

ANNIE BILODEAU

**L'INFLUENCE DE p53 SUR LA FRÉQUENCE  
DES MUTATIONS PONCTUELLES PROVOQUÉES  
PAR DIVERS AGENTS**

Mémoire  
présenté  
à la Faculté des études supérieures  
de l'Université Laval  
pour l'obtention  
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de biologie  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL

Août 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.

0-612-55837-1

## RÉSUMÉ ABRÉGÉ

La protéine suppresseur de tumeur p53 s'est vue attribuer le titre de gardien du génome. Il est connu que p53 peut réduire la fréquence de certains types d'instabilité génomique telles les amplifications, les aberrations chromosomiques, l'aneuploïdie et la polyploïdie, mais peu de données sont disponibles dans le cas des mutations ponctuelles. Le travail de ce mémoire vise à étudier l'influence de p53 sur les fréquences de mutation causées par divers agents cancérigènes. Le vecteur navette pYZ289 est traité in vitro par soit le bleu de méthylène (MB) en présence de lumière et d'oxygène, les ultraviolets de type A (UVA) en présence de riboflavine, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le méthyl méthanesulfonate (MMS). Le vecteur pYZ289 est ensuite transfecté dans des cellules de mammifères, récupéré, purifié et électroporé dans des bactéries, permettant l'identification et l'analyse des mutants. La transfection est faite soit avec le vecteur d'expression de p53 ou un vecteur contrôle. Les résultats de ce mémoire mis avec ceux obtenus précédemment au laboratoire permettent de poser l'hypothèse que p53 peut reconnaître les adduits sur l'ADN, les dommages oxydatifs, mais de façon variable selon l'agent qui les cause et sa concentration, les méthylations, mais non les photoproduits sur l'ADN. Ainsi, les travaux ont appuyé l'hypothèse voulant que p53 peut exercer, dans certaines conditions, son rôle de gardien du génome au niveau des mutations ponctuelles.

À Gérard et Régina, mes parents...

## AVANT-PROPOS

C'est avec fierté et satisfaction que se termine l'écriture de ce mémoire, qui représente pour moi la fin d'une étape de ma vie, donc le début d'une autre. Ce sont quelques pas de plus dans mon cheminement de carrière; quelques pas qui ont été stimulants parce que faits dans des conditions favorables à l'apprentissage, dans un climat agréable et en plus, en bonne compagnie.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Alan Anderson pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir su m'aider de ses judicieux conseils et de ses encouragements. Sa grande disponibilité, son savoir scientifique et sa patience font de lui un excellent directeur de recherche.

Je tiens aussi à souligner ma reconnaissance aux membres du laboratoire Anderson, sans qui ces deux dernières années n'auraient pas été les mêmes. Un merci tout particulier à Chantal, qui m'a initiée au projet de p53 en me transmettant beaucoup de ses connaissances ainsi que sa passion pour le projet. Merci à Éric, pour son savoir scientifique et pour son amitié. Merci à Yanick pour ses conseils et son écoute, à Marc pour ses connaissances et son humour, à Jacques pour sa bonne humeur, à Marie-Josée pour son amabilité ainsi qu'à tous les étudiants qui sont passés au labo pendant ma présence. C'est vous tous qui avez égayé mon travail, par votre joie de vivre, votre grande générosité et votre amitié.

Je ne pourrais passer sous silence nos merveilleux voisins, qui pour moi ont toujours fait partie du labo; merci au Dr Carl Séguin, à Olivier et à Véronique. Je voudrais aussi remercier tous les gens du centre qui ont ensoleillé mes journées par leur sourire, leur petit bonjour ou leurs quelques mots. C'est grâce à vous tous si le centre est un endroit où il fait bon vivre et travailler. Un merci particulier à ceux qui ont su me faire profiter de leur expérience scientifique et qui ont su me donner des conseils très appréciés pour l'avancement de mon projet.

D'autres personnes ont aussi été particulièrement importantes dans la réussite de ce travail. Ce sont des gens qui me sont très chers, qui sont près de moi et qui me soutiennent

depuis toujours : mes parents. C'est à eux que je dédie ce mémoire. C'est à mon père et à ma mère, qui ont toujours été si attentifs à mes besoins, si patients, si dévoués et si généreux. Ils ont toujours su m'encourager, m'ont aidée de tellement de manière et m'ont transmis des valeurs qui m'ont permis d'être ce que je suis aujourd'hui. Jamais je ne pourrai leur rendre ce qu'ils m'ont donné, mais toujours je leur en serai reconnaissante. Un merci aussi à mes frères, Marc et Sylvain, qui ont à leur façon contribué à ma réussite. Leur présence, leur amour et leur réconfort a toujours été des plus appréciés.

Enfin, un énorme merci à celui qui a su me comprendre, m'encourager, me réconforter et m'aider tout au long de ma maîtrise; mon copain Simon. Merci tout simplement d'être là, sans toi tout aurait été différent.

Bonne lecture...

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ABRÉGÉ .....	ii
AVANT-PROPOS .....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
<b>CHAPITRE 1</b>	
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Le cancer .....	1
1.2 Gènes supresseurs de cancer .....	1
1.3 p53.....	2
1.3.1 La protéine p53 .....	3
1.3.2 Liaison à p53.....	4
1.3.3 Activation de p53.....	7
1.3.4 p53 chez la souris.....	9
1.3.5 Homologues à p53 .....	9
1.4. Régulation du cycle cellulaire.....	10
1.5 Apoptose par p53 .....	13
1.6 Mutations.....	15
1.7 Les agents mutagènes.....	15
1.7.1 Le BM .....	17
1.7.2 Les UV .....	18
1.7.3 Le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	20
1.7.4 Le CPBA .....	21
1.7.5 Le BPDE .....	21
1.7.6 L'AFB1 .....	22
1.7.7 Le MMS .....	22
1.8 Réparation de l'ADN .....	23
1.9 Les dommages oxydatifs .....	26

1.10 Les inhibiteurs des ROS.....	27
1.11 Méthode d'analyse de la mutagenèse.....	28
1.11.1 Test de Ames.....	28
1.11.2 Les vecteurs utilisés.....	28
1.11.3 Le gène cible supF.....	31
1.12 Résumé du travail.....	33
<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	35
2.1 Méthode générale.....	35
2.2 Traitements aux agents mutagènes.....	35
2.2.1 Traitement au CPBA.....	35
2.2.2 Traitement au BM.....	37
2.2.3 Traitement au BPDE.....	37
2.2.4 Traitement au MMS.....	37
2.2.5 Traitement au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
2.2.6 Traitement aux UVA.....	38
2.2.7 Traitement aux UVC.....	38
2.2.8 Utilisation des inhibiteurs.....	38
2.3 Cellules et plasmides.....	39
2.4 Transfection et extraction des plasmides.....	39
2.5 Électroporation et compte des fréquences de mutation.....	40
2.6 Immunofluorescence de p53.....	40
<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>TRAITEMENTS DE MUTAGÈNESE DE pYZ289, AU BLEU DE MÉTHYLÈNE, AUX ULTRAVIOLETS DE TYPE A, AU PEROXYDE D'HYDROGÈNE AINSI QU'AU MÉTHYL MÉTHANESULFONATE.....</b>	<b>41</b>
3.1 Résultats.....	41
3.1.1 Présence et activité de p53.....	41
3.1.2 Traitements au BM.....	44
3.1.3 Traitements aux UVA.....	54
3.1.4 Traitements au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	57
3.1.5 Traitements au MMS.....	59
3.2 Discussion.....	61



<u>CHAPITRE 4</u>	
UTILISATION D'INHIBITEURS.....	73
4.1 Résultats.....	73
4.2 Discussion.....	77
<u>CHAPITRE 5</u>	
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	82
RÉFÉRENCES.....	88
ANNEXE A : La réduction de la fréquence de mutation dépendante de p53 en fonction de la fréquence de colonies blanches obtenue.....	104
ANNEXE B : Essais pour utilisation d'une nouvelle méthode d'extraction.....	105

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1. La protéine p53.....	5
Figure 2. Points de contrôle du cycle cellulaire .....	11
Figure 3. Représentation schématique du modèle de Lane (1992) .....	12
Figure 4. Réparation par excision de bases .....	25
Figure 5. Vecteur pYZ289.....	30
Figure 6. Gène cible de la mutagenèse <i>supF</i> .....	32

### CHAPITRE 2

Figure 1. Méthode utilisée pour déterminer l'influence de p53 sur la fréquence des mutations ponctuelles provoquées par des agents oxydants.....	36
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### CHAPITRE 3

Figure 1. Détection de l'expression de p53 par immunofluorescence .....	42
Figure 2. Fréquences de mutation obtenues en fonction de la concentration de l'agent mutagène utilisé.....	45
Figure 3. Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM en fonction du temps d'exposition à la lumière visible .....	46
Figure 4. Diminution des fréquences de mutation par p53, pour les différents agents utilisés en mutagenèse.....	63

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1

Tableau 1. Agents utilisés pour la mutagenèse avec les principaux dommages qu'ils provoquent sur l'ADN ainsi que leur structure. ....	16
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### CHAPITRE 3

Tableau 1. Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM et à la lumière à des concentrations de 20 $\mu$ M.....	49
Tableau 2. Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM et à la lumière à des concentrations de 200 $\mu$ M.....	50
Tableau 3. Fréquences de mutation obtenues lors d'électroporations différentes pour des traitements au BM.....	51
Tableau 4. RFM pour les traitements au BM à des concentrations de 20 $\mu$ M.....	52
Tableau 5. RFM pour les traitements au BM à des concentrations de 200 $\mu$ M.....	53
Tableau 6. Fréquences de mutation des traitements aux UVA (366 nm) en présence de riboflavine .....	56
Tableau 7. Fréquences de mutation des traitements au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	58
Tableau 8. Fréquences de mutation des traitements au MMS.....	60

### CHAPITRE 4

Tableau 1. Fréquences de mutation obtenues après traitement par différentes agents, en présence d'inhibiteurs de dommages oxydatifs ainsi que les FI.....	75
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

8-oxoG.....	8-oxoguanine
A.....	adénine
AFB1.....	aflatoxine B <sub>1</sub>
AP.....	apurinique/apurimidique
BER.....	réparation par excision de bases
BPDE.....	7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[ <i>a</i> ]pyrène
C.....	cytosine
CPBA.....	acide méta-chloroperoxybenzoïque
DMSO.....	diméthylsulfoxyde
G.....	guanine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	peroxyde d'hydrogène
IPTG.....	isopropyl-β-D-galactoside
kb.....	kilobases
LFS.....	syndrome de Li-Fraumeni
BM.....	bleu de méthylène
MMS.....	méthyl méthanesulfonate
NER.....	réparation par excision de nucléotides
pb.....	paire de bases
SOD.....	superoxyde dismutase
T.....	thymine
UV.....	ultraviolets
UVA.....	ultraviolets de type A (315-400 nm)
UVB.....	ultraviolets de type B (280-315 nm)
UVC.....	ultraviolets de type C (100-280 nm)
X-gal.....	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidase
XP.....	<i>xeroderma pigmentosum</i>
ROS.....	espèces réactives dérivées de l'oxygène

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1.1 Le cancer

Dans l'organisme humain, on retrouve constamment des cellules en division, et ce dans différents tissus. C'est à partir de ces mêmes cellules, qui possèdent le potentiel de se diviser, que peut se développer un cancer. Les agents cancérigènes peuvent intervenir de façon quasi irréversible pour modifier ou altérer la structure ou l'expression de certains gènes cellulaires et ainsi perturber le développement normal d'une cellule. Pour voir apparaître une tumeur, il faudra une succession d'événements, dans les cellules souches d'un tissu (Loeb, 1991).

De nos jours, le cancer est un sujet d'actualité et il est particulièrement présent dans le domaine de la recherche. Selon Statistiques Canada (1999), le cancer atteint plus d'un Canadien sur trois au cours de sa vie. Il s'agit même de la deuxième plus importante cause de mortalité. Ainsi, plusieurs sont sensibilisés sur l'importance des recherches en cancérologie.

#### 1.2 Gènes suppresseurs de cancer

La formation de tumeurs peut provenir d'un malfonctionnement dans le contrôle de la prolifération cellulaire ainsi que d'une modification dans les interactions entre les cellules et leur environnement (Marshall, 1991). Ces désordres sont soit provoqués par des lésions qui touchent certains gènes en particulier ou par la présence d'oncogènes activés, ceux-ci favorisant le développement tumoral. Dans le premier cas, il s'agit de gènes qui ont reçu le terme d'anti-oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs (Bishop, 1991). Ainsi, souvent dans le cas de

développement de tumeurs, il est possible d'identifier un ou des gènes qui sont en partie ou en totalité responsables du trouble. Les produits de ces gènes sont des protéines qui ont clairement un rôle à jouer dans la régulation de la croissance (Buchkovich et coll., 1990).

Un des plus importants suppresseurs de tumeurs est la protéine p53. C'est en 1979 qu'a été découverte la protéine p53, formant un complexe avec l'antigène grand T de SV40 dans des extraits cellulaires transformés par ce virus (Lane et Crawford, 1979; Linzer et Levine, 1979). Au début, p53 était considéré comme un oncogène parce qu'impliqué dans l'immortalisation et la transformation de certaines cellules (Eliyahu et coll., 1984; Jenkins et coll., 1984). Ce n'est que dix ans plus tard, soit en 1989, qu'on se rend compte que les clones de p53 utilisés par plusieurs groupes de recherche contiennent en réalité des mutations (Hinds et coll., 1989). Ainsi, c'est depuis ce temps que l'on considère p53 comme étant un gène suppresseur de tumeurs.

### 1.3 p53

Le gène de p53 fait présentement l'objet d'études très intensives, et ce pour des raisons évidentes. En effet, on retrouve des mutations dans le gène de p53 dans plus de 50% des cancers humains, et ce dans plus d'une cinquantaine de types cellulaires différents (Levine, 1997). Ainsi, dans la moitié des cancers humains, la protéine p53 est inactive ou tout simplement absente (Nigro et coll., 1989).

La majorité des mutations dans p53 semblent résulter en une perte de fonction. Ainsi, il s'agit de la perte d'activité de la protéine p53 sauvage en raison de différents dommages (Donehower et coll., 1992; Jacks et coll., 1994). Les mutations qui sont retrouvées dans le gène de p53 sont des mutations somatiques, le plus souvent faux-sens, et 40% d'entre elles sont localisées dans quelques points chauds. Des mutations non-sens et des délétions ont aussi été observées (Levine, 1997). Les mutations retrouvées semblent, dans certains cas, avoir une action dominante négative. C'est-à-dire que la présence de la protéine mutante nuit à l'activité de la protéine normale, car il y aurait formation de complexe entre protéines mutantes et sauvages (Herskowitz, 1987; Finlay et coll., 1989; Dittmer et coll., 1993). Il y a donc inactivation des protéines p53 sauvages, conférant un avantage à la croissance tumorale (Hann et Lane, 1995).

Cependant, certaines mutations faux-sens de p53 peuvent contribuer à la tumorigénèse par gain de fonction (Gualberto et coll., 1998). Un gain de fonction n'est pas simplement une perte de la fonction normale de la protéine sauvage, mais en plus, il y a apparition d'une nouvelle propriété. Ainsi, de nouvelles fonctions sont observables chez les mutants. Ce gain de fonction peut être observé par l'apparition d'un nouveau phénotype (Wolf et coll., 1984). L'expression du mutant favoriserait la transformation maligne et la progression tumorale (Eliyahu et coll., 1985; Iwamoto et coll., 1996). Ainsi, p53 mutant pourrait conférer un avantage de croissance en absence de la protéine sauvage. Ce nouveau phénotype pourrait être possible par une stimulation de l'expression de certains gènes par p53 mutant, par exemple l'activation du gène MDR1, dont l'expression est souvent retrouvée dans les cancers humains.(Chin et coll., 1992).

Il a été possible d'identifier un lien direct entre des mutations dans p53 et la formation de tumeurs, entre autres chez les gens atteints du syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Ce syndrome est une prédisposition héréditaire au cancer, qui peut provenir d'une transmission germinale d'un allèle muté de *p53* (Malkin et coll., 1990; Lomax et coll., 1997).

### 1.3.1 La protéine p53

Le produit du gène *p53* a été appelé le "gardien du génome". Ce gène est situé sur le bras court du chromosome 17. Il a une longueur de 20 kb et il contient 11 exons. La protéine est constituée de 393 acides aminés chez l'humain et a une demi-vie de 15 à 30 minutes (Soussi et coll., 1990). Bien que sa fonction exacte ne soit pas vraiment définie, il semble que p53 doit maintenir la stabilité du génome. En effet, il semble que p53 permette la réparation de dommages à l'ADN, en provoquant des arrêts du cycle cellulaire ou en menant à l'apoptose, si les dommages sont trop importants.

Différents mécanismes de protection des cellules par p53 ont été proposés. Il est cependant clair que p53 réagit aux signaux des cellules qui sont dans un environnement défavorable à leur croissance (Giaccia et Kastan, 1998). Les cellules qui sont déficientes en p53 sont d'ailleurs plus instables génétiquement, ce qui signifie que l'absence de p53 de type sauvage

augmente de façon importante la susceptibilité au développement de tumeurs spontanées, et ce, dès un très bas âge (Harvey et coll., 1993).

