Photobiol B* **28**: 115-124.
- de Gruijl, F.R. 1999. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* **35**: 2003-2009.
- de Gruijl, F.R. and J.C. van der Leun. 1991. Development of skin tumors in hairless mice after discontinuation of ultraviolet irradiation. *Cancer Res* **51**: 979-984.
- de Laat, W.L., N.G. Jaspers, and J.H. Hoeijmakers. 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785.

- Dellon, A.L., G.J. Elfenbein, and J.C. Orlando. 1984. Impairment of thymus-derived lymphoid cell function in patients with basal cell carcinoma. *J Surg Oncol* **25**: 92-97.
- Drouin, R. and G.P. Holmquist. 1993. UV-induced pyrimidine monoadducts and their in vivo photofootprints. In *Chromosomal Aberrations: Origin and Significance* (ed. G. Obe and A.T. Natarajan), pp. 10-20. Springer Verlag, Berlin.
- Drouin, R., H. Rodriguez, G.P. Holmquist, and S.A. Akman. 1996. Ligation-Mediated PCR for analysis of oxidative DNA damage. In *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations* (ed. G.P. Pfeifer), pp. 211-225. Plenum Press, New York.
- Drouin, R. and J.P. Therrien. 1997. UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in *p53*. *Photochem Photobiol* **66**: 719-726.
- Dumaz, N., A. Stary, T. Soussi, L. Daya-Grosjean, and A. Sarasin. 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.
- Evans, E., J.G. Moggs, J.R. Hwang, J.M. Egly, and R.D. Wood. 1997. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J* **16**: 6559-6573.
- Fears, T.R. and J. Scotto. 1983. Estimating increases in skin cancer morbidity due to increases in ultraviolet radiation exposure. *Cancer Invest* **1**: 119-126.
- Fitzpatrick, T.B. and A.J. Sober. 1985. Sunlight and skin cancer [editorial]. *N Engl J Med* **313**: 818-820.
- Ford, J.M., E.L. Baron, and P.C. Hanawalt. 1998. Human fibroblasts expressing the human papillomavirus *E6* gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* **58**: 599-603.

- 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**: 8876-8880.
- 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**: 28073-28080.
- Frederick, J.E., H.E. Snell, and E.K. Haywood. 1989. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochem Photobiol* **50**: 443-450.
- Frentz, G., F. da Cunha Bang, B. Munch-Petersen, and G.L. Wantzin. 1988. Increased number of circulating suppressor T-lymphocytes in sun-induced multiple skin cancers. *Cancer* **61**: 294-297.
- Friedberg, E.C. 1985. In *DNA Repair*. W.H. Freeman & Co., New York.
- Gao, S., R. Drouin, and G.P. Holmquist. 1994. DNA repair rates mapped along the human *PGK1* gene at nucleotide resolution [see comments]. *Science* **263**: 1438-1440.
- Geske, F.J., A.C. Nelson, R. Lieberman, R. Strange, T. Sun, and L.E. Gerschenson. 2000. DNA repair is activated in early stages of *p53*-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **7**: 393-401.
- Geyer, R.K., H. Nagasawa, J.B. Little, and C.G. Maki. 2000. Role and regulation of *p53* during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ* **11**: 149-56.
- Gibbs, P.E., A. Borden, and C.W. Lawrence. 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.
- Griffiths, H.R., P. Mistry, K.E. Herbert, and J. Lunec. 1998. Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci* **35**: 189-237.
- Hanawalt, P.C., A., Sarasin. 1986. Cancer prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends Genet* **2**: 124-129.



- Henriksen, T., A. Dahlback, S.H. Larsen, and J. Moan. 1990. Ultraviolet-radiation and skin cancer. Effect of an ozone layer depletion. *Photochem Photobiol* **51**: 579-582.
- Holmquist, G.P. and R. Drouin. 1998. Cyclobutane dimer frequency and their repair rates drive tumor mutation frequency in *p53* genes. *Photomedecine*: 396-398.
- Holmquist, G.P. and S. Gao. 1997. Somatic mutation theory, DNA repair rates, and the molecular epidemiology of *p53* mutations. *Mutat Res* **386**: 69-101.
- Jones, C.J. and R.D. Wood. 1993. Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* **32**: 12096-12104.
- Kelfkens, G., F.R. de Gruijl, and J.C. van der Leun. 1990. Ozone depletion and increase in annual carcinogenic ultraviolet dose. *Photochem Photobiol* **52**: 819-823.
- Kraemer, K.H., M.M. Lee, and J. Scotto. 1987. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* **123**: 241-50.
- Leaf, A. 1989. Potential health effects of global climatic and environmental changes. *N Engl J Med* **321**: 1577-1583.
- Lehmann, A.R. 1987. Cockayne's syndrome and trichothiodystrophy: defective repair without cancer. *Cancer Res* **7**: 82-103.
- Leveillard, T., L. Andera, N. Bissonnette, L. Schaeffer, L. Bracco, J.M. Egly, and B. Wasylyk. 1996. Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *Embo J* **15**: 1615-24.
- Li, R., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1996. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Curr Biol* **6**: 189-199.
- Li, R., S. Waga, G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* **371**: 534-537.

- Lyamichev, V.I., M.D. Frank-Kamenetskii, and V.N. Soyfer. 1990. Protection against UV-induced pyrimidine dimerization in DNA by triplex formation. *Nature* **344**: 568-570.
- Masutani, C., K. Sugasawa, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P.J. van der Spek, D. Bootsma, and et al. 1994. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo J* **13**: 1831-1843.
- McDonald, E.R., 3rd, G.S. Wu, T. Waldman, and W.S. El-Deiry. 1996. Repair Defect in p21 WAF1/CIP1 *-/-* human cancer cells. *Cancer Res* **56**: 2250-2255.
- McKay, B.C., M.A. Francis, and A.J. Rainbow. 1997. Wildtype p53 is required for heat shock and ultraviolet light enhanced repair of a UV-damaged reporter gene. *Carcinogenesis* **18**: 245-9.
- McKay, B.C., M. Ljungman, and A.J. Rainbow. 1999. Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* **20**: 1389-1396.
- McKay, B.C., C. Winrow, and A.J. Rainbow. 1997. Capacity of UV-irradiated human fibroblasts to support adenovirus DNA synthesis correlates with transcription-coupled repair and is reduced in SV40-transformed cells and cells expressing mutant p53. *Photochem Photobiol* **66**: 659-664.
- Mellon, I., G. Spivak, and P.C. Hanawalt. 1987. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian *DHFR* gene. *Cell* **51**: 241-249.
- Mezzina, M., E. Eveno, O. Chevallier-Lagente, A. Benoit, M. Carreau, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, M. Stefanini, A.R. Lehmann, C.A. Weber, and et al. 1994. Correction by the ERCC2 gene of UV sensitivity and repair deficiency phenotype in a subset of trichothiodystrophy cells. *Carcinogenesis* **15**: 1493-8.
- Miller, D.L. and M.A. Weinstock. 1994. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol* **30**: 774-778.

- Mitchell, D.L., J.P. Allison, and R.S. Nairn. 1990. Immunoprecipitation of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in uv-irradiated DNA. *Radiat Res* **123**: 299-303.
- Mitchell, D.L., J. Jen, and J.E. Cleaver. 1992. Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res* **20**: 225-229.
- Mitchell, D.L. and R.S. Nairn. 1989. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* **49**: 805-819.
- Mu, D., C.H. Park, T. Matsunaga, D.S. Hsu, J.T. Reardon, and A. Sancar. 1995. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* **270**: 2415-2418.
- Mu, D. and A. Sancar. 1997. Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans. *J Biol Chem* **272**: 7570-7573.
- Mu, D., M. Wakasugi, D.S. Hsu, and A. Sancar. 1997. Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease. *J Biol Chem* **272**: 28971-28979.
- Mueller, P.R. and B. Wold. 1989. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR [published erratum appears in Science 1990 May 18;248(4957):802]. *Science* **246**: 780-786.
- Pan, Z.Q., J.T. Reardon, L. Li, H. Flores-Rozas, R. Legerski, A. Sancar, and J. Hurwitz. 1995. Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* **270**: 22008-22016.
- Pehrson, J.R. 1995. Probing the conformation of nucleosome linker DNA in situ with pyrimidine dimer formation. *J Biol Chem* **270**: 22440-22444.
- Pehrson, J.R. and L.H. Cohen. 1992. Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation. *Nucleic Acids Res* **20**: 1321-1324.
- Pfeifer, G.P. 1997. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol* **65**: 270-283.

- Pfeifer, G.P., R. Drouin, A.D. Riggs, and G.P. Holmquist. 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.
- Pfeifer, G.P., R. Drouin, A.D. Riggs, and G.P. Holmquist. 1992. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol Cell Biol* **12**: 1798-1804.
- Pfeifer, G.P. and A.D. Riggs. 1993. Genomic sequencing. *Methods Mol Biol* **23**: 169-181.
- Pfeifer, G.P., S.D. Steigerwald, P.R. Mueller, B. Wold, and A.D. Riggs. 1989. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* **246**: 810-813.
- Piver, W.T. 1991. Global atmospheric changes. *Environ Health Perspect* **96**: 131-137.
- Preston, D.S. and R.S. Stern. 1992. Nonmelanoma cancers of the skin [see comments]. *N Engl J Med* **327**: 1649-1662.
- Reardon, J.T., D. Mu, and A. Sancar. 1996. Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* **271**: 19451-19456.
- Robins, P., C.J. Jones, M. Biggerstaff, T. Lindahl, and R.D. Wood. 1991. Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA. *Embo J* **10**: 3913-3921.
- Roy, R., L. Schaeffer, S. Humbert, W. Vermeulen, G. Weeda, and J.M. Egly. 1994. The DNA-dependent ATPase activity associated with the class II basic transcription factor BTF2/TFIIH. *J Biol Chem* **269**: 9826-9832.
- Rozek, D. and G.P. Pfeifer. 1993. In vivo protein-DNA interactions at the *c-jun* promoter: preformed complexes mediate the UV response. *Mol Cell Biol* **13**: 5490-5499.
- Rundel, R.D. 1983. Promotional effects of ultraviolet radiation on human basal and squamous cell carcinoma. *Photochem Photobiol* **38**: 569-575.

- Sage, E. 1993. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol* **57**: 163-174.
- Sarasin, A. 1991. The paradox of DNA repair-deficient diseases. *Cancer J* **4**: 233-237.
- Sarasin, A. 1994. Les gènes humains de la réparation de l'ADN. *Med Sci* **10**: 43-54.
- Sarasin, A., C. Blanchet-Bardon, G. Renault, A. Lehmann, C. Arlett, and Y. Dumez. 1992. Prenatal diagnosis in a subset of trichothiodystrophy patients defective in DNA repair. *Br J Dermatol* **127**: 485-91.
- Sarasin, A., G. Renault, C. Blanchet-Bardon, J. Boue, and Y. Dumez. 1988. Le Xeroderma pigmentosum : caractéristiques cliniques, génétiques et cellulaires-Développement d'un test anténatal. *médecine/sciences* **4**: 608-617.
- Schaeffer, L., V. Moncollin, R. Roy, A. Staub, M. Mezzina, A. Sarasin, G. Weeda, J.H. Hoeijmakers, and J.M. Egly. 1994. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* **13**: 2388-2392.
- Schaeffer, L., R. Roy, S. Humbert, V. Moncollin, W. Vermeulen, J.H. Hoeijmakers, P. Chambon, and J.M. Egly. 1993. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor [see comments]. *Science* **260**: 58-63.
- Schieferstein, U. and F. Thoma. 1996. Modulation of cyclobutane pyrimidine dimer formation in a positioned nucleosome containing poly(dA.dT) tracts. *Biochemistry* **35**: 7705-7714.
- Scotto, J., T.R. Fears, and J.F.J. Fraumeni. 1983. Incidence of nonmelanoma skin cancer in the United States. Government Printing Office, Washington, D.C.
- Setlow, R.B. and W.L. Carrier. 1966. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J Mol Biol* **17**: 237-254.

- Shivji, M.K., A.P. Eker, and R.D. Wood. 1994. DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group C and complementing factor from HeLa cells. *J Biol Chem* **269**: 22749-22757.
- Smith, M.L., I.T. Chen, Q. Zhan, P.M. O'Connor, and A.J. Fornace, Jr. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* **10**: 1053-9.
- Stefanini, M., P. Lagomarsini, C.F. Arlett, S. Marinoni, C. Borrone, F. Crovato, G. Trevisan, G. Cordone, and F. Nuzzo. 1986. Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity. *Hum Genet* **74**: 107-12.
- Sturzbecher, H.W., B. Donzelmann, W. Henning, U. Knippschild, and S. Buchhop. 1996. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* **15**: 1992-2002.
- Suquet, C. and M.J. Smerdon. 1993. UV damage to DNA strongly influences its rotational setting on the histone surface of reconstituted nucleosomes. *J Biol Chem* **268**: 23755-23757.
- Tang, M.S., H. Htun, Y. Cheng, and J.E. Dahlberg. 1991. Suppression of cyclobutane and mean value of 6-4 dipyrimidines formation in triple-stranded H-DNA. *Biochemistry* **30**: 7021-7026.
- Taylor, J.-S. 1990. DNA, sunlight, and skin cancer. *J. Chem. Educ.* **67**: 835-841.
- Therrien, J.P., R. Drouin, C. Baril, and E.A. Drobetsky. 1999b. Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15038-15043.
- Therrien, J.P., M. Rouabhia, E.A. Drobetsky, and R. Drouin. 1999a. The multilayered organization of engineered human skin does not influence the formation of sunlight-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cellular DNA. *Cancer Res* **59**: 285-289.