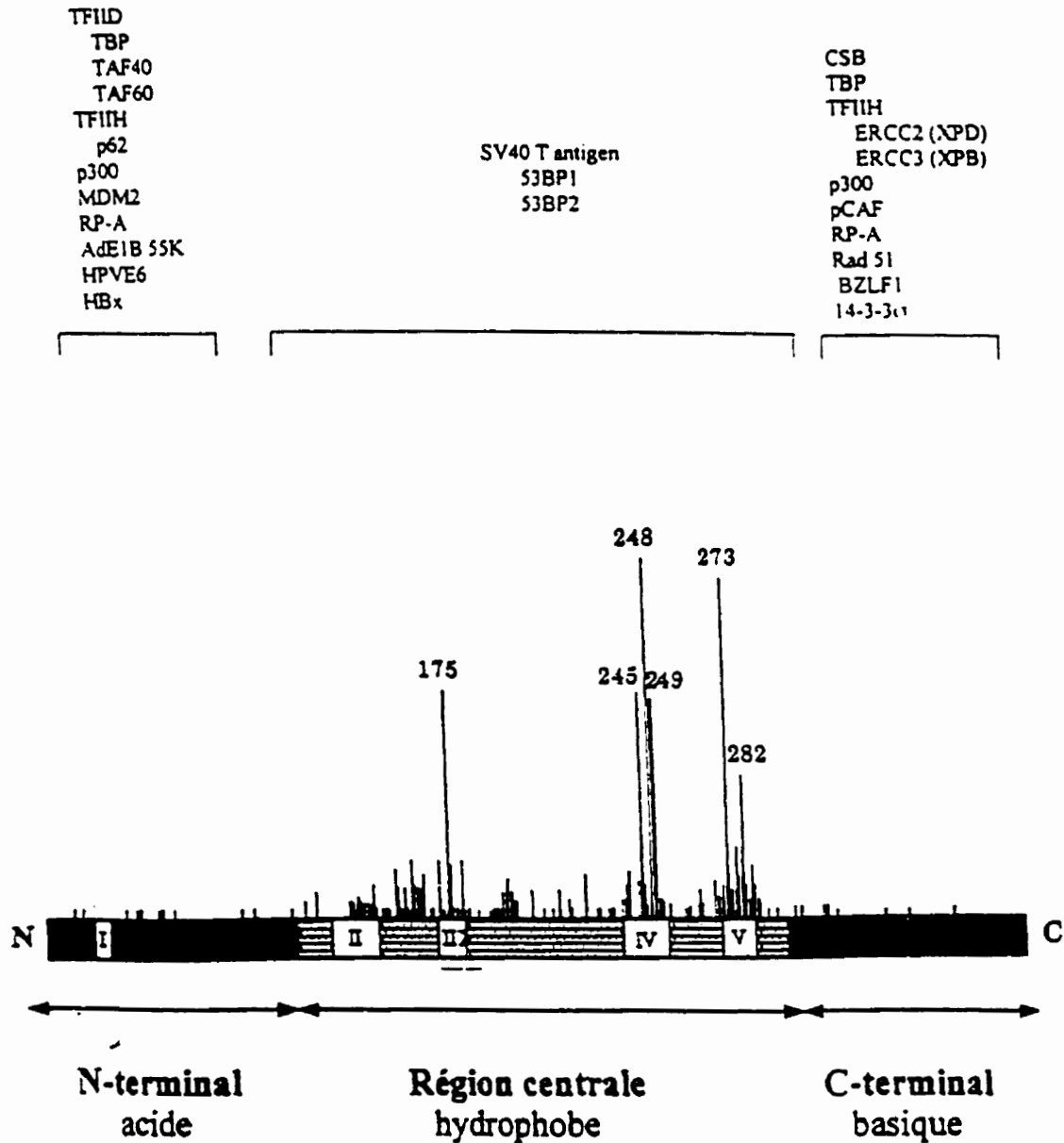
La protéine p53 d'environ 53 kD, est divisée en quatre domaines. Le premier, dans sa partie amino-terminale, est un domaine d'activation transcriptionnelle. Le second, dans la région centrale de la protéine, contient une séquence spécifique de liaison à l'ADN. Plus de 90% des mutations faux-sens dans le gène *p53* sont localisées dans cette région. Un troisième domaine est celui de l'oligomérisation de la protéine, donc permettant sa tétramérisation (Prives, 1998). C'est en effet sous forme de tétramère que p53 peut se lier à l'ADN (Friend, 1994). Enfin, un dernier domaine est celui en carboxy-terminal de la protéine. Il s'agit d'une région basique ayant été reconnue pour avoir plusieurs fonctions. En fait, ce domaine semble être un régulateur de l'apoptose (Wang et coll., 1996), et de la transcription (Wang et Prives, 1995) tout en permettant une reconnaissance des dommages à l'ADN. De plus, cette partie de la protéine semble agir comme régulateur négatif de la liaison de p53 à une séquence spécifique (Abarzua et coll., 1996). Ces domaines ainsi que les mutations les plus fréquemment retrouvées sur le gène de p53 sont représentés à la figure 1 (Ko et Prives, 1996).

C'est dans la partie centrale de la protéine p53, qui contient une séquence de liaison spécifique à l'ADN, qu'on retrouve les points chauds de mutation. Ces derniers sont situés dans des régions conservées au cours de l'évolution (Wong et coll., 1999). Ainsi, une mutation dans cette région du gène affecte la liaison de p53 à l'ADN, ce qui peut empêcher p53 d'activer la transcription de certains gènes importants pour le contrôle de la croissance cellulaire (Friend, 1994).

### **1.3.2 Liaison à p53**

p53 peut avoir des interactions fonctionnelles avec plusieurs protéines; tels des protéines virales, des produits d'oncogènes ou des facteurs de transcription (Levine, 1997). Jusqu'à ce jour, il y a de nombreuses interactions avec p53 qui ont été démontrées. Les différentes protéines qui peuvent se lier avec certains domaines de la protéine p53 sont indiquées à la figure 1 (May et May, 1999).





**Figure 1.** La protéine p53. Les trois régions de la protéine p53 et la distribution des mutations de p53 dans les tumeurs humaines. Les lignes verticales représentent les mutations et la hauteur indique leur fréquence. Les positions des acides aminés sont indiquées par les chiffres arabes. Les chiffres romains identifient les domaines hautement conservés durant l'évolution (Ko et Prives, 1996). Au dessus du schéma sont présentées les différentes protéines qui peuvent avoir des interactions avec certains domaines de p53 (May et May, 1999).

Une des interactions les plus importantes de p53 est celle avec Mdm2, une protéine de 90 kD, produit du gène *mdm2*. Il a en effet été démontré qu'il existe une interaction entre les protéines p53 et Mdm2. Mdm2 est considérée comme un régulateur de l'activité transcriptionnelle de p53 étant donné qu'elle se fixe de façon spécifique sur sa partie aminoterminal, pouvant à la fois empêcher son activité transcriptionnelle et mener à sa dégradation (Kubbutat et coll., 1997). La région de p53 qui se lie à Mdm2 est un segment hautement conservé, situé à l'intérieur de la région d'activation transcriptionnelle et qui contient des sites de phosphorylation (Prives, 1998). Selon de récentes études (Maki, 1999), il faudrait obligatoirement qu'il y ait oligomérisation de p53 pour que sa liaison à Mdm2 soit possible.

Mdm2 est le composant le plus important dans la régulation de la dégradation de p53. C'est par la voie de l'ubiquitine que se produit cette dégradation. Il a d'ailleurs été démontré qu'il y avait augmentation du niveau de p53 dans les cellules ayant un mauvais fonctionnement de cette voie (Agarwal et coll., 1998). Mdm2, en plus d'aider au passage de p53 du noyau au cytoplasme, où aura lieu la dégradation (Roth et coll., 1998) permettra l'ubiquitination de p53 (Honda et coll., 1997). Cette ubiquitination, qui est l'attachement des ubiquitines à une protéine pour engendrer sa dégradation, dépend de trois activités : E1, une enzyme activatrice de l'ubiquitine, E2, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine et enfin E3, une ligase d'ubiquitine. C'est cette dernière activité qui serait fournie par Mdm2, dans le cas de la dégradation de la protéine p53. Par la suite, la protéine polyubiquitinée sera reconnue et dégradée par les protéasomes (Varshavsky, 1997).

Il a été démontré qu'il y a une amplification de *mdm-2* dans certains cancers où p53 ne possède aucune mutation (Lane 1992). En fait, dans une tumeur, lorsque la protéine p53 est normale, il y a fréquemment une augmentation de Mdm-2, ce qui augmente la séquestration de p53, empêchant ainsi son activité. Ce phénomène est retrouvé dans 30 à 40% des sarcomes humains (Oliner et coll., 1992).

### 1.3.3 Activation de p53

Dans une cellule ayant des dommages à son ADN, p53 semble jouer un rôle déterminant. En fait, la protéine p53 est présente en petite quantité dans la cellule normale, probablement sous sa forme latente, mais lorsqu'il y a des dommages à l'ADN, p53 est stabilisée et activée; sa quantité augmente rapidement, en quelques minutes. Une grande variété de conditions mèneraient à cette induction rapide de p53, soit divers types de stress comme la présence de dommages à l'ADN, des conditions d'oxydo-réduction, l'activation d'oncogènes, l'hypoxie, des changements de pH ou de température ou par glycosylation, phosphorylation ou acétylation (Pietenpol et Vogelstein, 1993; Agarwal et coll, 1998).

Ainsi, lors d'une réponse au stress, il y a d'abord une stabilisation de p53. Puisque normalement, dans la cellule, la dégradation de p53 se fait de façon rapide et que cette dégradation est contrôlée en large partie par Mdm2, la stabilisation de p53 devra impliquer un mécanisme de protection de p53 contre Mdm2 (Levine, 1997).

La stabilisation de p53 peut être possible par différentes modifications covalentes de la protéine. Il peut tout d'abord y avoir phosphorylation de p53, ce qui représente la voie de protection la mieux connue. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés et différentes kinases peuvent y être impliquées (Prives, 1998). Entre autres, pour les sites dans la partie amino-terminale de p53, la protéine du gène de l'ataxia telangectasia, ainsi que celles qui y sont reliées, la protéine kinase activatrice de l'ADN, la kinase N-terminal Jun ainsi que la caséine kinase 1 ont été reconnues pour permettre la phosphorylation (Jayaraman et Prives, 1999). Cette phosphorylation, empêche la liaison avec Mdm2 (Kussie et coll., 1996). La stabilisation n'est pas seulement possible par modification de p53, mais aussi de Mdm2. En effet, il peut y avoir phosphorylation de Mdm2, empêchant ici aussi son interaction avec p53 (Mayo et coll., 1997).

La phosphorylation peut, en plus de stabiliser la protéine p53, l'activer. En effet, c'est particulièrement dans la région carboxy-terminale de la protéine qu'on retrouve des sites potentiels de phosphorylation, qui permettraient une augmentation de la liaison à l'ADN par p53. Il semble que la partie carboxy-terminale serait très fortement basique, ce qui contrôlerait

négativement l'activité de la région du domaine de liaison à l'ADN située au centre de la protéine. La phosphorylation viendrait donc gouverner l'habileté de p53 à se lier à une séquence spécifique d'ADN et on peut donc parler d'activation de la protéine (Prives, 1998). Les kinases connues pour modifier p53 en C-terminal sont entre autres, les kinase cycline-dépendantes, la caséine kinase 2, la protéine kinase, le facteur de transcription IIIH ainsi que p300 et la protéine de liaison CREB (Meek, 1999).

L'activation de p53 par augmentation de sa liaison à l'ADN est aussi possible par acétylation, une autre modification post-traductionnelle qui a un rôle semblable à celui de la phosphorylation (Gu et Roeder, 1997). Des cas de glycosylation ont aussi été rapportés pour l'activation de p53 (Shaw et coll., 1996).

Il existe d'autres mécanismes de stabilisation et d'activation de p53, comme des interactions protéine-protéine. Par exemple, en présence d'oncogènes activés tel Myc, Ras et E1A, qui favorisent la transformation, l'habileté de Mdm2 à conduire p53 à la dégradation peut être modulée par la protéine ARF, qui est entre autre activée en présence de ces oncogènes (Zhang, 1998). L'ARF est codée par le locus INK4a/ARF, qui par épissage alternatif peut donner deux protéines distinctes, soit p16<sup>Ink4a</sup> (un inhibiteur de cycline) ou p19<sup>ARF</sup> (p14<sup>ARF</sup> chez l'humain) (Sherr, 1998). L'ARF se lie à Mdm2 non pas pour empêcher sa liaison à p53, mais plutôt pour prévenir la dégradation de p53. Ceci serait possible par blocage de l'activité E3 ligase de Mdm2 (Honda et Yasuda, 1999).

Ainsi, plusieurs voies peuvent mener à une activation de p53 et il semblerait que celle empruntée dépendrait du type cellulaire, du type de stress ainsi que du stade du cycle cellulaire de la cellule (Giaccia et Kastan, 1998). Une fois activé, p53 peut intervenir de différentes manières dans la cellule. En effet, il pourra permettre la transcription de nombreux gènes qui sont impliqués soit dans la régulation du cycle cellulaire (section 1.4), dans l'apoptose (section 1.5), dans la réparation des dommages à l'ADN (section 1.8) (Agarwal et coll., 1998), dans la différenciation (Rotter et coll., 1994), dans la sénescence (Wynford-Thomas, 1999) et dans l'angiogénèse (Vojta et Barrett, 1995).

### 1.3.4 p53 chez la souris

Plusieurs groupes de recherche ont comparé l'incidence des tumeurs spontanées retrouvées chez des souris *p53*<sup>-/-</sup> et *p53*<sup>+/+</sup> (Harvey et coll., 1993; Harvey et coll., 1995). Ils ont ainsi démontré l'importance de l'absence de *p53* dans le développement de tumeurs. Par contre, la protéine *p53* n'est pas indispensable pour la croissance, la différenciation et le développement embryonnaire. Ainsi, des souris *p53*<sup>-/-</sup> se développent normalement. Elles sont cependant sujettes à la formation de tumeurs spontanées et notamment au développement de lymphomes (Harvey et coll., 1993). On remarque donc une incidence élevée de tumeurs dans ces souris et un haut degré d'aneuploïdie (Lane, 1992). Chez les souris hétérozygotes *p53* (*-/+*), on retrouve une plus grande incidence de tumeurs spontanées que chez les homozygotes sauvages (Harvey et coll., 1993).

### 1.3.5 Homologues à p53

La famille de la protéine *p53* inclut d'autres membres, dont deux homologues principaux (Kaelin W.G.Jr., 1998). Ces homologues sont *p73* (Kaghad M. et coll., 1997) et *p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET* (Osada M. et coll., 1998).

La séquence primaire de *p73* a une grande similarité avec celle de *p53*, plus particulièrement dans la région correspondant au domaine de liaison à l'ADN de *p53*. De plus, *p73* peut activer les promoteurs qui répondent à *p53* ainsi qu'induire l'apoptose, dans certaines cellules. Les isoformes de *p73* (*p73* $\alpha$  et *p73* $\beta$ ) peuvent tous deux induire un arrêt de croissance permanent (Fang et coll., 1999). Le rôle de *p73* dans la transformation n'est cependant pas encore élucidé (Peters et coll., 1999).

Dans certains cancers il a été possible d'observer une augmentation du niveau de *p73*, mais sans corrélation avec des altérations du gène *p53* (Tokuchi et coll., 1999). De plus, il a été proposé que la boucle d'autorégulation entre *p53* et *mdm2* contrôle aussi l'activité de *p73*. En effet, *mdm2* pourrait réduire l'activité de *p73*, mais sans permettre la dégradation de la protéine.

Cette dégradation par mdm2 étant unique à p53 (Dobbelstein et coll., 1999). Enfin, même si p73 aurait une habileté comparable à p53 pour supprimer la croissance cellulaire, son induction serait gouvernée de manière différente à p53 (Fang et coll., 1999).

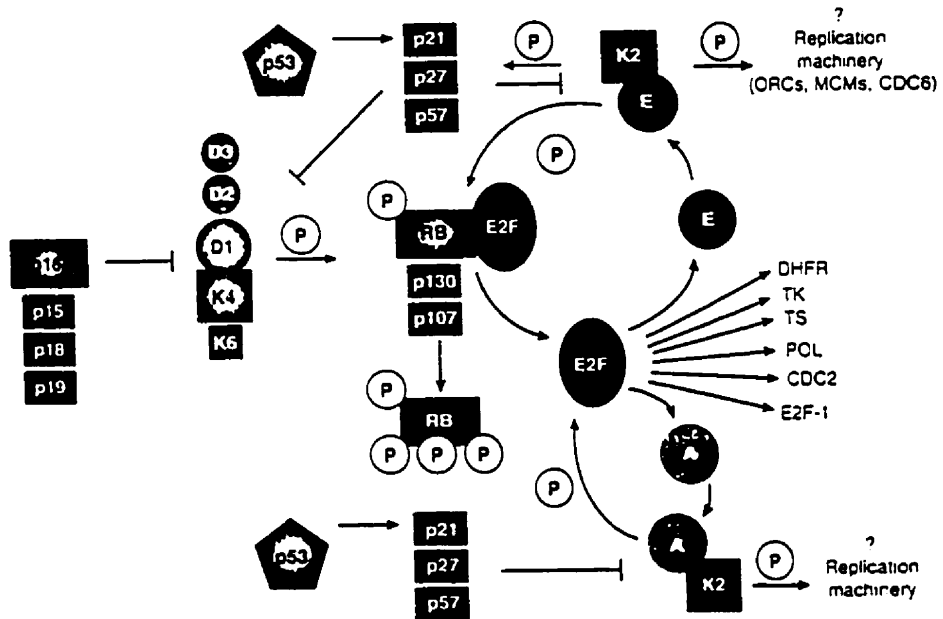
Pour ce qui est du gène *p63 p73L p51 p40 CUSP KET*, il a été identifié comme homologue à p53 un peu après p73. Ici aussi, il a été suggéré que la protéine du gène p63 n'interviendrait pas dans la même voie que p53 dans son rôle de suppresseur tumoral (Hagiwara et coll., 1999). Il pourrait cependant y avoir certains croisements dans ces voies, p63 pouvant activer des gènes cibles de p53, à un degré différent (Shimada et coll., 1999).

Ainsi, ces deux homologues de p53 peuvent avoir les mêmes effets que p53, soit de permettre des arrêts du cycle ou d'induire l'apoptose. Cependant, des mutations dans les gènes p73 et p63 dans des tumeurs ont rarement été retrouvées (Fang et coll., 1999; Hagiwara et coll., 1999).

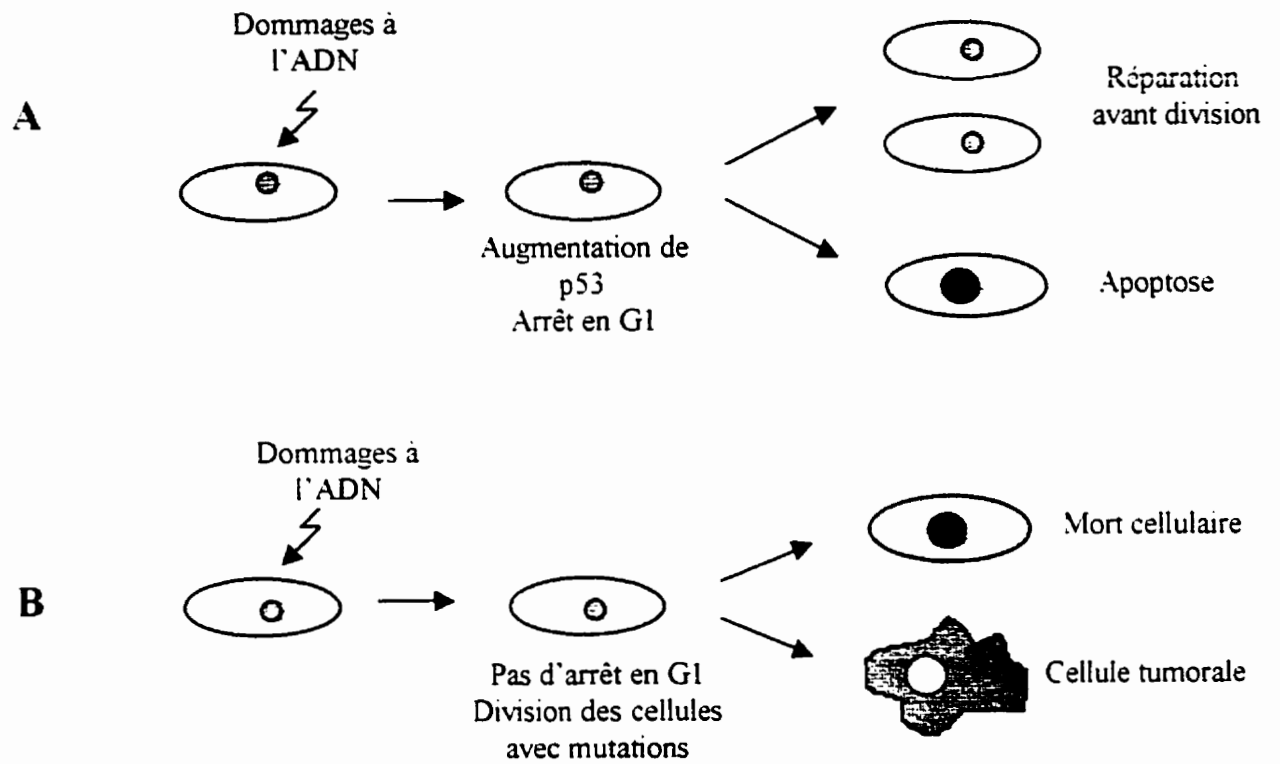
#### **1.4. Régulation du cycle cellulaire**

Plusieurs composants interviennent à différents endroits dans le cycle cellulaire. La figure 2 présente un aperçu des multiples interactions qu'on y retrouve (Sherr, 1996). p53 a un rôle important dans le contrôle de ce cycle.

En effet, il a été démontré qu'une grande quantité de p53 peut mener à un arrêt du cycle cellulaire en G1. Selon le modèle proposé par Lane en 1992, cette pause pourrait permettre la réparation de l'ADN avant la prochaine division ou mener la cellule à l'apoptose. Si la protéine p53 est inactive dans une cellule ayant subi des dommages à son ADN, il ne pourra pas y avoir d'arrêt en G1. La division ne sera donc pas retardée, ce qui pourra donner deux cellules avec des anomalies, pouvant mener à un cancer, ou encore à une mort de la cellule, si les dommages sont trop importants. La figure 3 représente l'influence de p53 sur la division cellulaire, selon le modèle de Lane de 1992.



**Figure 2.** Points de contrôle du cycle cellulaire. p53 contrôle l'activité de p21 qui inhibe la phosphorylation et l'activation de différentes cyclines. Rb ne sera donc plus phosphorylé, donc restera associé à E2F, ce dernier étant un facteur de transcription nécessaire pour le passage en phase S. Ainsi, il y aura arrêt du cycle en G1. (d'après Sherr, 1996).



**Figure 3.** Représentation schématique du modèle de Lane (1992) qui suggère que la protéine p53 serait le gardien du génome. A) Dans une cellule normale et B) dans une cellule sans p53



On peut résumer la voie qui débute avec p53 et qui mène à un arrêt du cycle cellulaire de cette façon : p53 est activé en réponse à certains dommages à l'ADN et la protéine contrôle l'activité de p21. Cette dernière inhibe la phosphorylation et l'activation des cyclines (cdk2, cdkD, cdkE) lorsque présente en grande quantité. p21 se liera par la suite à certaines cyclines ou à certains complexes Cdk, ainsi qu'au PCNA, tout cela pour arrêter la réplication de l'ADN. Ces cyclines ne peuvent donc plus agir sur la protéine Rb. Il y a donc une accumulation de Rb hypophosphorylée, qui ne pourra pas être dissociée de E2F. Ce dernier est un facteur de transcription qui est nécessaire pour passer en phase S. C'est tout cela qui provoque l'arrêt en G1 (Ko et Prives, 1996 ; Amundson et coll., 1998).

La voie p53-Rb est donc celle qui gouverne le cycle cellulaire. En plus de permettre un arrêt du cycle cellulaire en G1, p53 a été impliqué dans des arrêts en G2 (Taylor et coll., 1999). En effet, p53 veille à la bonne formation du fuseau mitotique et contrôle le nombre de centrosomes (Levine, 1997). L'arrêt durant la transition G2-M est donc aussi possible, et ce, en particulier, lorsque la synthèse de l'ADN n'a pu être complétée. Enfin, p53 peut aussi agir sur le cycle cellulaire par un autre arrêt, celui-ci en G0 (Levine, 1997). Ces arrêts peuvent être réversibles ou non, selon la capacité de la cellule à réparer les dommages présents. La formation de tumeurs pourrait provenir d'une incapacité à arrêter la croissance cellulaire pour la réparation des dommages, donc menant à un haut taux de mutations. Cette incapacité peut provenir de l'inactivation d'un composant situé soit en aval ou en amont de p53 (Agarwal et coll., 1998).

### **1.5 Apoptose provoquée par p53**

L'activation de p53 peut, plutôt que de permettre un arrêt du cycle cellulaire, mener à l'apoptose. En effet, p53 peut mener certaines cellules à une mort programmée, et ce en nécessitant ou non une activation transcriptionnelle. En effet, pour que l'apoptose soit possible, p53 peut agir par activation transcriptionnelle, par des interactions directes protéine-protéine ou en utilisant les deux façons (Levine, 1997).

Les stimulus pouvant donner lieu à une apoptose dépendante de p53 peuvent être des dommages à l'ADN, l'absence de facteurs de croissance, l'expression d'oncogènes viraux ou

cellulaires (Myc, E1A) et l'absence d'un suppresseur de tumeurs important. Certains signaux peuvent toutefois bloquer cette voie menant à la mort cellulaire (Agarwal et coll., 1998).

L'apoptose par p53 peut impliquer divers mécanismes qui pourront entre autres affecter le contrôle de l'intégrité des mitochondries et permettre l'expression des récepteurs de mort cellulaire. Une des principales voies connues menant à l'apoptose est celle impliquant les caspases. Dans le cas de l'apoptose dépendante de p53, il y aurait activation de ces protéases, mais ses détails ne sont pas connus (Dragovich et coll., 1998). Les caspases sont en fait des protéases à cystéine. Jusqu'à ce jour, 14 ont été identifiées chez les mammifères. Les changements qui sont observés lors du déclenchement de l'apoptose dans la cellule sont des coupures de l'ADN, la condensation de la chromatine, la perte du potentiel de la membrane mitochondriale ou des changements dans celle-ci et la formation de corps apoptotiques (Green et Kroemer, 1998; Baker et Reddy, 1998).

De récentes études (Lassus et coll., 1999) ont démontré qu'un bas niveau de p53 aurait une activité anti-apoptotique, mais lorsqu'il y aurait augmentation du niveau de p53, cette protection deviendrait plutôt un déclenchement de l'apoptose. Il semblerait de plus que l'activité anti-apoptotique aurait été retrouvée dans la partie carboxy-terminale de la protéine tandis que celle apoptotique aurait été identifiée du côté amino-terminale de p53. Ce serait en fait une région riche en proline de la partie N-terminale de la protéine qui serait requise pour l'apoptose médiée par p53 (Sakamuro et coll., 1997).

p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire ou une mort cellulaire. Mais qu'est-ce qui détermine le choix de p53 de mener seulement à un arrêt du cycle ou de plutôt opter pour l'apoptose? En fait, plusieurs facteurs entrent en ligne de compte, soit : le type cellulaire et le contexte cellulaire, l'importance des dommages à l'ADN (donc selon les changements génétiques), le niveau de p53, les modulations dans la voie de signalisation de p53, la présence de certains facteurs de croissance et l'activation d'oncogènes (Agarwal et coll., 1998; Amundson et coll., 1998). De plus, certains gènes, dont la transcription dépend de p53, peuvent aussi influencer la décision de la cellule à suivre la voie de l'apoptose, entre autres les protéines pro-

apoptotiques ou anti-apoptotiques (Levine, 1997; Agarwal et coll., 1998). Ainsi, cette régulation est médiée par une variété de protéines virales et cellulaires (Sionov et Haupt, 1999).

## **1.6 Mutations**

Le rôle de p53 dans la protection du génome a été démontré pour certains d'instabilité génétique, soit pour les amplifications (Livingstone et coll., 1992), les aberrations chromosomiques (Bouffler et coll., 1995), l'aneuploïdie et la polyploïdie (Cross et coll., 1995 ; Rotter et coll., 1993). Il reste cependant beaucoup de travail à faire en ce qui concerne l'influence de p53 sur les mutations ponctuelles.

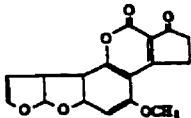
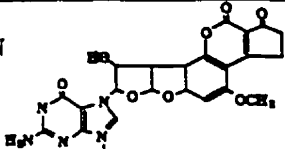
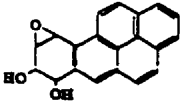
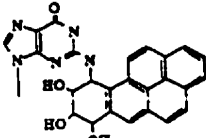
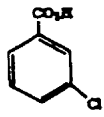
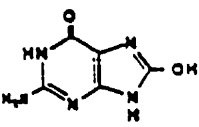
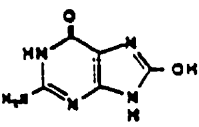
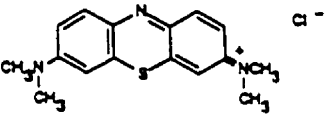
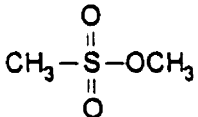
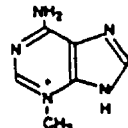
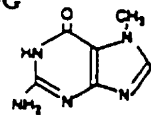


La plupart des expériences qui ont porté sur l'effet de p53 sur la fréquence des mutations ponctuelles utilisaient les radiations, principalement les ultraviolettes, pour endommager l'ADN. Dans le cas de mutations ponctuelles causées par les ultraviolets, on retrouve beaucoup de controverse à savoir si oui ou non p53 a un effet. Plus de détails sur ces expérimentations seront présentés dans la partie 1.7.2 portant sur les ultraviolets. Il faut prendre en considération que les systèmes utilisés pour étudier la mutagenèse sont variés. Ces divers systèmes n'offrent pas tous les mêmes possibilités et sont faits dans des conditions qui se rapprochent plus ou moins de celles retrouvées dans la cellule. Ces différences peuvent donc expliquer, du moins en partie, la divergence des résultats.

Les agents mutagènes utilisés dans la présente étude ainsi que ceux utilisés antérieurement au laboratoire sont définis dans les sections qui suivent et le tableau 1 les présente, les dommages les plus importants qu'ils provoquent ainsi que leur structure.

## **1.7 Les agents mutagènes**

Il existe une myriade d'agents mutagènes qui peuvent causer des lésions dans l'ADN. Les agents mutagènes peuvent être classés dans deux groupes, soit physique ou chimique. Les agents physiques regroupent les différents types de radiations pouvant provoquer des bris dans l'ADN,

**Tableau 1.** Agents utilisés pour la mutagenèse avec les principaux dommages qu'ils provoquent sur l'ADN ainsi que leur structure.

Produits	Dommages à l'ADN <sup>a</sup>
AFB1 	Dommages oxydatifs Et adduits sur l'ADN 
BPDE 	Dommages oxydatifs Et adduits sur l'ADN 
CPBA 	Dommages oxydatifs Principalement le 8-oxoG 
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  HOOH	
BM 	
UVA  Longueurs d'onde de 315 à 400 nm	
MMS 	N3-meA  N3-meG 
UVC  Longueurs d'onde de 100 à 280 nm	Dimères de pyrimidines: Anneau cyclobutyle  Photoproduit 6-4 

<sup>a</sup>Ce sont les principaux dommages causés à l'ADN qui sont cités ici.

comme les rayons X qui provoquent principalement des cassures mono ou bicaténares sur l'ADN et les ultraviolets qui vont plutôt former des liaisons entre les bases. Pour leur part, les agents chimiques sont nombreux et ils peuvent être soit d'origine naturelle ou industrielle. Les dommages à l'ADN causés par des agents chimiques sont de différents types, comme par exemple des bases modifiées, des adduits, des méthylations ou des oxydations (Friedberg, 1995).

Dans le cadre de ce mémoire, quatre agents ont été à l'étude, soit un de type physique, les ultraviolets de type A (UVA) et trois chimiques; le bleu de méthylène (BM), le méthyl méthanesulfonate (MMS) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces expérimentations font suite aux études précédentes (Courtemanche et Anderson, 1999) qui portaient sur quatre autres agents, soit les ultraviolets de type C (UVC) ainsi que l'aflatoxine B1 (AFB1), le 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrène (BPDE) et l'acide méta-chloroperoxybenzoïque (CPBA).

### 1.7.1 Le BM

Le BM et la lumière en présence d'oxygène causent des dommages à l'ADN. Parmi ces dommages, on retrouve entre autres la formation du 8-hydroxyguanine (8-oxo-G) et de façon moins importante, des coupures simple-brin à l'ADN (17 fois moins fréquent que le 8-oxo-G) (Schneider et coll., 1990).

Le 8-oxoG est une base oxydée. Il s'agit en fait d'une lésion oxydative très abondante, étant la plus fréquente parmi la centaine de types qui peuvent être retrouvées sur l'ADN endogène des mammifères (Ames, 1989). Le 8-oxoG est une lésion prémutationnelle qui peut provoquer une mutation lors de la réparation ou de la réplication de l'ADN. Durant la réplication de l'ADN, il y a mauvais appariement du 8-oxoG avec l'adénine principalement ce qui résulte en une mutation de transversion (Brash, 1997 ; Croteau et Bohr, 1997). La base modifiée est facilement copiée par les ADN polymérases (Grollman et Moriya, 1993).

En fait, l'exposition à la lumière en présence de BM génère en premier lieu des dommages par l'intermédiaire de l'oxygène singulet (Wiseman et Halliwell, 1996). L'oxygène singulet réagit directement avec l'ADN. Il existe par contre des enzymes qui permettent d'éviter l'accumulation des transversions de G vers T, induites par la présence du 8-oxoG dans l'ADN oxydé (Boiteux et Radicella, 1998). Chez les bactéries, deux enzymes coopèrent pour diminuer ces transversions, soit la protéine Fpg (8-oxoG ADN glycosylase), et une autre, selon l'appariement avec la base modifiée. Il peut s'agir de la protéine mutY (adénine ADN glycosylase), mutM (pour la cytosine) ou mutT (pour le nucléoside monophosphate) (Beckman et Ames, 1997). Ce sont toutes des enzymes de réparation. Chez les eucaryotes simples, c'est la protéine du gène *yOGGI* qui permet l'excision de la 8-oxoG (Van der Kemp et coll., 1996). Chez l'humain, le catalyseur pour cette réaction est la protéine hOgg1. La protéine de la levure est identique à 37% à l'humaine, comparativement à celle de la souris qui s'apparente à 84% à celle humaine (Radicella et coll., 1997).

### 1.7.2 Les UV

Tout d'abord, les UV sont divisés en 3 groupes, les UVA ( avec des longueurs d'onde de 315 à 400 nm), les UVB (280-315 nm) et enfin les UVC (100-280 nm), et ils causent différents types de cancers de la peau dont les principaux sont le mélanome, le cancer basocellulaire (BCC) et le cancer spinocellulaire (SCC) (Brash, 1997). Ce sont les UVC qui sont les plus mutagènes, mais heureusement pour nous les humains, ces rayons sont en grande partie arrêtés par l'atmosphère. Nous sommes donc plus exposés aux UVA et aux UVB (Tyrrell, 1996).

Les UVA vont générer des intermédiaires oxydatifs qui peuvent causer des bris dans l'ADN ainsi que des translocations chromosomiques (Madhani et coll., 1986). Pour leur part, les UVC produisent des photoproduits sur l'ADN, dont les plus fréquents sont les dimères de pyrimidines et les photoproduits 6-4 (Bohr et coll., 1985) Les photoproduits causent principalement des transitions de C vers T, résultant, pendant la réplication de l'ADN, en une incorporation d'une A en face de la lésion (Brash, 1997). Enfin, les UVB sont en quelque sorte

intermédiaires, causant ces deux types de dommages, et il semble que ce soit eux les principaux responsables des cancers humains (Tyrrell, 1996).

Beaucoup d'études ont utilisé les UV comme agents mutagènes, pour étudier la mutagenèse, la réparation de l'ADN et la cancérogénèse. Il s'agit en fait d'un agent facile d'utilisation, qui peut servir à irradier directement l'ADN ou les cellules, sans nécessité de conditions très strictes. Son utilisation fréquente vient aussi de son importance dans la cancérogénèse humaine.

Différents groupes de recherche ont utilisé les UVC pour observer l'influence de p53 sur les mutations provoquées par cet agent. Les résultats obtenus sont cependant plutôt variables. Entre autres, Yamaizumi et Sugano (1994) ont démontré que l'irradiation par les UVC de fibroblastes humains provoquait une accumulation nucléaire de p53, ce qui amenait à proposer l'implication de p53 dans la réparation des dommages causés. Ces résultats ont été appuyés par Yamagishi (1997) qui observait une diminution des mutations dans le gène HPRT de cellules d'ostéosarcomes humains et dans le gène *supF* (section 1.11.3) du plasmide pMY189 traités aux UVC, après induction de p53.

Cependant, d'autres études, celles-là d'Ishizaki et coll. (1996) donnaient des résultats contradictoires. En effet, ce groupe de recherche a utilisé le vecteur navette pYZ289, contenant le gène *supF* (voir section 1.11.3), qu'il a exposé aux UVC avant de le transférer dans des fibroblastes de souris p53 positives ou p53 négatives. Ils ont retrouvé une fréquence de mutation identique dans les deux types cellulaires, ce qui laissait supposer que p53 n'avait pas d'influence sur les mutations ponctuelles causées par les UVC. Les résultats obtenus dans notre laboratoire appuient cette dernière hypothèse, et ce par des études faites dans un système semblable, la différence étant que les cellules utilisées ici sont déficientes en p53. Ainsi, la présence de p53 ne provient pas d'une expression d'un gène endogène, mais vient plutôt de la cotransfection de son vecteur d'expression (Courtemanche et Anderson, 1999).