- Thilly, W.G. 1983. Analysis of chemically induced mutation in single cell populations. In *Induced Mutagenesis, Molecular Mechanisms and Their Implications for Environmental Protection* (ed. C.W. Lawrence), pp. 337-378. Plenum Press, New York.
- Thomas, D.C., D.L. Svoboda, J.M. Vos, and T.A. Kunkel. 1996. Strand specificity of mutagenic bypass replication of DNA containing psoralen monoadducts in a human cell extract. *Mol Cell Biol* **16**: 2537-2544.
- Tommasi, S., M.F. Denissenko, and G.P. Pfeifer. 1997. Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Res* **57**: 4727-4730.
- Tormanen, V.T. and G.P. Pfeifer. 1992. Mapping of UV photoproducts within *ras* proto-oncogenes in UV-irradiated cells: correlation with mutations in human skin cancer. *Oncogene* **7**: 1729-1736.
- Tornaletti, S., S. Bates, and G.P. Pfeifer. 1996. A high-resolution analysis of chromatin structure along *p53* sequences. *Mol Carcinog* **17**: 192-201.
- Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer. 1994. Slow repair of pyrimidine dimers at *p53* mutation hotspots in skin cancer [see comments]. *Science* **263**: 1436-1438.
- Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer. 1995a. 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**: 714-728.
- Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer. 1995b. Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the *p53* gene: implications for mutations in human cancers. *Oncogene* **10**: 1493-1499.
- Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer. 1996. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* **18**: 221-228.
- Tornaletti, S., D. Rozek, and G.P. Pfeifer. 1993. The distribution of UV photoproducts along the human *p53* gene and its relation to mutations in skin cancer [published erratum appears in *Oncogene* 1993 Dec;8(12):3469]. *Oncogene* **8**: 2051-2057.

- Tu, Y., S. Bates, and G.P. Pfeifer. 1998. The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during the elongation stages of RNA polymerase II transcription. *Mutat Res* **400**: 143-151.
- Tu, Y., S. Tornaletti, and G.P. Pfeifer. 1996. DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *Embo J* **15**: 675-683.
- Unna, P.G. 1894. In *Histopathology der Hautkrankheiten* (ed. A. Hirschwald), Berlin.
- Urbach, F. 1989. Potential effects of altered solar ultraviolet radiation on human skin cancer. *Photochem Photobiol* **50**: 507-513.
- van Hoffen, A., J. Venema, R. Meschini, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 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**: 360-367.
- Venema, J., A. van Hoffen, V. Karcagi, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 1991. Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol Cell Biol* **11**: 4128-4134.
- Venema, J., A. van Hoffen, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.H. Mullenders. 1990. The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA. *Nucleic Acids Res* **18**: 443-448.
- Venema, J., L.H. Mullenders, A.T. Natarajan, A.A. van Zeeland, and L.V. Mayne. 1990. The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4707-11
- Wang, X.W., K. Forrester, H. Yeh, M.A. Feitelson, J.R. Gu, and C.C. Harris. 1994. Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2230-4.



- 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**: 9072-9076.
- Wang, X.W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J.M. Egly, Z. Wang, E.C. Freidberg, M.K. Evans, B.G. Taffe, and et al. 1995. p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* **10**: 188-195.
- Weichselbaum, R.R., J. Nove, and J.B. Little. 1978. X-ray sensitivity of diploid fibroblasts from patients with hereditary or sporadic retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 3962-3964.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**: 345-7.
- Zhu, Q., Wani, M. A., El-Mahdy, M., and Wani, A. A. (2000). Decreased DNA repair efficiency by loss or disruption of p53 function preferentially affects removal of cyclobutane pyrimidine dimers from non-transcribed strand and slow repair sites in transcribed strand [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**, 11492-7.

## **ANNEXE I**

*[Biochemica, 2 : 22-24 ; version complète à  
[http://biochem.roche.com/prod\\_inf/biochemi/no2\\_99/b299drou.htm](http://biochem.roche.com/prod_inf/biochemi/no2_99/b299drou.htm)]*

# **A digoxigenin-based method using chemiluminescence to detect DNA sequence ladders on large nylon membranes**

**Jean-Philippe THERRIEN, Vickram BISSONAUTH  
& Régen DROUIN\***

Dept of Medical Biology, Faculty of Medicine, Université Laval, and  
Unité de Recherche en Génétique Humaine et Moléculaire,  
Research Center, CHUQ, Pavillon Saint-François d'Assise, 10 de l'Espinay St  
Québec (Québec) Canada G1L 3L5

**To whom correspondence should be addressed at:**

Unité de Recherche en Génétique Humaine et  
Moléculaire,  
Centre de Recherche,  
Pavillon Saint-François d'Assise, CHUQ  
10 rue de l'Espinay,  
Québec (Québec) G1L 3L5, Canada  
Tel.: (418) 525-4402  
Fax: (418) 525-4481  
email:  
regen.drouin@crsfa.ulaval.ca

## ABSTRACT

**Our purpose was to adapt the non-isotopic digoxigenin-based probe labelling method and chemiluminescent detection system of Boehringer Mannheim to reveal DNA sequence ladders after LMPCR amplification, genomic sequencing gel and electroblotting. The probe to be hybridized on large nylon membranes was labelled with digoxigenin and detected with chemiluminescence. The non-isotopic method was compared to the conventional isotopic method. Due its higher specificity, higher sensitivity and lower background, the digoxigenin-based probe labelling and chemiluminescence detection is highly recommendable.**

## Introduction

The ligation-mediated polymerase chain reaction (LMPCR) is the most sensitive genomic sequencing technique available to map extremely rare single-strand breaks at the nucleotide level of resolution. So far, LMPCR has been used for mapping *in vivo* protein-DNA interactions, for sequencing uncloned genomic DNA, for analyzing DNA methylation, for verifying the presence of particular chromatin structure in living cells and for studying DNA damage distribution (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) (Pfeifer et al 1989 ; Pfeifer et al. 1990ab ; Pfeifer and Riggs 1991 ; Pfeifer et al. 1991, 1992, 1993 ; Drouin and Therrien 1997). The

distribution of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) at the sequence level, the most frequent DNA damage produced by UVB (280-320 nm) and UVC (200-280 nm), has been studied along several human gene sequences using the LMPCR technology (9) (Tornaletti & Pfeifer, 1996). In particular, this technology can be used to study the promoter region of different genes after UV exposure. It has been reported that the frequency of DNA damage generated by UV could be modulated by protein-DNA interactions (6,10) (Becker and Wang 1984 ; Pfeifer et al. 1992), this phenomenon was called photofingerprint. A positive photofingerprint is seen when the UV-induced damage frequency of cellular DNA is higher than that of naked DNA. On the other hand, negative photofingerprint is observed when UV-induced damage frequency of cellular DNA is lower than that of naked DNA. When applied to living cells, dimethylsulphate (DMS) diffuses to nuclear DNA where it preferentially methylates guanine residues through the major groove at the N7-position. Guanine residues in contact with sequence-specific DNA-binding proteins display a different degree of reactivity with DMS compared with guanine residues not in contact with binding proteins. Proteins in contact with DNA either decrease accessibility of specific guanines to DMS (protection or negative footprints) or, often at the edges of a footprint, increase reactivity (hyperreactivity or positive footprints) (2) (Pfeifer et al 1990a). Hyperreactivity and protection can also indicate a modified DMS accessibility caused by special in vivo DNA structures.

There are two different ways to visualize sequence ladder fragments amplified by LMPCR : i) by using a third primer, which is radiolabelled, for 1 to 2 extra PCR cycles (11) (Mueller and Wold 1989) and, ii) by electroblotting the DNA fragments onto a nylon membrane followed by hybridization with a single-stranded radiolabelled probe (1) (Pfeifer et al. 1989). These two different ways,

thus, involve a radioactive labelling for detection of LMPCR-amplified sequence ladder fragments. Manipulation, storage and disposal of isotopes are expensive and can be very hazardous, hence there is a need to use non-isotopic detection methods. The objective of this project was to adapt a non-isotopic digoxigenin-based method using chemiluminescence to detect sequence ladder fragments on large nylon membranes. The specificity (background) and sensitivity (exposure time) of the conventional isotopic approach have been compared to that of the non-isotopic method. The non-isotopic method has a lower exposure time, and yields sharper sequence ladders as well as lower background comparatively to the isotopic method. In this work, we studied *in vivo* protein-DNA interactions following dimethylsulphate (DMS) treatment and UV exposure along the *c-jun* promoter using the LMPCR technology (Figure 1).

## Materials and Methods

The different steps of the LMPCR technique are outlined in Figure 1. The modification step (step 1 in Figure 1) : DNA damage were induced using UV irradiation or dimethylsulphate (DMS) treatment. Human fibroblasts (*in vivo* system) and purified DNA (*in vitro* system) were irradiated with UV light or treated with DMS (8, 12) (Drouin and Therrien 1997 ; Drouin et al. 1997). Confluent monolayer fibroblasts were exposed to either 10 000 J/m<sup>2</sup> of UVB or 200 J/m<sup>2</sup> of UVC on ice. Purified DNA dissolved in a physiological buffer ( 150 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) at a concentration of 65 µg/ml was irradiated on ice with the same doses of UVB and UVC (8) (Drouin and Therrien 1997). Alternatively, fibroblasts were treated

with 0.2% DMS at room temperature for 6 minutes and purified DNA (50 µg) was treated with DMS as previously described (12) (Drouin et al. 1997). Nuclei isolation and DNA purification were performed as usual (13) (Drouin et al. 1996).

The conversion step (step 2 in Fig. 1) : the modified bases were converted into single-strand breaks with a 5'-phosphate group either enzymatically or chemically.

#### Cleavage at CPD :

Briefly, DNA aliquots (10 µg) were digested in 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, and 100 µg/µl bovine serum albumin at 37°C for one hour with T<sub>4</sub> endonuclease V (kindly provided by R. Stephen Lloyd) in a total volume of 100 µl (6, 9) (Pfeifer et al 1992 ; Tornaletti & Pfeifer, 1996). After T<sub>4</sub> endonuclease V cleavage, the 5'-overhung base was removed by UVA-driven photolyase (kindly provided by Aziz Sancar) photoreactivation. Then, the reaction was stopped with sodium dodecyl sulphate (SDS ; final concentration 0.5%), DNA was extracted by phenol-chloroform method and precipitated for 20 minutes on dry ice with 18 µl of 5 M sodium chloride, and 2.5 volumes of ethanol 100%. Finally, the air-dried DNA pellets were resuspended in Sequenase buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.7 and 50 mM NaCl) at a final concentration of 0.16 µg/µl (13) (Drouin et al. 1996).

#### Cleavage of methylated guanine :

The DMS treated DNA (50 µg) was incubated at 90 ° C with 1M piperidine for 30 min (5) (Pfeifer et al. 1991). The *in vivo* and *in vitro* DNA were resuspended in a sequenase buffer at a concentration of 0.16 µg/µl.

### Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction (LMPCR) :

Primer-extension step (step 3 in Fig. 1) : a gene-specific primer (Primer 1) was annealed at 48°C and the primer was extended with Sequenase enzyme at 48°C. Ligation step (step 4 in Fig. 1) : all extended DNA fragments with a blunt-end and 5'-phosphate group were ligated to an unphosphorylated synthetic asymmetric double-strand linker. Linear amplification step (step 5 in Fig. 1) : a second gene-specific primer (Primer 2) was annealed to DNA fragments for a one-cycle extension using *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim). Exponential amplification step (step 6 in Fig. 1) : the primer 2 and the linker primer (the longest of the two oligonucleotides of the linker) were used to exponentially and specifically amplify DNA fragments. Sequencing gel electrophoresis and electroblotting (step 7 in Fig. 1) : amplified DNA fragments were size-separated on a denaturing 8% polyacrylamide gel and transferred onto a nylon membrane (Boehringer Mannheim, positively charged Nylon membranes, lot : 83074401, 1092A) by electroblotting. Hybridization (step 8 in Fig. 1) : the nylon membrane was hybridized overnight with a gene-specific probe. The LMPCR protocol used in this work has already been published in details (13) (Drouin et al. 1996). Primer set JD of *c-jun* promoter was used (14) (Rozek & Pfeifer, 1993) ; primer JD-1 (CCGCGCACCTCCACTC, T<sub>m</sub> ; 53°C) was used for the primer extension, primer JD-2 (ACCTCCACTCCCGCCTCGCTGC, T<sub>m</sub> : 67°C) for the amplification step and primer JD-3 (CCTCGCTGCTTCAGCCACACTCA, T<sub>m</sub> : 63°C) used for the preparation of non-isotopic and isotopic probes.