Il est donc difficile d'en venir à un consensus en ce qui concerne l'influence de p53 sur les mutations causées par les UVC. Il ne faut cependant pas oublier de considérer les divergences dans les méthodes utilisées.

De par son importance dans le contrôle de la stabilité génomique, et malgré les différents résultats obtenus, il n'est pas surprenant de constater que *p53* est souvent muté dans les cancers de la peau (Moshinsky et Wogan, 1997). Cependant, d'autres gènes peuvent être mutés dans ce type de cancer, entre autres, ceux impliqués dans le fonctionnement de la réparation par excision de nucléotides (NER) (Sarasin, 1999) qui seront abordés dans la section 1.8 consacrée à la réparation de l'ADN.

### 1.7.3 Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est généré intracellulairement, par exemple durant la biotransformation de xénobiotiques et peut aussi être le résultat d'une exposition d'un agent physique externe comme les radiations UVA (320-380 nm). Ce sont en fait les orbitales non-pairées du dioxygène qui accommodent des électrons pour mener à la formation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tout comme à celle de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), du radical hydroxyl (HO<sup>•</sup>) et de l'eau (H<sub>2</sub>O) (Henle et Linn, 1997).

Les dommages prémutationnels du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seraient le résultat de l'attaque directe par le radical HO<sup>•</sup> généré par une réaction appelée "réaction de Fenton". En fait, c'est que les métaux de transition peuvent réagir avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire de forts oxydants, le principal étant le radical HO<sup>•</sup> (Moraes et coll., 1989). En 1894, Fenton a décrit ce type de réaction basée sur l'oxydation de l'acide tartarique par le Fe<sup>2+</sup> et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Henle et Linn, 1999). Ainsi, une bonne portion de la létalité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provient de dommages à l'ADN causés par des oxydants générés à partir des réactions de Fenton (Mello-Filho et Meneghini, 1991).

Pour que le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoque des mutations, il faut qu'il soit en présence d'ions métalliques et de EDTA (Moraes et coll., 1989). L'exposition de l'ADN ou d'une culture cellulaire au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'ions métalliques aurait pour principale cible les résidus de la guanine (Rodriguez



et coll., 1997). Ces mutations seraient à 94% des changements de une ou deux paires de bases (Moraes et coll., 1989).

#### **1.7.4 Le CPBA**

Le CPBA est un oxydant organique. Dans certaines études, le CPBA est utilisé comme activateur in vitro, oxydant certains agents tel l'AFB1 (Jacobsen et Humayun, 1986; Mariën et coll., 1987). Il a cependant été remarqué que le CPBA lui même, peut endommager l'ADN. Ainsi, dans le cas d'études de mutagenèse, il est important de faire l'activation chimique de l'agent promutagénique préalablement à la mise en contact avec l'ADN (Jacobsen et Humayun, 1986).

Il a été démontré, dans certaines analyses de blocage de la réplication de l'ADN, qu'un traitement au CPBA provoquait des modifications de certaines bases. Plus précisément, ces bases seraient les A et les G non-appariées (Jacobsen et Humayun, 1986). D'autres expérimentations ont porté sur l'inactivation de façon irréversible de certains enzymes peroxydases (Rodriguez-Lopez et coll., 1997). On parle même du CPBA comme étant un promoteur tumoral (Gimenez-Conti et coll., 1991).

#### **1.7.5 Le BPDE**

L'exposition à la fumée de cigarette est un important facteur de risque au cancer du poumon. Parmi les composants de la cigarette, les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont très fortement impliqués dans cette toxicité (Hecht et coll., 1993). Un de ses composés, qui est de loin le plus étudié, est le benzo[*a*]pyrène dont on retrouve de 20 à 40 ng par cigarette dans laquelle il est l'un des plus importants agents potentiellement mutagènes et carcinogènes. Cependant, pour être cancérigène, le benzo[*a*]pyrène requière une activation métabolique pour produire un de ses métabolites : le BPDE (Friedberg et coll., 1995). In vivo, cette activation peut être possible grâce aux cytochromes P450 et aux époxyde hydrolases. Le BPDE se lie de façon covalente à l'ADN pour former un adduit en position N2 de la guanine (Friedberg et coll., 1995).

Une grande proportion des mutations provoquées par le BPDE sont des transversions de G vers T (Wei et coll., 1991; Cherpillod et Amstad, 1995).

### 1.7.6 L'AFB1

L'AFB1 est une mycotoxine, un produit naturel d'*Aspergillus flavus*, retrouvée comme contaminant dans des produits de récolte, par exemple sur les arachides entreposées dans des endroits humides. L'AFB1 est hépatotoxique chez plusieurs espèces animales et est un important agent étiologique du cancer du foie humain (Chu, 1991). Il y a, particulièrement en Asie et en Afrique, une grande incidence de carcinomes hépatocellulaires reliés à la consommation d'aliments contaminés avec de l'AFB1 (Hollstein et coll., 1991; Ozturk, 1991).

Pour être réactive, l'AFB1 doit être activée en son métabolite réactif, l'AFB1-8,9-époxyde, qui pourra se lier à l'ADN pour ainsi donner l'adduit AFB1-ADN (Garner, 1973; Eaton et Gallagher, 1994). L'AFB1 peut-être activée par certains cytochromes P450 (Aoyama et coll., 1990) mais aussi par des oxydants chimiques comme le CPBA (Marien et coll., 1987).

L'adduit sur l'ADN se fera préférentiellement en position N-7 de la guanine (Lin et coll., 1977; Guengerich et Shimada, 1991). En effet, dans le cas de carcinomes du foie dus à l'AFB1, il a été démontré que l'adduit majeur retrouvé sur l'ADN est le 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxyafatoxine B<sub>1</sub> (AFB1-N7-Gua) (Bailey et coll., 1996). La substitution de base qui s'en suit serait, tout comme pour le BPDE, presque exclusivement une transversion de G vers T (Foster et coll., 1983; Trottier et coll., 1992). Il a aussi été démontré que l'AFB1 pouvait augmenter la quantité de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OhdG) dans l'ADN hépatique de rat, donc de causer des dommages oxydatifs impliquant le radical HO<sup>•</sup> (Shen et coll., 1995).

### 1.7.7 Le MMS

Le MMS est un agent alkylant qui a d'importants effets cytotoxiques et mutagènes et qui méthyle de façon prédominante les atomes de nitrogène dans les purines. Ces effets néfastes sont

ainsi dus à la production de certains dommages particuliers qui mèneront à la formation de sites abasiques promutagènes (Glaab et coll., 1999). Ces lésions sont principalement le N7-méthylguanine (N7-meG) et le N3-méthyladénine (N3-meA). Ce dernier est d'ailleurs le produit cytotoxique d'alkylation le plus fréquent. Une faible quantité de O6-méthylguanine (O6-meG) est aussi observée en présence de MMS (Karran et coll., 1980). En raison des dommages causés, le MMS induit principalement des transversions de A vers T ou encore de G vers T sur l'ADN (Sledziowska-Gøjska and Janion, 1989)

Il a été démontré que la présence de MMS dans la cellule induit une accumulation du niveau de p53 et qu'il y a augmentation des cellules en apoptose avec une hausse de la quantité d'agent (Jiang et coll., 1999).

### **1.8 Réparation de l'ADN**

Les deux principaux mécanismes de réparation de l'ADN chez les mammifères sont la réparation par excision de nucléotides (NER) et la réparation par excision de bases (BER). La NER est un mécanisme qui peut agir sur des lésions causées par certains agents mutagènes chimiques, mais principalement sur celles provoquées par les UV (Fridberg et coll., 1995; De Laat et coll., 1999). La NER sert à maintenir l'intégrité génomique et prévient ainsi la formation du cancer. En effet, le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une forme familiale de prédisposition au cancer, où des gènes de la NER sont mutés, causant une hypersensibilité aux UV (Sarasin, 1999). Il existe aussi d'autres maladies, comme la trichothiodystrophie et le syndrome de Cockayne, où ce sont aussi des composants de la NER qui sont affectés (Tornaletti et Pfeifer, 1996).

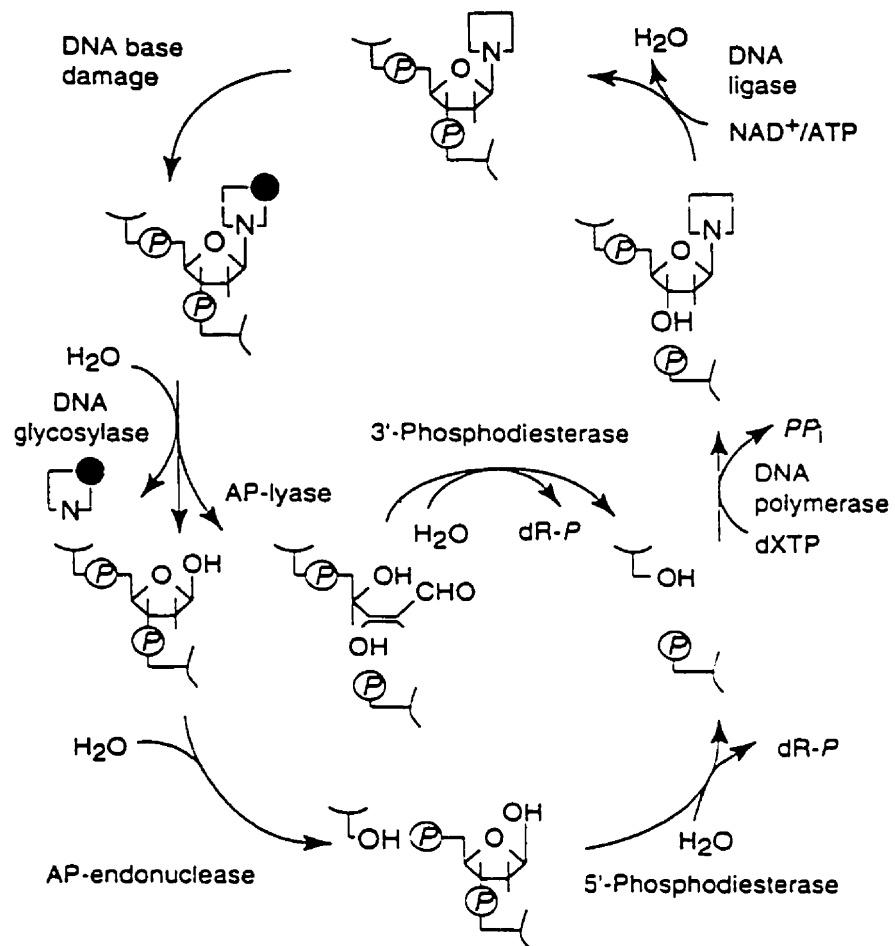
Pour ce qui est du XP, plusieurs expérimentations ont été faites à partir de cellules de personnes atteintes, où des traitements aux UV ont servi à étudier le système de réparation de l'ADN dans ces cellules. Les personnes atteintes du XP souffrent de déficiences dans leur cellules, incluant la sensibilité à la mort et aux effets mutagéniques des UV, leurs cellules étant incapables de réparer les dommages causés par ces irradiations (Bredberg et coll., 1986; Madzak et coll., 1993). Les gens atteints ont un risque de développer des cancers de la peau à un bas âge

1000 fois plus grand que les gens normaux (Levy et coll., 1995). Les études de cellules XP ont aussi permis de démontrer que les mutations les plus fréquemment retrouvées dans l'ADN traité aux UV sont des transitions de G vers A (Seetharam et Seidman, 1991; Gözükara et coll., 1994).

p53 pourrait avoir une influence sur le fonctionnement de la NER de deux manières différentes. Premièrement, p53 étant connu comme activateur transcriptionnel de plusieurs gènes, il pourrait contribuer à la régulation de certaines protéines impliquées dans le procédé cellulaire de la NER. Deuxièmement, p53 serait capable d'interagir soit avec des protéines, soit avec des dommages sur l'ADN, pour faciliter le travail de la NER (McKay et coll., 1999). Il a d'ailleurs été démontré que p53 était essentiel pour un fonctionnement efficace de la NER globale mais pas pour la NER couplée à la transcription (Wani et coll., 1999).

p53 peut en effet se lier à certaines protéines qui joueraient un rôle dans la réparation de l'ADN, incluant PCNA, RPA, XP-A, XP-B, XP-D et CS-B (Smith et coll., 1995; Li et Ho, 1998). De plus, p53 peut activer des protéines telles p21, GADD45, p48 et PCNA, ces dernières contribuant à la NER (Hwang et coll., 1999).

La BER, décrite à la figure 4, est responsable de l'élimination des sites abasiques (AP). Ces sites sont estimés à 10 000 par cellule humaine par jour, et ils sont formés de façon spontanée par hydrolyse dans le génome (Lindahl, 1993). Les sites AP, en plus de se produire spontanément dans l'ADN, peuvent résulter de l'exposition à certains agents tels les irradiations, ou de la mise en contact avec des carcinogènes chimiques comme les agents alkylants (Loeb et Preston, 1986). Les enzymes clés dans la BER sont les ADN glycosylases, qui enlèvent différentes bases endommagées de l'ADN par clivage du lien N-glycosydique entre la base et le déoxyribose du résidu nucléotidique. Différentes ADN glycosylases peuvent éliminer différents types de dommage. Les sites abasiques sont ensuite retirés de l'ADN soit par des AP-endonucléases ou des AP-lyases, qui clivent l'ADN en 5' ou en 3' du site. Par la suite, une phosphodiesterase va exciser le résidu déoxyribose phosphate, permettant à la DNA polymérase d'ajouter un nouveau nucléotide et à la DNA ligase d'effectuer l'étape finale (Seeberg et coll., 1995).



**Figure 4.** Réparation par excision de base impliquant des ADN glycosylases, des AP-endonucléases et AP-lyases, des phosphodiesterases, des ADN polymérase ainsi que des ADN ligases (Seeberg et coll., 1995).

Les études actuelles sur le rôle de p53 semblent axées plus particulièrement sur la NER, laissant moins de place pour la BER. L'importance de la NER n'est plus à démontrer, mais ce système agit surtout sur des lésions infrequentes ou individuelles, tandis que la BER (moins étudiée) a un effet sur les dommages spontanés de l'ADN et protège contre d'importants agents exogènes (Seeberg et coll., 1995). Quelques études récentes ont pu démontrer une implication de p53 dans le fonctionnement de la BER. En fait, des travaux de l'équipe de Prives C. (Jayaraman et coll., 1997; Gaiddon et coll., 1999) ont démontré que Ref-1, une protéine multifonctionnelle impliquée dans la BER pouvait se lier à p53. Ref-1 a la fonction d'une endonucléase des sites AP dans le système de réparation de l'ADN par excision de bases. Cette protéine peut aussi stimuler plusieurs facteurs de transcription, dont p53. La régulation de p53 par Ref-1 portait ainsi à croire en une implication de p53 dans le fonctionnement de la BER. Ce n'est que tout récemment qu'a été démontré une implication direct de p53 dans la BER (Offer et coll., 1999). Ainsi, p53 est donc impliqué dans plus d'un mécanisme de réparation de l'ADN.

À ce jour, il est donc évident que p53 joue un rôle dans la réparation de l'ADN. Cependant, tout n'est pas encore clair dans ce procédé qui semble impliquer plusieurs facteurs et interactions.

### **1.9 Les dommages oxydatifs**

Lors du métabolisme cellulaire, il y a production de diverses molécules qui sont susceptibles de réagir avec les constituants de la cellule. Certaines de ces molécules pourront réagir de façon directe avec l'ADN tandis que d'autres nécessiteront une transformation avant d'avoir la capacité d'attaquer l'ADN (Boiteux et Radicella, 1998). Il existe de multiples procédés dans la cellule qui génèrent des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) (Floyd, 1990; Naqui et Chance, 1986).

L'oxygène est métabolisé par une série de réductions d'un électron. Ceci mène à la formation de radicaux libres et d'espèces reliées dont le radical HO<sup>•</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'ion O<sub>2</sub><sup>-</sup> et l'oxygène singulet. Ces molécules peuvent causer des dommages à plusieurs macromolécules cellulaires dont les protéines, les lipides, l'ARN et l'ADN (Halliwell et Aruoma, 1991). Les

changements retrouvés dans l'ADN exposé à ces molécules réactives sont d'une cinquantaine de types différents (Feig et coll., 1994). Il semblerait que les effets résultant de ces dommages pourraient contribuer à la pathogénicité de plusieurs maladies humaines, incluant le cancer (Cerutti, 1985).

### 1.10 Les inhibiteurs des ROS

Certains agents sont reconnus comme étant des inhibiteurs de dommages oxydatifs. Ces produits agissent de multiples façons, sur différents composés, pour prévenir la création de lésions causées par la présence d'agents oxydants. Dans cette étude, les inhibiteurs utilisés ont été la superoxide dismutase (SOD), la catalase, le mannitol, le defferioxamine mesylate et le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Il a été démontré que les ROS produits dans différentes conditions peuvent être éliminés par la SOD, la catalase et la peroxydase (Henle et Linn, 1997).

La SOD catalyse la dismutation de l'anion  $O_2^-$  réduisant donc la formation de  $HO^\bullet$ , par la réaction suivante :  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$  (McCord et Fridovich, 1969). La catalase permettra aussi cette réduction de la formation de  $OH^\ominus$  en catalysant la suppression du  $H_2O_2$  en le dégradant en eau et en oxygène ( $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$ ) (Friedberg, 1995).

Pour sa part, le mannitol a aussi un effet sur la formation d'intermédiaires réactifs, en piégeant de façon stable certains métaux, les empêchant de former des complexes avec d'autres molécules (Tsou et coll., 1999). Le mannitol inhibera aussi l'action des radicaux libres, étant principalement reconnu pour agir sur la formation du radical  $HO^\bullet$  (Desesso et coll., 1994).

Pour ce qui est du defferioxamine mesylate, il atténue les dommages causés par des agents oxydants par un autre mécanisme (Wichens et coll., 1987). Le defferioxamine est un agent chelateur du fer (Cederbaum et Dicker, 1983) qui réagit avec le radical libre  $O_2^-$ , probablement dans sa forme protonée ( $HO_2$ ), pour former un radical libre nitroxyde, relativement

stable (Davies et coll., 1987). Cette interaction diminue donc les possibilités d'attaque de radicaux libres sur l'ADN (McBride et coll., 1992).

Enfin, le DMSO est un puissant suppresseur du radical HO<sup>•</sup>, ce qui fait qu'il peut prévenir l'induction de mutations dues à la présence de ce radical réactif (Moraes et coll., 1989).

## **1.11 Méthodes d'analyse de la mutagenèse**

### **1.11.1 Test de Ames**

Dans les années soixante dix, un des premiers tests d'étude de la mutagenèse a été mis au point par Bruce Ames (Ames et coll., 1973). Ce test a été conçu après des études démontrant une relation de cause à effet entre l'exposition à certains agents chimiques et physiques et le cancer. Le test de Ames a pour objectif de prévoir et d'étudier le potentiel mutagène et cancérigène de différents agents. Cette étude utilise des bactéries, ayant une mutation dans un gène de synthèse de l'histidine, qui sont exposées à certains agents pour observer l'apparition de révertants. Ainsi, il est possible d'évaluer le pouvoir mutagène de ces agents.

### **1.11.2 Les vecteurs utilisés**

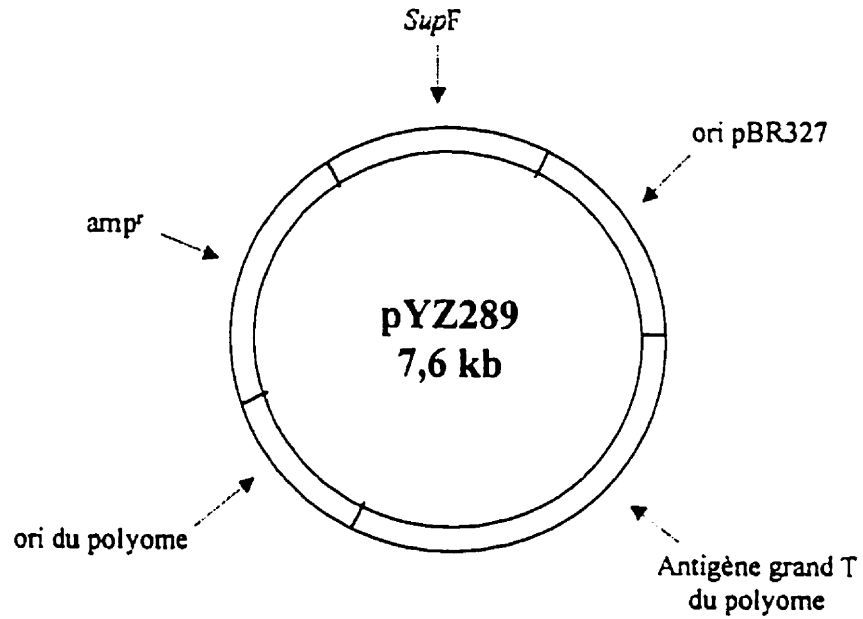
Il est aujourd'hui possible d'utiliser un système basé sur des vecteurs navette possédant un gène cible pour la mutagenèse (Razzaque et coll., 1983). Ce système permet l'étude de la mutagenèse dans des cellules de mammifère en culture et la sélection ainsi que l'analyse des mutations sont possibles chez les bactéries. Il y a plusieurs avantages à l'utilisation d'un vecteur navette pour étudier la mutagenèse. Premièrement, le traitement par un agent mutagène peut-être fait in vitro avant la transfection. Ainsi, la cytotoxicité de l'agent ne vient pas altérer les autres gènes cellulaires, le vecteur navette étant le seul modifié. Cependant, si désiré, le traitement peut aussi être fait in vivo, après transfection du vecteur (Trottier et coll., 1992). Un autre avantage de l'utilisation du vecteur navette est l'identification des mutants et l'étude des mutations chez les bactéries. C'est la couleur des colonies qui indique celles portant un gène muté. Par la suite, la récupération du vecteur et le séquençage du gène cible sont relativement faciles.



Le vecteur navette utilisé est un plasmide qui porte un gène cible pour la mutagenèse, *supF* (section 1.11.3), un marqueur de sélection et deux origines de réplication qui permettent la réplication dans les cellules de mammifère et dans *E.coli*. Dans mes expériences, c'est le vecteur navette pYZ289 qui est utilisé (figure 5). Il s'agit en fait d'un dérivé de pZ189 (Moriwaki et coll., 1991), qui a été modifié pour effectuer des études de mutagenèse dans des cellules de rongeurs. Chez pZ189, l'origine de réplication de SV40, permettant la réplication dans les cellules de primate, et le gène pour l'antigène grand T de SV40 sont remplacés par ceux du virus du polyome. L'antigène grand T de ce virus ne forme pas de complexe avec p53, contrairement à l'antigène grand T de SV40 (Wang et coll., 1989; Braithwaite et coll., 1987). Cette caractéristique est essentielle pour nous, parce qu'elle permet de tenir compte de l'influence de p53 dans des études de mutagenèse. Le vecteur pYZ289 a la capacité de se répliquer à la fois dans les bactéries et les cellules de rongeurs (Moriwaki et coll., 1991). C'est pour cette raison, entre autres, que nous avons choisi ce vecteur navette. La fréquence de mutation spontanée de ce vecteur est d'environ  $1 \times 10^{-3}$ .

Enfin, il ne faut pas omettre que l'utilisation des vecteurs navettes comporte aussi certaines limitations, entre autres le fait qu'ils ne sont pas intégrés dans le génome. Aussi, nous ne savons pas à quel point ils sont protégés par les systèmes de réparation de l'ADN, contrairement à l'ADN chromosomique.

Pour ce qui est des vecteurs pECM53k et pECMmutk, ils sont utilisés pour observer l'influence de p53. On peut ainsi comparer les résultats obtenus en présence ou non de p53. pECM53k est un vecteur d'expression de p53 sauvage de souris, dérivé de pECM53 (Johnson et coll., 1991) ou le gène de la résistance à l'ampicilline a été remplacé par celui de la résistance à la kanamycine (Courtemanche et Anderson, 1999). Pour ce qui est de pECMmutk, il sert de vecteur contrôle, n'ayant plus sa séquence codante pour p53 (Courtemanche et Anderson, 1999).



**Figure 5.** Vecteur pYZ289. Vecteur navette utilisé pour les traitements avec les différents agents mutagènes. On y retrouve les éléments qui le composent, soit un gène cible pour la mutagenèse, un gène de résistance ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication chez les bactéries et chez les rongeurs (selon Yagi et coll., 1994).

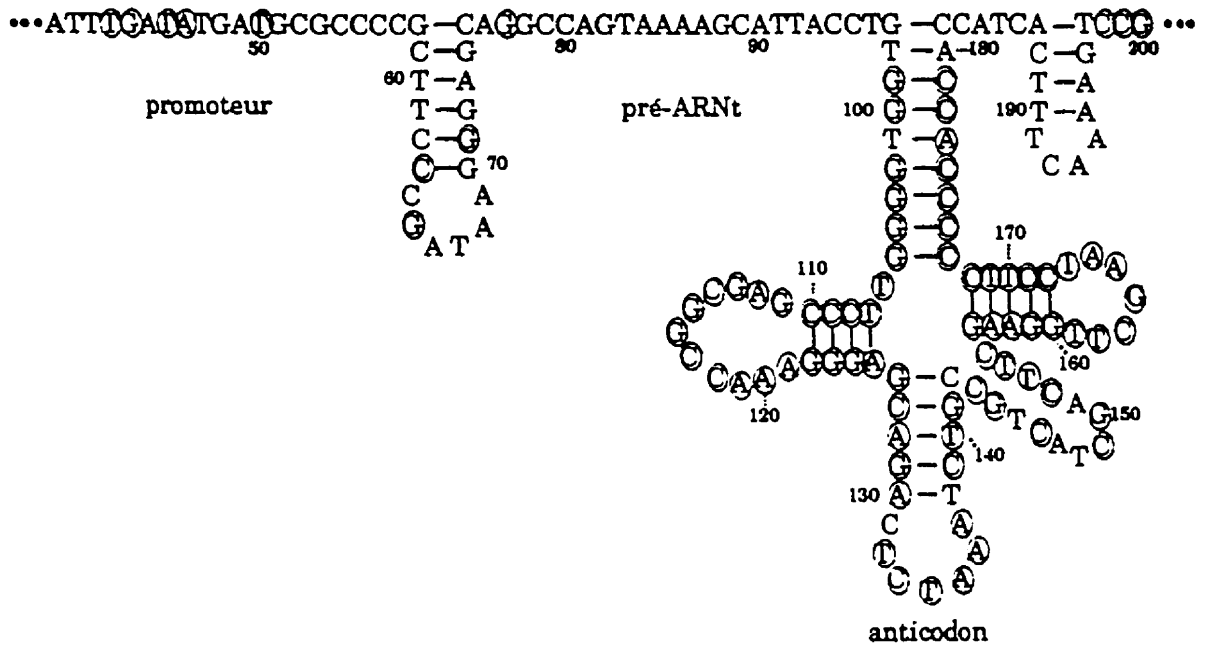
### 1.11.3 Le gène cible *supF*

Le gène cible que contient pYZ289 est *supF*, qui est fréquemment utilisé et qui est aussi appelé *Su3* ou *tyrT*. Il s'agit d'un gène de *Escherichia coli*, qui est un suppresseur de mutation *amber*, qui sont des mutations non sens où le codon de terminaison UAG remplace un codon d'un acide aminé. Le produit de ce suppresseur est un ARN de transfert qui a une mutation dans son anticodon, le rendant complémentaire au codon *amber* et ainsi lui permettant d'incorporer un acide aminé dans la chaîne polypeptidique. Il y a donc synthèse d'une protéine pleine longueur. Le gène *supF* commande la synthèse d'un ARNt de la tyrosine.

La souche bactérienne utilisée pour observer les mutations de *supF* devra donc porter une mutation *amber*. Le plus souvent, cette mutation est située dans le gène *lacZ*, codant pour la  $\beta$ -galactosidase, une enzyme qui hydrolyse le lactose en glucose et en galactose. Ces bactéries auront donc besoin du suppresseur de mutations *amber* pour synthétiser une  $\beta$ -galactosidase pleine longueur et active, pour hydrolyser le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosidase (X-Gal), un analogue du lactose. Cet analogue est utilisé parce qu'il passe du blanc au bleu lorsqu'il est scindé par la  $\beta$ -galactosidase. Il est ainsi possible de connaître l'état du gène cible après la mutagenèse. Les colonies bleues auront reçu un vecteur navette pYZ289 avec un *supF* de type sauvage, tandis que les colonies qui auront reçu un vecteur navette avec une mutation dans son *supF* seront blanches ou bleues pâles. La croissance des bactéries se fait sur milieu avec ampicilline, ce qui permet, dès lors, de sélectionner les bactéries ayant reçu un vecteur navette avec résistance à l'ampicilline.

La figure 6 montre la structure secondaire probable de l'ARNt (Kraemer et Seidman, 1989). Le gène *supF* est ici divisé en quatre régions : la région promotrice (paires de bases 24 à 58), le pré-ARNt (59-98), l'ARNt (99-183) et la région 3'flanquante (184-200). Cette figure montre aussi les bases dont la mutation inactive la fonction suppressive de l'ARNt. Il faut aussi spécifier que le gène *supF* est particulièrement intéressant pour l'étude des mutations ponctuelles, et ce étant donné qu'une mutation sur presque n'importe quelle paire de bases de ce gène amène son inactivation.

## ARNt *supF*



**Figure 6.** Séquence du gène cible de la mutagenèse *supF* montrant la structure secondaire probable ainsi que les bases (encerclées) dont la mutation inactive la fonction suppressive de l'ARNt (Kraemer and Seidman, 1989).

## 1.12 Résumé du travail

Le travail de ce mémoire avait pour objectif premier de vérifier si p53 pouvait reconnaître ou non les mutations ponctuelles causées par certains agents mutagènes.

L'hypothèse posée suite à des études fait précédemment au laboratoire proposait que les dommages de type oxydatifs faisaient partie des mutations ponctuelles reconnues par p53. Les résultats de Chantal Courtemanche (Courtemanche et Anderson 1999) montraient que p53 pouvait reconnaître et diminuer la fréquence de mutation ponctuelle causée par certains agents mais pas par d'autres.

En effet, Courtemanche a observé une diminution de la fréquence de mutation après traitement au BPDE, au CPBA et à l'AFB1. Cette diminution était de plus dépendante de la concentration, soit plus importante à une forte concentration dans le cas du BPDE et de l'AFB1, et à une faible concentration pour le CPBA. Pour ces agents, il a été proposé qu'il pourrait y avoir formation de deux types de dommages. Un de ces types serait reconnu par p53 de façon plus importante ou encore exclusivement, par rapport à l'autre type. Ainsi, c'est à une faible concentration de CPBA et à une forte concentration de BPDE ou d'AFB1 que les dommages reconnus par p53 seraient les plus abondants. D'autres résultats ont démontré qu'il n'y avait pas d'influence de p53 dans le cas des mutations causées par les UVC (254 nm).

En se basant sur le fait que le CPBA, le BPDE et l'AFB1 avaient pour similarité de provoquer, entre autres, des dommages oxydatifs, ce qui n'était pas le cas pour les UVC, l'hypothèse a été émise que les dommages de types oxydatifs pourraient être ceux reconnus par p53.

C'est en se basant sur cette hypothèse qu'ont été choisis trois autres agents reconnus pour causer des dommages oxydatifs à l'ADN, soit le BM en présence de lumière et d'oxygène, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les UVA (366 nm) avec riboflavine. De plus, pour toucher un plus grand éventail de produits et de types de mutation différents, le MMS a aussi été choisi. Cet agent alkylant cause

des méthylations sur l'ADN, un type de dommage n'ayant pas encore été testé dans nos expérimentations.

Les traitements ont été faits *in vitro* sur le vecteur navette pYZ289. Le vecteur était ensuite cotransfecté de façon transitoire dans des cellules de mammifère soit avec le vecteur d'expression de p53, pECM53k, ou un vecteur contrôle, pECMmutk. Ces cotransfections avaient pour but de comparer les résultats obtenus en présence et en absence de p53. Les cellules utilisées sont des fibroblastes de souris (10)3 ne contenant pas de p53. Dans ces cellules, les lésions prémutationnelles sont converties en mutations. Les vecteurs répliqués sont ensuite récupérés et introduits, après avoir été digérés à la *DpnI*, dans des bactéries qui pourront permettre d'identifier les plasmides portant une mutation. La *DpnI* est une enzyme de restriction qui va permettre d'éliminer les vecteurs de départ, l'enzyme ne coupant que l'ADN méthylé par la méthylase *dam* qui est présente chez *E.coli* mais pas dans les cellules de mammifère. Ainsi, les vecteurs s'étant répliqués dans les cellules de mammifère seront épargnés par la *DpnI* (Peden et coll., 1980). Enfin, il suffira de déterminer la fréquence de mutation à partir du nombre de colonies blanches obtenues par rapport au nombre total de colonies.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

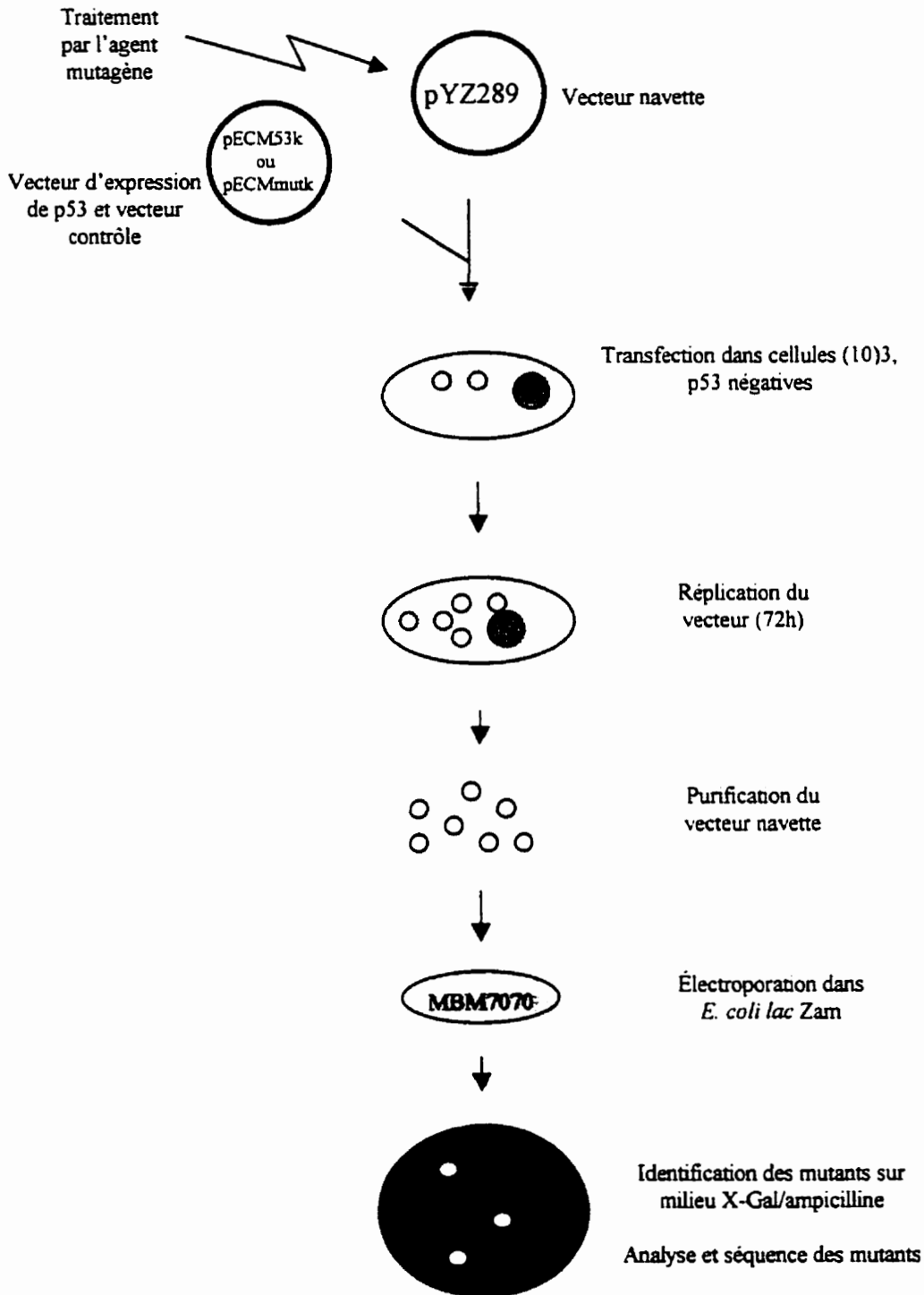
#### 2.1 Méthode générale

La figure 1 montre les différentes étapes de la méthode suivie pour les expérimentations. Le vecteur navette pYZ289 est d'abord soumis à un traitement de mutagenèse. Il est ensuite cotransfecté dans des cellules (10)3 avec soit un vecteur d'expression de p53 (pECM53k) ou un vecteur contrôle (pECMmutk). La réplication du vecteur est faite pendant 72 heures dans les cellules. Par la suite, les vecteurs sont purifiés et électroporés dans *E.coli* MBM7070. L'identification des mutants est ensuite possible sur milieu X-gal/ampicilline, ce qui permet d'analyser les fréquences de mutation en présence et en absence de p53.