### Preparation of the radiolabelled probe :

To prepare the isotopic probe, PCR products from *c-jun* promoter were used as the template. To radiolabel the probe, ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (3000 Ci/mmol) nucleotide



was incorporated during the linear PCR amplification. The following mix was prepared in a final volume of 150  $\mu$ l : 0.01% gelatin, 10 mM Tris-HCl pH : 8.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 0.25 mM of dATP, dGTP and dTTP, 5 to 20 ng of PCR products, 75 pmoles of primer 3, 5 Units of Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim) and 10  $\mu$ l of [<sup>32</sup>P]dCTP. The mix was cycled once at 97°C (3 min), 62°C (2 min) and 74°C (3 min), followed by 29 cycles at 95°C (1 min), 61°C (2 min) and 74°C (3 min). The probe was precipitated at room temperature with 50  $\mu$ l of NH<sub>4</sub>Ac 7.5 M, 1  $\mu$ l of glycogen (20 mg/ml) and two volumes of cold ethanol 100%. The pellet was dissolved in 100  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl pH : 8 and 1 mM EDTA (TE) and mixed with 7.5 ml of hybridization buffer (0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 1.0% BSA, 7% SDS).

Preparation of the digoxigenin-labelled probe :

To prepare the non-isotopic probe, PCR products from *c-jun* promoter were used as the template. To label the probe with digoxigenin, Dig-dUTP nucleotide (Boehringer Mannheim) was incorporated during the linear PCR amplification. The same mix was prepared as for the radiolabelled probe, except for the radioactive nucleotide which was replaced by 1.2  $\mu$ l of 0.5 mM digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim) and the dNTP mix (25 mM dATP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP and 20 mM dTTP ; Boehringer Mannheim) which was diluted 1/8.3. The same amplification cycles were used as with the radiolabelled probe. After the usual probe precipitation, the pellet was dissolved in 100  $\mu$ l of TE and mixed with 15 ml of pre-hybridization buffer : 5X SSC (1X SSC : 0.15 M NaCl and 0.015 M Na-citrate, pH 7), 1.0% of caseine, 0.1% N-lauroylsarcosine and 0.02% SDS. The nylon membrane (Boehringer Mannheim) was prehybridized for at least 3 hours with 20 ml of prehybridization buffer at 67°C and hybridized overnight with 7.5 ml of hybridization buffer (pre-hybridization buffer + non-

isotopic probe) at 67°C. The membrane was washed twice with 20 ml of 2X washing solution (2X SSC and 0.1% SDS) for 5 min at room temperature, followed by two washes with 20 ml of 0.1X washing solution (0.1X SSC and 0.1% SDS) for 15 min at 65°C.

**Chemiluminescent detection :**

The membrane was washed with 50 ml of Buffer 1 (100 mM Maleic acid, 150 mM NaCl, pH : 7.5) for one minute at room temperature. It was then transferred in a new recipient and incubated with 20 ml of Buffer 2 [Buffer 1 + 1% (w/v) casein] for 1 hour at room temperature. The anti-digoxigenin antibody (Boehringer Mannheim) was diluted 1 : 10,000 in 20 ml of Buffer 2, 5 min before the end of the incubation with Buffer 2. Following the one-hour incubation, Buffer 2 was replaced by the diluted antibody solution and the membrane was left for 30 min at room temperature. Then, the antibody solution was removed and the membrane washed with 20 ml of Buffer 1. The membrane was transferred in a new recipient and incubated with 20 ml of Buffer 1 containing 0.3% Tween 20, for 15 min at room temperature. Buffer 1 was then replaced by 20 ml of Buffer 3 (100 mM Tris-HCl, pH : 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) and incubated for 5 min at room temperature. The membrane was placed between two cellulose acetate sheets and 0.5 ml/100 cm<sup>2</sup> of CSPD diluted 1 : 100 in Buffer 3 was added, in between the acetate sheet sandwich, on the membrane. After carefully removing the air bubbles, the acetate sheets were sealed by the heat and the membrane was incubated for 15 min at 37°C. Finally, the membrane was exposed on Kodak XAR-5 X-ray film for 40 min.

## Results

The *in vivo* protein-DNA interactions in the promoter region of the proto-oncogene *c-jun* have been previously studied by three different footprinting methods involving LMPCR (14, 15, 16) (Rozek and Pfeifer 1993, 1995 ; Tornaletti and Pfeifer 1995). *In vivo* DNase I treatment following lysolecithin-permeabilization, DMS treatment and UV exposure were the three methods used. Seven core recognition sequences for transcription factors have thus been localized. In this work, six of them were analyzed using *in vivo* DMS footprinting and photofootprinting methods. These sequences are : a Related to Serum Response Factor (RSRF) (nucleotide [nt] -60 to -49), an AP-1-like sequence (nt -71 to -64), a CCAAT box element (nt -91 to -87), two SP-1 sequences (nt -115 to -110 and nt -123 to -118) and, a Nuclear Factor *jun* (NF-*jun*) site (nt -140 to -132) (14,15,16) (Rozek and Pfeifer 1993, 1995 ; Tornaletti and Pfeifer 1995). The region shown in Figure 2, analyzed using the primer set JD, reveals the upper (nontranscribed) strand sequence from nucleotide -42 to -140 relative to the major transcription initiation site. As expected, all four putative consensus sequences for transcription factors had DMS footprints and/or photofootprints in primary human fibroblasts (Figures 2 and 3). In the case of RSRF, for example, five dipyrimidine sites were analyzed and four of them showed negative photofootprints indicating a lower CPD frequency in fibroblasts as compared to purified DNA (Figures 2 and 3). Furthermore, DMS footprints located outside the putative consensus sequences were found (Figures 2 and 3). Thus, the presence of DMS footprints and photofootprints in these four consensus sequences confirm the binding of corresponding transcription factors (RSRF, AP-1, CCAAT box binding protein and NF-*jun*) in living fibroblasts.

The same DMS footprints and photofootprints had already been obtained by Pfeifer et al. (14,15, 16) (Rozek and Pfeifer 1993, 1995 ; Tornaletti and Pfeifer 1995). We used this model to compare a non-isotopic probe labelling method to the conventional isotopic procedure to reveal genomic sequence ladder. In Figure 2A and 2C, the sequence ladders were revealed by a gene-specific isotopic  $^{32}\text{P}$ -dCTP-labelled probe while in Figure 2B, the sequence ladder was revealed by a gene-specific non-isotopic digoxigenin-labelled probe. All three parts of the Figure 2 clearly show the presence of footprints and photofootprints corresponding mostly to different sites of protein-DNA interactions on the *c-jun* promoter. However, as shown in Figure 2B, the sequence ladder revealed by non-isotopic labelling was clearer, sharper and presented lesser background as compared to isotopic labelling method (Figure 2A and 2C). Indeed, the bands obtained with the non-isotopic method could be distinguished more easily from each other as compared to those obtained with isotopic labelling. Furthermore, the general aspect of the non-isotopic sequence ladder showed similarities with the isotopic sequence ladder without intensifying screens (Figure 2B vs 2C). All of the DMS footprints and photofootprints were revealed with the non-isotopic method as well as, if not better than, with the conventional isotopic method. Hence, the digoxigenin-based probe labelling method using chemiluminescence detection appears to be unquestionably more specific and more sensitive than the isotopic probe labelling method.