#### 2.2 Traitements aux agents mutagènes

##### 2.2.1 Traitement au CPBA

Le traitement au CPBA (Mariën et coll., 1987; Courtemanche et Anderson, 1999) est fait dans une solution contenant 45 µg de plasmide pYZ289, 20 µl de tampon sodium-phosphate 0,2 M à pH 7.4 et le volume est amené à 200 µl avec de l'eau. La réaction débute par l'ajout du CPBA (Sigma), soit de 10 µl d'une solution de 2 mg/ml fraîchement préparée dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Des ajouts de la même quantité de CPBA sont faits à toutes les 7,5 minutes et ce, pendant 30 minutes, à 37°C. Deux extractions de 200 µl de chloroforme suivent, avant précipitation de l'ADN à l'éthanol.



**Figure 1.** Méthode utilisée pour déterminer l'influence de p53 sur la fréquence des mutations ponctuelles provoquées par des agents oxydants (Courtemanche et Anderson, 1999).



### **2.2.2 Traitement au BM**

Le traitement au BM (BIO-RAD) a été mis au point à partir de protocoles publiés (Boiteux et Radicella, 1998; Schneider et coll., 1990; Anson et coll., 1998). La mutagenèse a lieu sur 40 µg d'ADN, en présence de Tris-HCl pH 8.0 (10 mM), de defferioxamine mesylate (0,1 mM) et de MgCl<sub>2</sub> (10 mM) dans une solution finale de 400 µl. L'addition du BM (20 ou 200 µM) se fait à la noirceur. Les échantillons sont placés dans des pétris de 60 mm de diamètre et sont incubés sur la glace, sous une source de lumière blanche (100 watts) placée à l'intérieur d'un réflecteur métallique. L'ampoule est située à 18 cm des échantillons et la lumière qu'elle projette doit passer à travers une mince couche d'eau (contenue dans un récipient de plastique) avant d'atteindre l'échantillon. L'exposition est de différentes durées, soit de 5, 30, 45 ou 90 minutes. Par la suite, le BM est éliminé par extraction phénol/chloroforme avant précipitation de l'ADN.

### **2.2.3 Traitement au BPDE**

Le traitement au BPDE (Yang et coll., 1987; Courtemanche et Anderson, 1999) se fait sur 45 µg de pYZ289. Le traitement est fait à l'abris de la lumière pendant une heure et demie, à température ambiante. Il débute par l'ajout de 20 µl d'une solution de BPDE (MRI) à 0,3 mg/ml dans un volume total de 200 µl complété par du TE 10/1 pH 8.0. Le BPDE est préparé dans du tétrahydrofurane. Après le traitement, l'ADN est précipité à l'éthanol.

### **2.2.4 Traitement au MMS**

Le traitement au MMS (Ogawa et coll., 1997; Justus et Thomas, 1998) est fait dans une solution d'ADN d'une concentration de 1,0 µg/µl (40 µg par échantillon). Des préparations fraîchement diluées de MMS (ICN) sont ajoutées, pour obtenir des concentrations de 20 ou de 200 mM. L'incubation a lieu pendant 30 minutes à 25°C. Le traitement se termine par une précipitation à l'éthanol.

### **2.2.5 Traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Le traitement de 40 µg d'ADN plasmidique au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Moraes et coll., 1989) est fait dans une solution contenant du Tris-HCl pH 8.0 (100 µl de 1 M), du EDTA pH 8.0 (20 µl de 0,5 M), du MgCl<sub>2</sub> (10 µl de 1 M) ainsi que du FeCl<sub>3</sub> (10 µl de 0,01 M) dans un volume final de 500 µl. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma; 30,4% ou 8,94 M) est ajouté à l'échantillon à une concentration de 88 mM. La réaction se fait à 37°C et elle est arrêtée après 3, 30 ou 60 minutes par l'ajout de la catalase (Sigma; 0,01g/ml). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, l'ADN est précipité à l'éthanol.

### **2.2.6 Traitement aux UVA**

Le traitement aux UVA (Protic-Sabljić et Kremer, 1985; Ito et coll., 1993; Yagi et coll., 1994) est fait sur 30 µg de plasmide. Les échantillons, placés dans des pétris ouverts de 60 mm de diamètre, contiennent de la riboflavine (Sigma; 0,05 mM). Les pétris sont placés sur glace et sont exposés aux UV (366 nm) provenant d'une lampe germicide à main, située à 5 cm des échantillons. L'exposition a lieu pendant 3, 20 ou 60 minutes. Par la suite, la riboflavine est retirée de la solution par extraction au phénol/chloroforme et l'ADN est précipité à l'éthanol.

### **2.2.7 Traitement aux UVC**

Le traitement aux UVC ressemble beaucoup à celui des UVA (Ito et coll., 1993; Yagi et coll., 1994; Courtemanche et Anderson, 1999). Les échantillons de 30 µg du plasmide pYZ289 sont placés dans des pétris ouverts de 60 mm de diamètre. Ils sont déposés sur glace et exposés aux UV (à 254 nm) provenant d'une lampe germicide à main située à 5 cm. L'exposition a lieu pendant 10 minutes et il y a ensuite précipitation de l'ADN à l'éthanol.

### **2.2.8 Utilisation des inhibiteurs**

L'utilisation des inhibiteurs n'a pas changé la base des traitements. Les différents inhibiteurs étaient tout simplement ajoutés à la solution avant de procéder à la mutagenèse. Les

concentrations utilisées étaient les suivantes, mannitol (Sigma) à 1M, superoxyde dismutase (Sigma) à 50 µg/ml, defferioxamine mesylate (Sigma) à 0,1 mM, DMSO (Fisher) à 4% et catalase (Sigma) à 0,01 g/ml. Pour les traitements au BM avec inhibiteurs, la concentration était de 200 µM et la durée était de 30 minutes. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était utilisé à 88 mM pendant 30 minutes et les échantillons étaient exposés pendant 60 minutes aux UVA à une distance de 5 cm.

### **2.3 Cellules et plasmides**

Les cellules utilisées sont des fibroblastes embryonnaires de souris (10)3, une lignée cellulaire déficiente en p53, qui proviennent de A.J. Levine (Harvey et Levine, 1991). Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) contenant 4,5 g/l de glucose, 10% de sérum fœtal de bovin, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Le vecteur navette pYZ289 a été obtenu de T. Yagi (Yagi et coll., 1994). Le vecteur d'expression de p53 est pECM53k et le vecteur contrôle pECMmutk (Courtemanche et Anderson, 1999) tous deux obtenus à partir de pECM53 fournit par S. Benchimol (Johnson et coll., 1991).

### **2.4 Transfection et extraction des plasmides**

Les cellules sont transfectées en suspension par une méthode au phosphate de calcium (Trottier et coll., 1992) en présence de 30 µg de pYZ289 préalablement traité ainsi que de 40 µg de pECM53k ou pECMmutk. Les cellules, dans des pétris à culture cellulaire de 155 mm, sont rincées 6 à 8 heures après la transfection et l'incubation est faite pendant 72 heures. Les plasmides sont ensuite isolés (Hirt, 1967), purifiés par digestion à la protéinase K (2 mg/ml) et par extraction phénol/chloroforme. Ils sont aussi traités à la ribonucléase A (0,2 mg/ml) et digérés à la *Dpn1* (Peden et coll., 1980). Les plasmides provenant de transfections différentes sont purifiés et analysés séparément.

L'efficacité de transfection a été calculée par transfection de pEGFP-C1, un vecteur d'expression de la « green fluorescent protein » (GFP), dans des conditions identiques. C'est après incubation de 48 heures que la détection a été possible sur microscope à fluorescence.

## 2.5 Électroporation et compte des fréquences de mutation

Les plasmides purifiés obtenus de la réplication sont ensuite électroporés (Dower et coll., 1988) dans *Escherichia coli* MBM7070, un souche bactérienne obtenue de M.M. Seidman (Seidman et coll., 1985). L'électroporation est faite dans des cuvettes de 0,1 cm entre les électrodes, avec l'appareil "Bio-Rad gene pulser" (15 kV/cm, 25  $\mu$ Fd, 400 ohm). Après une incubation d'une heure, les bactéries sont étendues sur des pétris LB/agar 1,5% avec ampicilline (100  $\mu$ g/ml) recouverts d'une couche de LB/agar 1,2% (10 ml/pétri de 150 mm de diamètre) contenant du X-gal (0,8 mg/ml), de l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosidase (190  $\mu$ g/ml) et de l'ampicilline (100  $\mu$ g/ml). Les pétris sont incubés à 37°C pendant une nuit. Les colonies blanches ou bleu pâles obtenues sont des mutants *lac*<sup>-</sup>, elles sont comptées et leur nombre est comparé à la quantité totale de colonies obtenues. Cette fraction est la fréquence de mutation.

## 2.6 Immunofluorescence de p53

Les cellules (10)3 ( $3 \times 10^6$ ) ont été transfectées avec 40  $\mu$ g de pECMmutk, de pECM53k ou de pCMV53k et placées dans des pétris de 150 mm de diamètre, contenant des lamelles pour microscopie. L'incubation a été de 24 heures. Pour l'immunofluorescence de p53 et le marquage de l'actine, les lavages des cellules ont été faits avec du tampon phosphate salin (PBS 1X composé de 80 g de NaCl, de 2 g de KCl, de 9,2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et de 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pour un litre de solution). Il y a eu fixation des cellules à la formaldéhyde à 3,7% pendant 20 minutes, suivie d'une perméabilisation au Triton (à 0,2% dans du PBS) de 15 minutes et blocage de 30 minutes à la poudre de lait (5% dans du PBS). L'incubation avec l'anticorps dirigé contre p53 PAb421 (Oncogene Research Products) a été faite toute la nuit (dilution 1 : 50, 1% poudre de lait dans du PBS). Il y a ensuite eu lavage au PBS contenant 0,05% de Tween 20 et blocage de 15 minutes à la poudre de lait (5% dans du PBS), avant incubation de 60 minutes avec l'anti-IgG biotiné de souris (Jackson ImmunoResearch; à une dilution 1 : 100) ainsi que marquage à la streptavidine couplée au Texas-Red (Amersham Pharmacia Biotech; à une dilution 1 : 50) et à la "fluorescein isothiocyanate" (FITC)-Phalloïdine (Sigma; à une dilution 1 : 30) pendant 60 minutes, les dilutions étant faites dans du PBS contenant 1% de poudre de lait. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence.

## CHAPITRE 3

### **TRAITEMENTS DE MUTAGÈNESE DE pYZ289, AU BLEU DE MÉTHYLÈNE, AUX ULTRAVIOLETS DE TYPE A, AU PEROXYDE D'HYDROGÈNE AINSI QU'AU MÉTHYL MÉTHANESULFONATE**

#### **3.1 Résultats**

##### **3.1.1 Présence et activité de p53**

Avant d'étudier l'influence de p53 sur certains types de mutation, il fallait savoir si le vecteur d'expression de p53 était actif dans les cellules où il était transfecté et si la protéine était fonctionnelle. C'est pour cette raison que la présence de p53 du vecteur pECM53k a été vérifiée par immunofluorescence (figure 1) ainsi que par western (données non illustrées) et que des traitements ont été faits pour s'assurer de l'activité de la protéine.

La figure 1 démontre les résultats d'immunofluorescence de p53. Trois vecteurs différents, pECMmutk, pECM53k et pCMV53k, ont été transfectés dans les cellules (10)<sup>3</sup>, qui ont ensuite été soumises à l'immunofluorescence. Le marquage de l'actine, qui permettait de bien observer le contour et la structure des cellules, a été fait avec le FITC-phalloïdine, et la détection de p53 a été rendue possible par l'utilisation de l'anticorps dirigé contre p53 PAb421, suivie de l'anti-IgG biotiné de souris et enfin le marquage a été fait à la streptavidine-Texas-Red. Ainsi, l'actine a été marquée en vert et la protéine p53 en rouge.

Les résultats d'immunofluorescence démontrent qu'après 24 heures d'incubation, il y a présence de p53 dans le cas de transfections de pECM53k ainsi que de pCMV53k, ce qui n'est pas le cas pour le témoin négatif pECMmutk.



Des westerns ont aussi été faits avec le concours du Dr Marc Desrochers, pour confirmer la présence de la protéine p53 dans les cellules transfectées par le vecteur d'expression de p53. Les résultats obtenus (données non illustrées) ont démontrés une grande quantité de protéine p53 lors de la transfection du vecteur pCMV53k et une quantité un peu plus faible avec le vecteur pECM53k.

Pour vérifier l'activité de p53, d'autres tests ont dû être faits. L'immunofluorescence et le western permettent de confirmer la présence de la protéine p53, mais ne nous fournissent aucune information à savoir si la protéine traduite est fonctionnelle. C'est pour cette raison que des tests de mutagenèse ont été refaits. Étant donné que l'influence de p53 avait déjà été démontrée pour la reconnaissance des dommages causés par certains agents, un d'eux a été choisi pour les expérimentations. C'est le BPDE qui a servi à reproduire les résultats obtenus précédemment (Courtemanche et Anderson, 1999). Il a ainsi été possible de démontrer qu'il y avait, en présence de p53, diminution de la fréquence de mutation provoquée par traitement de pYZ289 au BPDE. En effet, des traitements à deux concentrations différentes de BPDE (15 et 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ont démontré des diminutions de fréquences de mutation par p53 de 2 à 2,5 fois. Ces résultats étaient conciliables à ceux déjà obtenus au laboratoire qui se situaient entre 1,2 et 4,8 selon la concentration (voir annexe A).

L'efficacité de transfection a été vérifiée pour la transfection de cellules en suspension par la méthode au phosphate de calcium, qui est utilisée depuis longtemps au laboratoire. La transfection d'un vecteur d'expression de la GFP, soit pEGFP-C1, a permis de démontrer une efficacité de transfection de 5 à 6% (33 cellules positives sur 559 cellules totales ce qui signifie 6% environ).

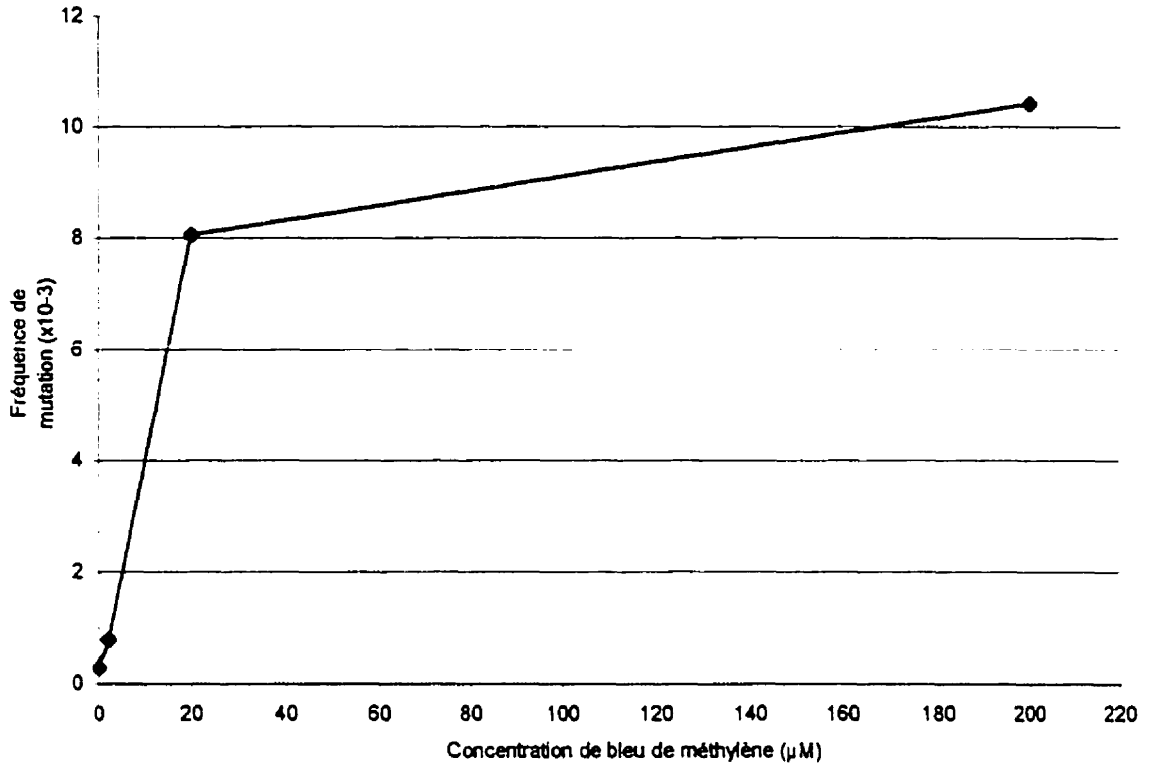
### 3.1.2 Traitements au BM

Le traitement au BM a été mis au point d'après les méthodes décrites par Boiteux et Radicella (1998), Schneider et coll. (1990) ainsi qu'Anson et coll. (1998). L'ADN du vecteur navette pYZ289 était mis en présence de BM et exposé à une source de lumière blanche, soit celle provenant d'une ampoule (100W) située dans un réflecteur métallique.