## Discussion

It is well known that the use of isotopes in Molecular Biology comprise several disadvantages. Indeed, radioactive labelling entails rigorous precautions during manipulation, is costly, requires special set-ups for storage and disposal, and, above all, may cause serious health problems. Due to the short half-life of radiolabelled probes, they should be used quickly. Considering all these aspects, there is now a pressing need to find non-isotopic methods for probe labelling purposes.

In this work, we have successfully adapted a digoxigenin-based non-isotopic labelling method to reveal DNA sequence ladders after DMS footprinting and photofootprinting of the promoter region of *c-jun*. This non-isotopic probe labelling method, detected using chemiluminescence, was compared to the conventional isotopic labelling procedure. We showed that our digoxigenin-based method was more sensitive, gave lesser background and sharper sequence ladder bands as compared to isotopic labelling.

On the other hand, unlike isotopic probes, digoxigenin-labelled probes are innocuous, can be easily disposed of and stored for long periods, and can even be reused. It is worth noting, however, that this non-isotopic detection method requires some minor precautions. First, the nylon membrane used for this type of detection, must bear a specific amount of homogeneously-distributed positive charge. For this purpose, Boehringer Mannheim provides a membrane on which the amount of positive charges is accurately controlled. Other types of membranes were tested, but all of them gave poor results as compared to the Boehringer-Mannheim membrane (data not shown). Secondly, care should be

taken with the manipulation of the membrane. The use of tweezers is strongly recommended in order to reduce the presence of non-specific spots and decrease the background. As seen in Figure 2B, in spite of taking every precautions, there are some small spots on the **autoradiogram**, these might be explained by the powder from the gloves. An alternative explanation for these spots might be the presence of undissolved crystals in the antibody solution (to avoid this problem, this solution can be spinned for 15-30 sec before use) or in the detection buffer. Otherwise, the use of an appropriate membrane and meticulous manipulations can produce very good results with the non-isotopic detection method.

In conclusion, the results obtained with the non-isotopic digoxigenin-labelled probe for DNA sequence ladder detection are very promising. Due its higher specificity, higher sensitivity and lower background, the digoxigenin-based probe labelling and chemiluminescence detection is highly recommendable.

## **Acknowledgements**

The authors are extremely grateful to Dr François Rousseau for reviewing the manuscript and stimulating discussions. We thank Nancy Dallaire for assistance with fibroblast culture, Aziz Sancar for photolyase and R. Stephen Lloyd for T4 endonuclease V. Supported by a grant from Boehringer Mannheim to R.D. and "La Fondation de l'Hôpital Saint-François d'Assise." "Le Centre de Recherche" is supported by "le Fonds de la Recherche en Santé du Québec." R.D. holds a scholarship from the Cancer Research Society Inc./MRC and J.-P.T. a studentship from "Le Centre de Recherche."

## References

1. Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Mueller, P.R., Wold, B., Riggs, A.D. (1989) Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 246:810-813.
2. Pfeifer, G.P., Tanguay, R.L., Steigerwald, S.D., Riggs, A.D. (1990a) In vivo footprint and methylation analysis by PCR-aided genomic sequencing : comparison of active and inactive X chromosomal DNA at the CpG island and promoter of human PGK-1. *Genes Dev.* 4:1277-1287.
3. Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Hansen, R.S., Gartler, S.M., Riggs, A.D. (1990b) Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island : methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8252-8256.
4. Pfeifer, G.P., Riggs, A.D. (1991) Chromatin differences between active and inactive X chromosomes revealed by genomic footprinting of permeabilized cells using DNase I and ligation-mediated PCR. *Genes Dev.* 5:1102-1113.
5. Pfeifer, G.P., Drouin, R., Riggs, A.D., 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. USA* 88:1374-1378.
6. Pfeifer, G.P., Drouin, R., Riggs, A.D., Holmquist, G.P. (1992) Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol. Cell Biol.* 12:1798-1804.

7. Pfeifer, G.P., Drouin, R., Holmquist, G.P. (1993) Detection of DNA adducts at the DNA sequence level by ligation-mediated PCR. *Mutat. Res.* 288:39-46.
8. Drouin, R., Therrien, J.-P. (1997) UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in *P53*. *Photochem. Photobiol.* 66(5), 719-726.
9. Tornaletti, S., 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.
10. Becker, M.M., Wang, J.C. (1984) Use of light for footprinting DNA in vivo. *Nature* 309:682-687.
11. Mueller, P.R., Wold, B. (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246:780-786.
12. Drouin, R., Angers, M., Dallaire, N., Rose, T.M., Khandjian, E.W., Rousseau, F. (1997) Structural and functional characterization of the human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Hum. Mol. Genet.* 6:2051-2060.
13. Drouin, R., Rodriguez, H., Holmquist, G.P., 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. 199-209. Plenum Press, New York.
14. Rozek, D., Pfeifer, G.P. (1993) In vivo protein-DNA interactions at the *c-jun* promoter : preformed complexes mediate the UV response. *Mol. and Cell Biol.* 13:5490-5499.
15. Rozek, D., Pfeifer, G.P. (1995) In vivo protein-DNA interactions at the *c-jun* promoter in quiescent and serum-stimulated fibroblasts. *J. Cell Biochem.* 57:479-487.



16. Tomaletti, 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.* 249:714-728.

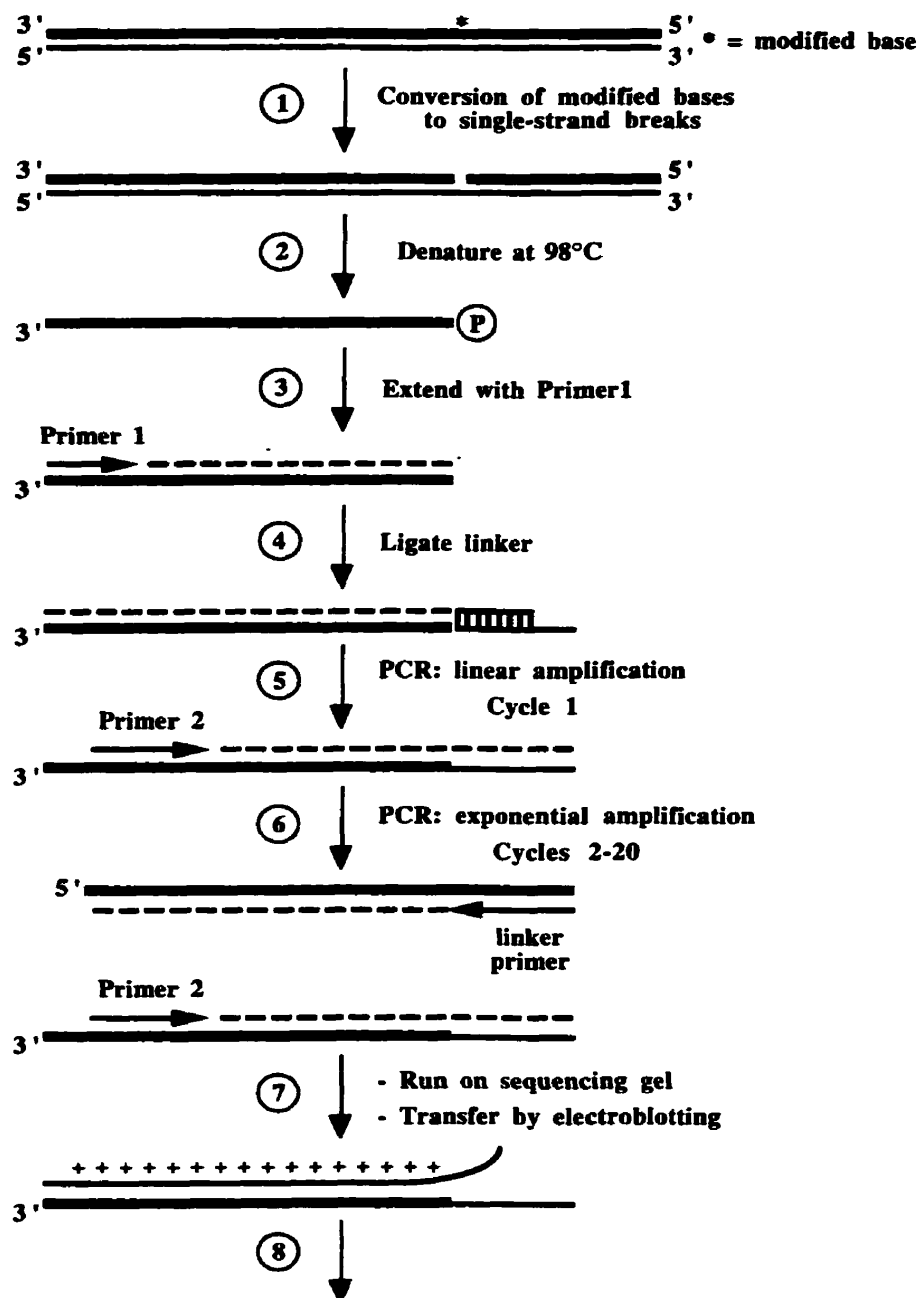
## Legends

**Figure 1.** Schematic representation of the LMPCR procedure. Step 1, specific conversion of modified bases to strand breaks ; Step 2, denaturation of genomic DNA ; Step 3, annealing and extension of primer 1 with Sequenase ; Step 4, ligation of the linker ; Step 5, first cycle of PCR amplification, this cycle is a linear amplification because only the gene-specific primer 2 can anneal ; Step 6, cycle 2 to 20 of exponential PCR amplification of gene-specific fragments with primer 2 and the linker primer (the longer oligonucleotide of the linker) ; Step 7, separation of the DNA fragments on a sequencing gel and transfer of the sequence ladder to a nylon membrane by electroblotting ; Step 8, visualization of the sequence ladder by hybridization with a labelled single-stranded probe which abuts on primer 2.

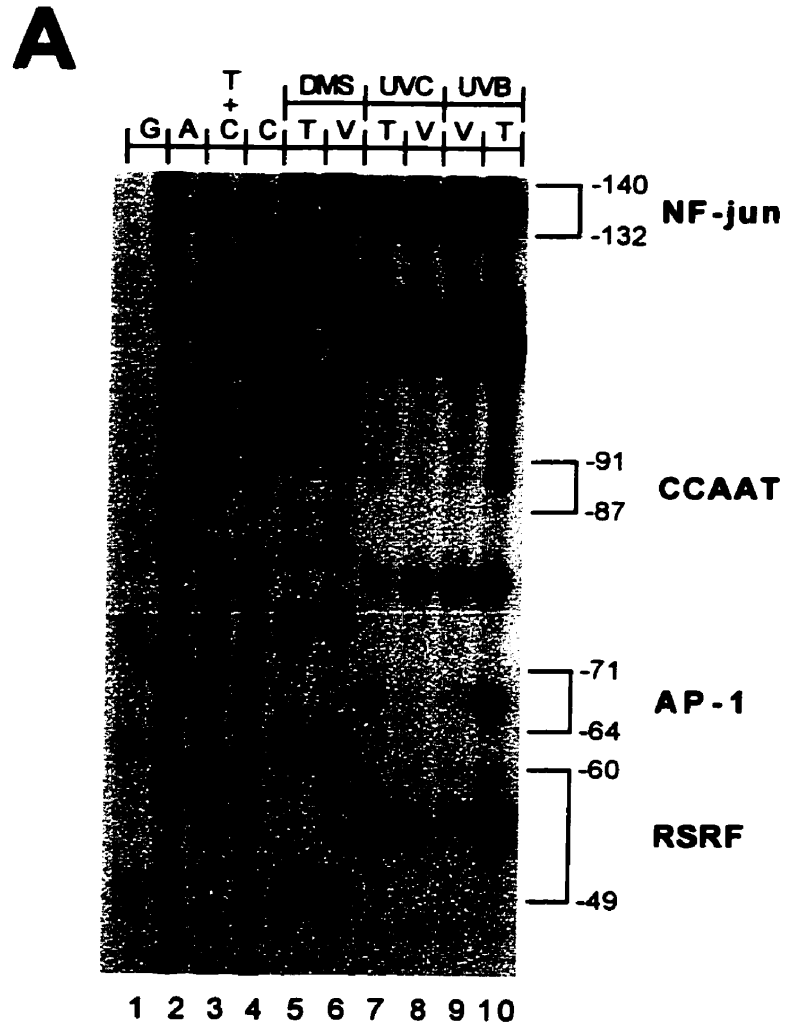
**Figure 2.** Distribution of methylated guanines and CPD along the non-transcribed strand of the *c-jun* promoter following DMS treatment, and UVB and UVC irradiation respectively. Parts A and C, the membrane was hybridized with an isotopic  $^{32}\text{P}$ -dCTP-labelled probe. The membrane was exposed on film with two intensifying screens for 25 min at  $-70^{\circ}\text{C}$  (A). Then, the same membrane was exposed on film for 3 hours at room temperature (C). Part B, the membrane was hybridized with a digoxigenin-labelled probe and exposed on film for 40 min at room temperature. For this experiment, one LMPCR protocol was carried out

and only one gel was run on which all the samples (20 in total) were loaded symmetrically in duplicate. Each symmetrical well of each set of samples was loaded with exactly the same amount of DNA. Lanes 1-4, LMPCR of DNA treated with standard Maxam-Gilbert cleavage reactions. These lanes represent the sequence of *c-jun* promoter analyzed with JD primer set. Lanes 5-6, LMPCR of DMS treated naked DNA (T : *in vitro*) and fibroblasts (V : *in vivo*) followed by hot piperidine treatment. Lanes 7-10, LMPCR of UVC- and UVB-irradiated naked DNA (T) and fibroblasts (V) followed by T4 endonuclease V/photolyase digestion. On the right, the consensus sequences of transcription factor binding sites are delimited by brackets. The numbers indicate their positions relative to the major transcription initiation site.