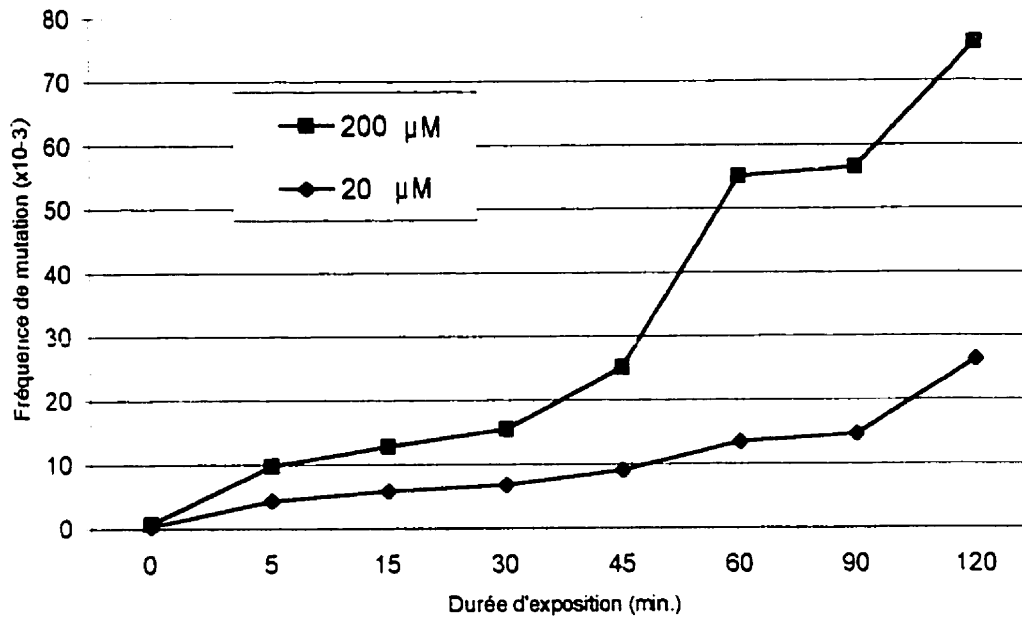
Au départ, plusieurs concentrations de BM ont été testées pour des traitements de 30 minutes, soit à 0, 2, 20 et 200  $\mu\text{M}$ . La fréquence de mutation augmentait avec la concentration (figure 2). Deux concentrations de BM ont été choisies pour la suite des expérimentations. Ainsi, les traitements qui ont suivi ont été faits à des concentrations de 20 et 200  $\mu\text{M}$ , mais cette fois-ci en testant différentes durées d'exposition au BM et à la lumière, soit 0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, et 120 minutes. Les résultats des fréquences de mutation pour ces différentes durées se retrouvent à la figure 3, où on observe une augmentation de la fréquence de mutation avec la durée d'exposition, cette fréquence étant un peu plus forte, pour une même durée d'exposition, à 200  $\mu\text{M}$  qu'à 20  $\mu\text{M}$ .

Le gène *supF* d'une douzaine de mutants obtenus du traitement au BM ont été séquencés, ce qui a démontré que les lésions retrouvées étaient des mutations ponctuelles et que la plus fréquente s'avérait être la transversion de G vers T (70 % des mutations).





**Figure 2.** Fréquences de mutation obtenues en fonction de la concentration de BM. Le vecteur pYZ289 a été traité par le BM en présence de lumière visible et d'oxygène pendant 30 minutes. Les colonies blanches obtenues par rapport au nombre total de colonies ont servi à déterminer la fréquence de mutation.



**Figure 3.** Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM en fonction de la durée d'exposition à la lumière visible. Le vecteur pYZ289 a été traité à des concentrations de 20 et 200 µM. Les colonies blanches obtenues par rapport au nombre total de colonies ont servi à déterminer la fréquence de mutation.

C'est à partir des fréquences de mutation obtenues à des concentrations de BM de 20 et 200  $\mu\text{M}$  qu'ont été déterminées les durées d'exposition des traitements. Ainsi, les expérimentations suivantes ont été effectuées pendant soit 5, 30, 45 ou 90 minutes. Dans ces traitements, on voulait observer l'influence de p53 sur la fréquence des mutations. Ainsi, le vecteur pYZ289 traité était cotransfecté soit avec le vecteur d'expression de p53, pECM53k, ou encore avec un vecteur contrôle, pECMmutk.

Les résultats obtenus de ces traitements sont présentés dans le tableau 1, pour des concentrations de 20  $\mu\text{M}$  et dans le tableau 2, pour des concentrations de 200  $\mu\text{M}$ . Des traitements identiques ont été faits à quelques reprises, et les résultats présentés résultent de deux ou trois électroporations différentes pour un même traitement. Le tableau 3 présente quelques résultats d'électroporation pour un même traitement.

Il faut d'abord constater que pour des conditions identiques d'expérimentation, entre des traitements distincts, il y a une variation assez importante des fréquences de mutation, et ce, à 20 comme à 200  $\mu\text{M}$ . Il est donc important de comparer les résultats pour un même traitement, et d'observer les variations dans les fréquences de mutation plutôt que les fréquences elles-mêmes.

Pour ce qui est des résultats à des concentrations de BM de 20  $\mu\text{M}$ , il est possible d'observer une petite diminution de la fréquence de mutation en présence de p53. Cette variation est relativement faible. Cet écart dans les fréquences semble encore plus faible pour les traitements à 200  $\mu\text{M}$  et il faut de plus remarquer que les résultats sont assez variables donc difficiles à reproduire, et ce, que ce soit pour des durées d'exposition de 5, 30, 45 ou encore 90 minutes.

Les tableaux 4 et 5 donnent les réductions des fréquences de mutation (RFM), qui sont en fait les rapports entre les fréquences de mutation des traitements sans p53 et les fréquences de mutation avec p53, pour des concentrations de 20 et de 200  $\mu\text{M}$  respectivement. Ainsi, lorsque la valeur de la RFM est de 1, elle indique que les fréquences de mutation sont identiques en présence et en absence de p53, donc que la présence de p53 n'influence pas le taux de mutation.

Si la valeur est inférieure à 1, la fréquence de mutation est plus élevée en présence de p53 et enfin, si elle est supérieure à 1, il s'agit d'une diminution de la fréquence de mutation en présence de p53.

Les résultats, une fois standardisés, ont été soumis à des analyses statistiques. Cette standardisation a été faite de la façon suivante : les fréquences de mutation en absence de p53 ont toutes été ramenées à une valeur fixe, soit 100 et les fréquences de mutation en présence de p53 ont été calculées en fonction des premières valeurs obtenues. Ainsi, de cette façon, il était possible d'analyser les résultats en éliminant les variations non-contrôlables dans les fréquences de mutation. Une analyse de covariance a été effectuée pour étudier les différences entre les traitements avec et sans p53, selon la procédure "General Linear Model" (GLM), grâce au logiciel SAS (SAS institute, 1990). Les analyses statistiques ont été faites de la même manière pour les résultats avec tous les autres agents à l'étude.

Les études statistiques ont démontré que la différence entre les fréquences de mutation avec et sans p53 était significative pour des traitements à 20  $\mu$ M de 30 minutes ( $p = 0,013$ ), 45 minutes ( $p = 0,012$ ) et 90 minutes ( $p = 0,006$ ), ce qui n'est cependant pas le cas pour les traitements de 5 minutes ( $p = 0,82$ ). Les traitements à des concentrations de 200  $\mu$ M de BM ne présentent cependant pas de variations significatives entre les fréquences de mutation obtenues en présence et en absence de p53 (à 5 min.  $p = 0,37$ , à 30 min.  $p = 0,15$ , à 45 min.  $p = 0,30$  et à 90 min.  $p = 0,26$ ).

**Tableau 1.** Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM et à la lumière à des concentrations de 20  $\mu\text{M}$ , pour des expositions de 5, 30, 45 et 90 minutes.

Temps <sup>a</sup> (min.)	Fréquence de mutation sans p53 <sup>b</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	Fréquence de mutation avec p53 <sup>c</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	Temps (min.)	Fréquence de mutation sans p53 ( $\times 10^{-3}$ )	Fréquence de mutation avec p53 ( $\times 10^{-3}$ )
5	7,8	4,0	45	17,9	11,1
	6,8	3,5		13,5	7,2
	4,2	8,5		26,3	20,8
	5,4	7,9		11,8	5,7
	7,5	5,1		13,3	12,3
	4,1	3,3		10,2	9,9
	8,8	14,1			
30	16,1	10,0	90	52,6	35,7
	29,4	14,3		19,2	20,8
	13,2	14,7		38,5	21,7
	8,5	7,3		20,4	14,9
	10,3	9,3		22,2	10,2
	8,3	6,0		21,7	13,7
	8,9	5,1			

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct du vecteur pYZ289 et la valeur de fréquence a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>L'inscription sans p53 signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>c</sup>L'inscription avec p53 signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

**Tableau 2.** Fréquences de mutation obtenues des traitements au BM et à la lumière à des concentrations de 200  $\mu\text{M}$ , pour des expositions de 5, 30, 45 et 90 minutes.

Temps <sup>a</sup> (min.)	Fréquence de mutation sans p53 <sup>b</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	Fréquence de mutation avec p53 <sup>c</sup> ( $\times 10^{-3}$ )	Temps (min.)	Fréquence de mutation sans p53 ( $\times 10^{-3}$ )	Fréquence de mutation avec p53 ( $\times 10^{-3}$ )
5	8,8	10,5	45	31,3	90,9
	5,7	8,5		17,2	14,1
	5,9	9,6		16,9	8,5
	7,2	5,9		13,7	17,5
	4,7	13,3		27,8	12,0
	6,6	2,6		15,9	9,3
	7,7	13,7			
30	24,4	35,7	90	58,8	29,4
	9,7	10,5		34,5	45,5
	8,4	8,3		37,0	11,0
	14,9	40,0		23,8	21,7
	8,4	20,4		50,0	21,3
	14,9	11,4		32,3	15,6
	28,6	13,2		43,5	111,1

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct de pYZ289 et la valeur de fréquence a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>L'inscription sans p53 signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>c</sup>L'inscription avec p53 signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

**Tableau 3.** Fréquences de mutation obtenues lors d'électroporations différentes pour des traitements au BM à 20  $\mu\text{M}$  pour des durées de 45 minutes, en absence de p53.

Traitements distincts	Fréquence de mutation d'électroporations différentes ( $\times 10^{-3}$ )
1	17,5 18,2
2	11,8 14,3
3	27,8 23,8
4	12,7 10,6
5	16,1 10,8
6	6,0 6,4
7	10,0 10,4

**Tableau 4.** RFM pour les traitements au BM à des concentrations de 20  $\mu$ M, pour différentes durées ainsi que la moyenne des RFM pour chaque traitement.

Temps <sup>a</sup> (min.)	RFM <sup>b</sup> -p53 <sup>c</sup> / +p53 <sup>d</sup>	Moyenne des RFM <sup>e</sup>	Temps (min.)	RFM -p53 / +p53	Moyenne des RFM
5	1,9	1,2	45	1,6	1,5
	1,9			1,9	
	0,5			1,3	
	0,7			2,1	
	1,5			1,1	
	1,3			1,0	
	0,6				
30	1,6	1,4	90	1,5	1,6
	2,0			0,9	
	0,9			1,8	
	1,2			1,4	
	1,1			2,2	
	1,4			1,6	
	1,8				

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct de pYZ289 et la valeur de fréquence a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>La RFM est la diminution de la fréquence de mutation par p53, c'est-à-dire les rapports des fréquences de mutation en absence et en présence de p53.

<sup>c</sup>L'inscription -p53 signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>d</sup>L'inscription +p53 signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

<sup>e</sup>La moyenne des RFM a été calculée pour tous les traitements faits pour un même temps.



**Tableau 5.** RFM pour les traitements au BM à des concentrations de 200  $\mu$ M, pour différentes durées ainsi que la moyenne des RFM pour chaque traitement.

Temps <sup>a</sup> (min.)	RFM <sup>b</sup> -p53 <sup>c</sup> / +p53 <sup>d</sup>	Moyenne des RFM <sup>d</sup>	Temps (min.)	RFM -p53 / +p53	Moyenne des RFM
5	0,8	1,0	45	0,3	1,4
	0,7			1,2	
	0,6			2,0	
	1,2			0,8	
	0,4			2,3	
	2,6			1,7	
	0,6				
30	0,7	1,0	90	2,0	1,7
	0,9			0,8	
	1,0			3,3	
	0,4			1,1	
	0,4			2,3	
	1,3			2,1	
	2,2			0,4	

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct du vecteur pYZ289 et la valeur de fréquence a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>La RMF est la diminution de la fréquence de mutation par p53, c'est-à-dire les rapports des fréquences de mutation en absence et en présence de p53.

<sup>c</sup>L'inscription -p53 signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>d</sup>L'inscription +p53 signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

<sup>e</sup>La moyenne des RFM a été calculée pour tous les traitements faits pour une même durée.

### 3.1.3 Traitements aux rayons UVA

Le traitement aux UVA a été mis au point au laboratoire par C. Courtemanche selon les méthodes décrites par Yagi et coll. (1994), Protic-Sabljić et Kremer (1985) et Ito et coll. (1993). L'ADN du vecteur navette pYZ289 était mis en présence de riboflavine et exposé aux UV d'une longueur d'onde de 366 nm. La riboflavine photoexcitée va s'attaquer entre autres aux guanines de l'ADN pour provoquer des lésions 8-oxoG (Ito et coll., 1993).

Les traitements ont été faits pour trois temps d'exposition différents. Plusieurs traitements identiques, de même durée, ont été répétés, et les résultats des fréquences de mutation obtenues sont des compilations de deux ou trois électroporations distinctes. Le tableau 6 présente les fréquences de mutation obtenues en présence ou en absence de p53 pour des traitements aux UVA de 3, 20 ou 60 minutes. Ce tableau présente aussi les RFM ainsi que la moyenne des RFM, pour chaque groupe de traitements.

D'après ces résultats, il est d'abord possible de constater que les fréquences de mutation sont de plus en plus importantes lorsqu'on augmente le temps d'exposition des échantillons. Il faut cependant spécifier qu'il y a des variations dans les fréquences de mutation pour des traitements tout à fait identiques.

On observe aussi que dans la plupart des cas, la présence de p53 permet une diminution de la fréquence de mutation de façon plus ou moins importante. Pour ce qui est des RFM, il semble que pour les trois traitements différents, soit à 3, 20 et 60 minutes d'exposition aux UVA, il y aurait une influence de p53, la moyenne étant supérieure à 1. On pourrait même aller jusqu'à suggérer que cette influence serait plus importante à de courtes durées de traitement, comparativement à de plus longues durées. Il faut toutefois spécifier que l'écart entre les moyennes est très faible, donc pas nécessairement véritablement présent.

Des analyses statistiques ont ici aussi été faites sur les résultats, après standardisation. Cette standardisation est la même que pour les traitements au BM (section 3.1.2). La méthode

d'analyse a ici aussi été la GLM, sauf pour le traitement à 5 minutes où c'est la méthode de Kruskal-Wallis qui a été choisie, celle-ci étant utilisée pour détecter des différences plus faibles. Ici aussi, les écarts entre les fréquences de mutation avec et sans p53 sont significatives, soit avec des valeurs de p de 0,007 à 5 et 60 min. et de 0,004 à 20 min.

**Tableau 6.** Fréquences de mutation des traitements aux UVA (366 nm) en présence de riboflavine, pour des expositions de 3, 20 ou 60 minutes, ainsi que les RFM et leurs moyennes, pour chaque traitement différent.

Temps <sup>a</sup> (min.)	Fréquence de mutation sans p53 <sup>b</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	Fréquence de mutation avec p53 <sup>c</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	RFM <sup>d</sup> -p53 <sup>b</sup> / +p53 <sup>c</sup>	Moyenne des RFM <sup>e</sup>
3	1,4	1,6	0,9	1,8
	3,5	3,2	1,1	
	7,4	4,0	1,9	
	11,1	2,6	4,4	
	4,3	4,4	1,0	
	5,2	4,2	1,2	
	3,9	1,7	2,2	
20	5,6	4,3	1,3	1,5
	5,9	4,9	1,2	
	8,3	7,6	1,1	
	11,2	5,7	2,0	
	12,4	5,8	2,1	
	15,8	10,5	1,5	
	8,2	7,1	1,2	
60	25,7	17,2	1,5	1,5
	60,3	35,8	1,7	
	40,4	38,7	1,0	
	136,3	62,9	2,2	
	15,7	13,0	1,2	
	15,7	14,8	1,1	

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct du vecteur pYZ289 et la valeur de la fréquence de mutation a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>L'inscription sans p53 (ou -p53) signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>c</sup>L'inscription avec p53 (ou +p53) signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

<sup>d</sup>La RFM est la diminution de la fréquence de mutation par p53, c'est-à-dire les rapports des fréquences de mutation en absence et en présence de p53.

<sup>e</sup>La moyenne des RFM a été calculée pour tous les traitements faits pour une même durée.

### 3.1.4 Traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

C'est C. Courtemanche qui a mis le traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au point, au laboratoire, en s'inspirant de la méthode décrite par Moraes et coll. (1989). Le vecteur navette pYZ289 est ici mis en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour des durées de 3, 30 ou encore 60 minutes. Des traitements distincts, mais dans des conditions identiques ont été faits pour chaque durée. Les fréquences de mutation proviennent de deux à quatre électroporations additionnées. Dans le tableau 7 sont présentées les fréquences de mutation obtenues après traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pour des échantillons en absence ou en présence de p53. Les RFM ainsi que la moyenne de ces rapports y sont aussi retrouvées, pour chaque durée de traitement.

Comme attendu, les fréquences de mutation obtenues pour les traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont plus importantes pour de plus longues durées de traitement. On retrouve encore une fois des variations entre traitements identiques, pour ce qui est de la valeur des fréquences de mutation.

En comparant les fréquences de mutation, il semble qu'il y ait toujours une diminution en présence de p53 par rapport à lorsqu'elle n'est pas présente. Les moyennes des rapports ont ici tendance à être supérieures à un, donc on observe une influence de p53 dans ces résultats.

Les variations dans les fréquences de mutation ne sont cependant pas statistiquement significatives, selon des analyses faites sur les résultats standardisés, sauf pour les traitements de 3 minutes. En effet, la valeur de p obtenue par le méthode Kruskal-Wallis à 3 min. est de 0,02, cette valeur est de 0,06 et de 0,12 à 30 et 60 min. respectivement (selon la méthode GLM).

**Tableau 7.** Fréquences de mutation des traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration de 88 mM pendant 3, 30 ou 60 minutes, ainsi que les RFM et leurs moyennes, pour chaque traitement différent.