**Figure 3.** Schematic map of DMS footprints and photofootprints along the analyzed sequence of the *c-jun* promoter from nucleotide -42 to -140 relative to the major transcription initiation site. Open circles represent guanines which are protected against DMS-induced methylation (negative DMS footprints) *in vivo*. Closed circles represent guanines which are hyperreactive to DMS (positive DMS footprints) *in vivo*. Cross-hatched squares indicate inhibition of UV-induced CPD formation (negative photofootprints) *in vivo*. Closed square indicates increase of UV-induced CPD formation (positive photofootprints) *in vivo*. The brackets indicate dipyrimidine sites susceptible to the formation of CPD. The putative consensus sequences for transcription factor binding sites are enclosed in a box.

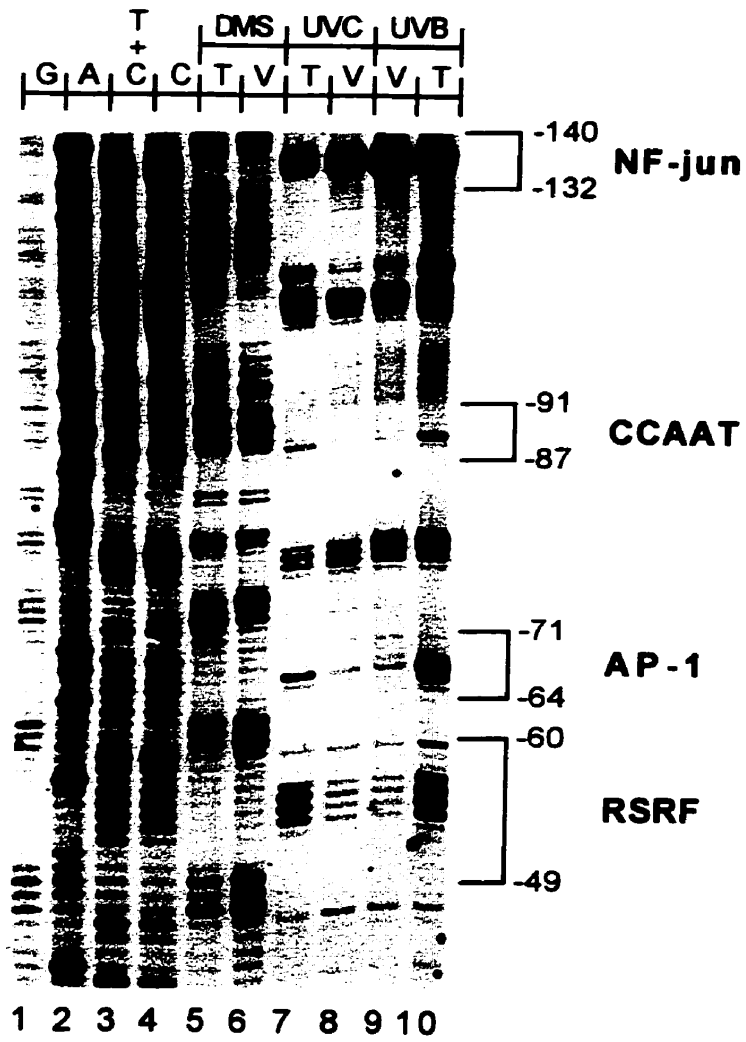
**FIGURE 1****Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction**

- Prehybridization
- Hybridization with labelled probe
- Washing membrane
- Autoradiography or chemiluminescence

**FIGURE 2A**

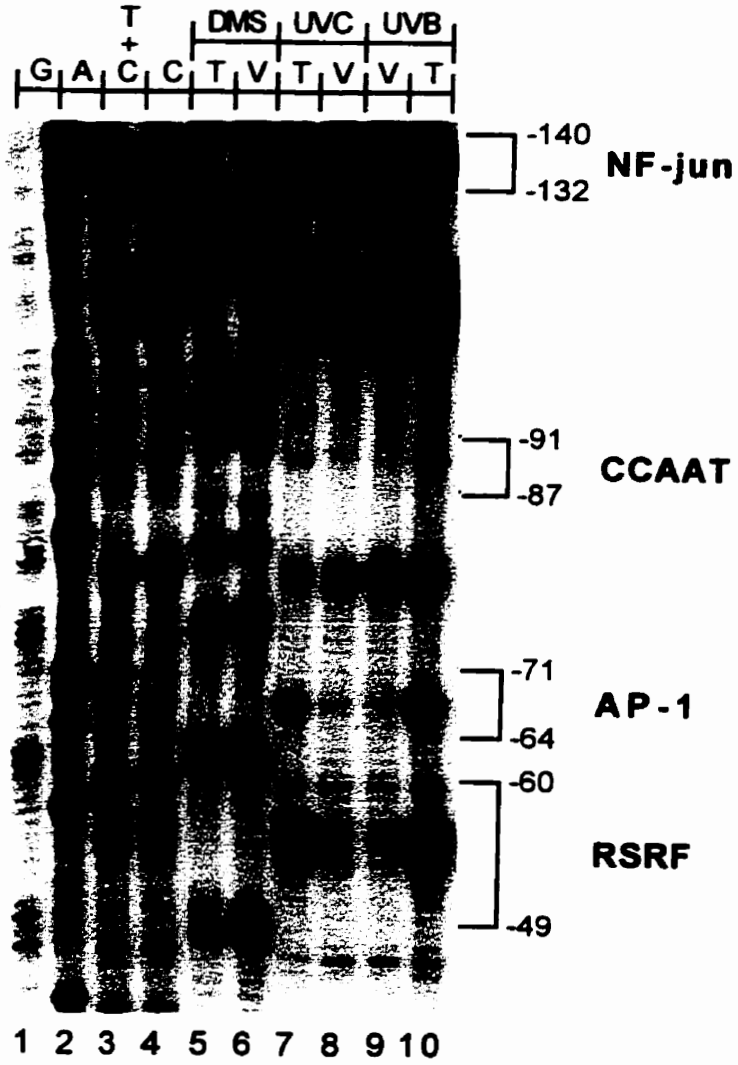
**FIGURE 2B**

**B**



**FIGURE 2C**

**C**



**FIGURE 3**