Temps <sup>a</sup> (min.)	Fréquence de mutation sans p53 <sup>b</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	Fréquence de mutation avec p53 <sup>c</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	RFM <sup>d</sup> -p53 <sup>b</sup> / +p53 <sup>c</sup>	Moyenne des RFM <sup>e</sup>
3	9,0	2,4	3,7	2,1
	5,0	3,2	1,5	
	5,9	2,2	2,6	
	11,2	4,3	2,6	
	4,8	5,5	0,9	
	7,3	7,3	1,0	
30	3,0	1,9	1,6	1,2
	19,8	19,4	1,0	
	15,3	16,0	1,0	
	50,5	49,7	1,0	
60	12,8	6,3	2,0	1,6
	15,3	5,3	2,9	
	21,6	25,6	0,9	
	22,5	31,5	0,7	

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct du vecteur pYZ289 et la valeur de la fréquence de mutation a été obtenue à partir de deux à quatre électroporations.

<sup>b</sup>L'inscription sans p53 (ou -p53) signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>c</sup>L'inscription avec p53 (ou +p53) signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

<sup>d</sup>La RFM est la diminution de la fréquence de mutation par p53, c'est-à-dire les rapports des fréquences de mutation en absence et en présence de p53.

<sup>e</sup>La moyenne des RFM entre les fréquences de mutation a été calculée pour tous les traitements faits pour une même durée.

### 3.1.5 Traitements au MMS

Le traitement au MMS a été mis au point selon les méthodes décrites par Ogawa et coll. (1997) et Justus et Thomas (1998), en testant différentes concentrations d'agent. Ainsi, des traitements de 2  $\mu\text{M}$  à 2 M ont été utilisés et deux ont été choisis pour avoir des fréquences de mutation plus élevées que le bruit de fond tout en permettant d'obtenir des quantités appréciables de colonies. C'est ainsi que les concentrations de MMS ont été établies à 20 et 200 mM pour les fins de l'expérimentation.

Les résultats des fréquences de mutation obtenues en absence et en présence de p53 ainsi que les RFM sont présentés au tableau 8. Les résultats pour un même traitement ont été obtenus de deux ou trois électroporations différentes, et il y a eu plusieurs répétitions de traitements (quatre ou cinq) faits dans les mêmes conditions.

Il est d'abord possible d'observer qu'il y a ici aussi variation dans les fréquences de mutation, pour des traitements identiques, mais distincts. Cependant, il est tout de même possible de constater la présence d'une diminution des fréquences de mutation en présence de p53, dans la majeure partie des traitements, étant donné que les valeurs de RFM sont supérieures à un. Il semble que les RFM soient plus importantes à une forte concentration de MMS, soit à 200 mM car les analyses statistiques sur les résultats standardisés démontrent une influence significative de p53 pour les fréquences de mutation des traitements à 200 mM ( $p = 0,003$ ), mais non à 20 mM ( $p = 0,5$ ).

**Tableau 8.** Fréquences de mutation des traitements au MMS à des concentrations de 20 et 200 mM, pour des durées de 30 minutes, ainsi que les RFM et leurs moyennes, pour chaque traitement différent.

Concentration <sup>a</sup> (mM)	Fréquence de mutation sans p53 <sup>b</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	Fréquence de mutation avec p53 <sup>c</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	RFM <sup>d</sup> -p53 <sup>b</sup> / +p53 <sup>c</sup>	Moyenne des RFM <sup>e</sup>
20	5,5	2,4	2,3	1,5
	10,0	14,3	0,7	
	15,4	15,6	1,0	
	11,8	6,5	1,8	
	8,0	5,5	1,5	
200	26,3	5,8	4,5	2,7
	29,4	13,0	2,3	
	13,2	6,0	2,2	
	11,8	6,5	1,8	

<sup>a</sup>Pour une même durée de traitement, chaque ligne correspond à un traitement distinct du vecteur pYZ289 et la valeur de la fréquence de mutation a été obtenue à partir de deux ou trois électroporations.

<sup>b</sup>L'inscription sans p53 (ou -p53) signifie que le traitement a eu lieu en absence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur contrôle pECMmutk.

<sup>c</sup>L'inscription avec p53 (ou +p53) signifie que le traitement a eu lieu en présence de p53, donc que le vecteur pYZ289 a été cotransfecté avec le vecteur d'expression de p53, soit pECM53k.

<sup>d</sup>La RMF est la diminution de la fréquence de mutation par p53, c'est-à-dire les rapports des fréquences de mutation en absence et en présence de p53.

<sup>e</sup>La moyenne des RFM a été calculée pour tous les traitements faits pour une même durée.



## 3.2 Discussion

Avant de procéder aux expérimentations concernant l'influence de p53 sur la fréquence de mutation ponctuelle causée par divers agents, il était indispensable de vérifier les vecteurs qui devaient être utilisés. En fait, il ne s'agissait là que de confirmations du bon état des plasmides et de leur expression, étant donné que ces vérifications avaient déjà été faites dans le laboratoire (Courtemanche et Anderson, 1999).

C'est tout d'abord pour observer la présence de p53 lors de la transfection du vecteur d'expression de la protéine, soit pECM53k, que des études de détection de p53 ont été faites. C'est par immunofluorescence que cette détection a été possible. En fait, c'est après 24 heures d'incubation, que l'immunofluorescence a été faite, et elle a pu démontrer la présence de la protéine p53 après la transfection des cellules (10)3 par pECM53k ainsi que par pCMV53k, mais non pour pECMmutk, le témoin négatif (figure 1). Le vecteur pECM53k est celui utilisé dans les expérimentations, ce qui confirme que p53 est bien synthétisée dans les cellules (10)3 transfectées. pCMV53k a ici servi de contrôle positif pour la détection étant donné que ce vecteur contient un fort promoteur, soit celui du cytomégalovirus. Enfin, le vecteur contrôle négatif, pECMmutk ne permet pas la synthèse de p53. Ces résultats étaient attendus, car la séquence codante de p53 a été déléetée de ce vecteur.

En plus de confirmer la présence de p53, il a aussi été possible de démontrer son activité. En effet, des résultats déjà connus ont pu être reproduits pour observer l'activité de p53. Ce sont des traitements au BPDE, où il y a diminution de la fréquence de mutation causée par cet agent en présence de p53, qui ont permis de confirmer que la protéine obtenue du vecteur pECM53k était fonctionnelle. Il a ainsi été possible d'observer une diminution de plus de la moitié des dommages provoqués par le BPDE, lors de l'ajout de p53.

La méthode de transfection utilisée dans nos expérimentations a démontré une efficacité de 5 à 6 %. Ce rendement est appréciable, étant similaire à celui obtenu précédemment au laboratoire, avec cette méthode.

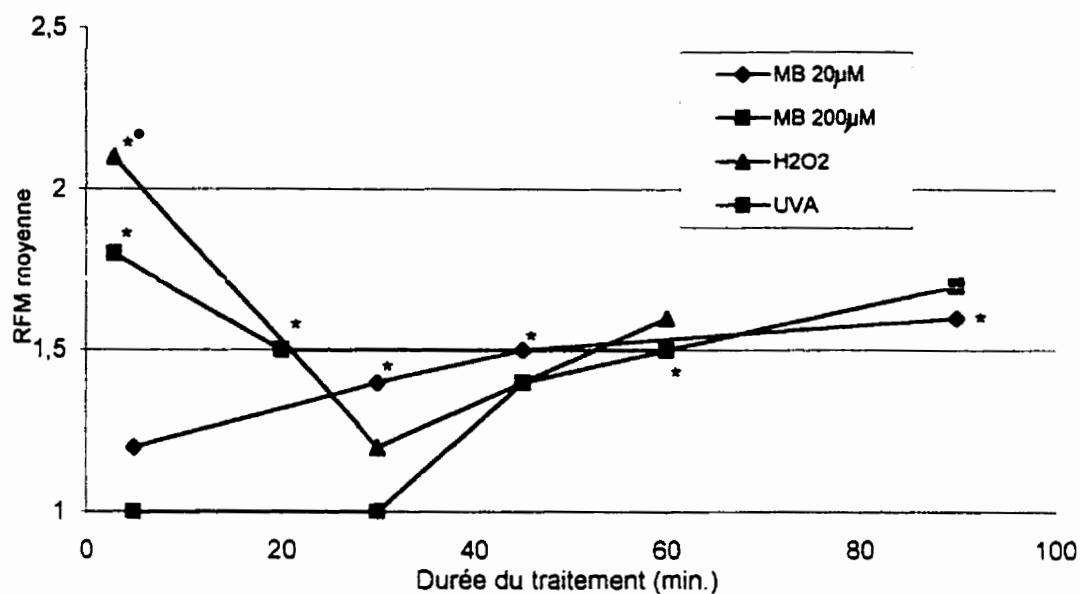
Les résultats de l'influence de p53 sur les fréquences de mutation causées par différents agents, ont tous été comparés entre eux. Pour l'analyse, un résumé a été fait pour bien observer les différents résultats obtenus. Ainsi, les diminutions des fréquences de mutation pour les produits utilisés en mutagénèse sont présentées à la figure 4.

Pour pouvoir bien analyser l'influence de p53 pour certaines mutations ponctuelles causées par différents agents, et pour proposer des hypothèses, il est indispensable de prendre en considération les résultats d'expérimentations antérieures du laboratoire. Ainsi, l'annexe A résume les résultats obtenus par Courtemanche et Anderson (1999).

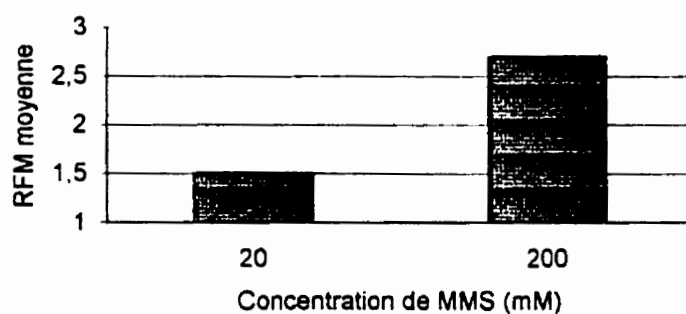
En fait, Chantal Courtemanche a testé quatre autres agents causant des mutations ponctuelles à l'ADN. Il s'agit des UVC, de l'AFB1, du BPDE et du CPBA. La synthèse de ses résultats est que, premièrement, p53 ne permet pas de réduction de la fréquence de mutation causée par les UVC. Il y a cependant diminution des fréquences de mutation par p53 pour les lésions provoquées par les trois autres agents, mais avec certaines différences. En effet, cette diminution semble être dépendante de la concentration d'agent. Pour l'AFB1 et le BPDE, la diminution de la fréquence est plus importante à une forte concentration, tandis que pour le CPBA, c'est à faibles doses que l'influence de p53 est la plus importante.

Pour ce qui est des résultats pour les traitements au BM, aux UVA, au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi qu'au MMS (figure 4) on peut les résumer ainsi. p53 peut diminuer de façon significative les fréquences de mutation causées par le BM en présence de lumière à 20 µM pour des traitements de 30, 45 et 90 minutes, ce qui n'est pas le cas à des concentrations de 200 µM de BM. Il y a aussi influence de p53 pour des expositions aux UVA de 3, 20 et 60 minutes en présence de riboflavine. Ce n'est cependant qu'à faible temps de mise en contact avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit 3 minutes, qu'on peut détecter une diminution significative de la fréquence de mutation causée par p53. Enfin, une forte concentration de MMS, soit 200 mM cause des dommages qui peuvent être reconnus de façon importante par p53.

a)



b)



**Figure 4.** Diminution des fréquences de mutation par p53 pour les différents agents utilisés en mutagenèse, soit le BM en présence de lumière visible et d'oxygène (a), les rayons UVA en présence de riboflavine (a), le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) ainsi que le MMS (b), selon la concentration d'agent utilisée ou le temps du traitement. Les astérisques identifient les résultats significatifs, soit où la différence entre les fréquences de mutation avec et sans p53 est significative. Les valeurs de p pour les résultats significatifs sont les suivantes : MB 20 µM à 30 min. : 0,013, à 45 min. : 0,012 et à 90 min. : 0,006; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 min. : 0,02 ; UVA à 5 min. : 0,007, à 20 min. : 0,004 et à 60 min. : 0,007 ; MMS à 200 mM : 0,003.

De façon générale, pour tous les traitements de mutagenèse effectués, il est possible d'observer une plus grande quantité des dommages à des concentrations plus importantes d'agent ou à de plus longues durées d'exposition. Ces augmentations s'expliquent par le fait que plus un agent est en grande quantité, plus de molécules pourront s'attaquer à l'ADN et l'attaque sera d'autant plus dommageable si le temps d'exposition est augmenté.

Il y a aussi les variations dans les fréquences de mutation entre traitements identiques qui se doivent d'être expliquées. En fait, il semble que la concentration d'agent et le temps d'exposition ne soient pas les seuls facteurs ayant une influence sur les quantités de dommages causés lors du traitement. Il faut aussi spécifier que les électroporations différentes pour un même traitement ne démontrent pas de variation importante (tableau 3). Ce n'est donc pas l'électroporation qui est responsable de ces variances dans les données. D'autres variables, hors de notre contrôle, doivent aussi jouer un rôle lors du processus de mutagenèse.

Il faut ainsi analyser les résultats obtenus non pas en comparant les fréquences elles-mêmes, mais plutôt en observant les variations de ces fréquences en absence versus en présence de p53. Pour cette raison, il est essentiel de standardiser les résultats obtenus avant de procéder à une analyse statistique.

Lors de la mise au point du traitement au BM, les concentrations d'agent choisies ont été de 20 et 200  $\mu\text{M}$ , ces dernières nous permettant d'obtenir des fréquences de mutation plus importantes que le bruit de fond, soit la fréquence de mutation spontanée qui est de  $1 \times 10^{-3}$  chez pYZ289 (figure 2). Il a été remarqué qu'à des concentrations élevées, il était difficile d'obtenir des résultats valables, les comptes étant trop faibles. En fait, le BM en solution est un agent visqueux. À une forte concentration, il y a formation d'amas de BM, ceci ne permettant donc pas une répartition uniforme de l'agent dans la solution d'ADN. De plus, lors de l'extraction phénol/chloroforme, pour séparer le BM du vecteur navette, il y avait des pertes importantes d'ADN. Il était ainsi possible de supposer qu'une certaine quantité de plasmide restait emprisonnée dans les amas de BM.

Étant donné qu'il était difficile de faire varier les quantités de BM utilisées pour le traitement, c'est le temps d'exposition qui a été sujet au changement (figure 3). Les traitements suivants ont donc été de 5, 30, 45 et 90 minutes, ces durées ayant été sélectionnées de manière à avoir un bon éventail de fréquences de mutation.

Les tableaux 1 et 2 présentent les résultats obtenus pour les traitements au BM. On y retrouve les fréquences de mutation en absence de p53 et en présence de p53, pour un même traitement.

Dans la plupart des cas, il y a diminution de la fréquence de mutation en présence de p53, sauf pour quelques exceptions, qui sont principalement retrouvées dans le cas de traitements de 5 minutes. Pour mieux comparer ces fréquences de mutation avec et sans p53, et ainsi pouvoir constater l'effet de p53 sur les dommages causés, des rapports ont été faits, soit les valeurs de RFM. Les tableaux 4 et 5 portent sur les RFM obtenues.

Premièrement, pour les traitements à 20  $\mu\text{M}$  de BM, il semble y avoir un petit effet de p53. En effet, il est possible d'observer une petite diminution de la fréquence de mutation en présence de p53. D'après les études statistiques faites, ces variations sont significatives à 30, 45 et 90 minutes. Cependant la variation n'est pas significative après 5 minutes de traitement. Évidemment, les variations significatives retrouvées ne sont pas énormes mais elles sont présentes et non-négligeables. Il s'agit en fait de diminutions des fréquences de mutation à peu près de moitié en présence de p53. On peut aussi remarquer que cette diminution a tendance à être plus importante à une plus forte concentration d'agent, mais cette tendance n'est cependant pas très évidente, selon les résultats obtenus.

Pour les résultats à 200  $\mu\text{M}$  de BM, les observations ne sont pas les mêmes. D'abord, dans ces traitements, les variations dans les répétitions de traitements identiques sont encore plus évidentes qu'à 20  $\mu\text{M}$ . De plus, les analyses statistiques ne permettent pas de dénoter une variation significative entre les traitements en présence et en absence de p53. À cette

concentration, il est donc assez difficile de reproduire les résultats, et il semble que p53 n'a pas d'effet détectable sur les mutations.

Donc, dans le cas d'ADN traité au BM, p53 peut reconnaître les dommages causés par l'agent à 20  $\mu\text{M}$  mais non à 200  $\mu\text{M}$ , du moins, de façon observable dans nos conditions d'expérimentation. Le BM est un agent oxydant qui provoque des dommages oxydatifs sur l'ADN, dont le plus important est la 8-oxoguanine (Schneider et coll., 1990). Ainsi, p53 pourrait reconnaître la base modifiée 8-oxoG et permettre sa réparation, mais pas de façon très importante. De plus, cette reconnaissance serait observable à une faible concentration de BM, mais non à une plus forte concentration. On pourrait essayer d'expliquer ces différences d'influence selon la concentration par une quantité de dommage très importante à 200  $\mu\text{M}$  de BM. Ainsi, il est possible que les lésions retrouvées à une forte concentration soient très abondantes, permettant difficilement l'observation d'une action de p53 dans ces conditions, p53 agissant sur ces dommages non pas de façon radical, mais plutôt faiblement. Ces quantités importantes de dommage pourraient mener à une incapacité de la cellule à la réparation (Agarwal et coll., 1998). Même à 20  $\mu\text{M}$ , la quantité de dommage est peut être déjà très importante, ce qui pourrait expliquer la faible influence de p53.

En ce qui concerne les traitements au BM, il a aussi été possible de vérifier, par séquençage, que les mutations retrouvées après traitement étaient bel et bien des mutations ponctuelles. De plus, l'analyse des mutants a permis d'appuyer l'hypothèse suggérant que les principaux dommages provoqués par le BM et la lumière résultaient principalement (70 % des mutations) en des transversions de G vers T (Boiteux et Radicella, 1998).

Pour les traitements aux rayons UVA en présence de riboflavine, trois conditions différentes ont été à l'étude, soit des durées d'exposition de 3, 20 et 60 minutes. Ces durées ont été choisies parce qu'elles donnent des fréquences de mutation différentes et relativement importantes par rapport au bruit de fond. Le tableau 6 présente les résultats obtenus.

Si on compare les fréquences de mutation qui ont été obtenues en absence de p53 lors du traitement, par rapport aux fréquences en présence de p53, on observe une diminution dans presque tous les cas. Les rapports entre les fréquences de mutation sont eux aussi assez indicatifs quant à l'influence de p53. Il est aisé de constater que p53 a bel et bien un effet sur les mutations, en provoquant une diminution de leur fréquence. Ces variations ne sont cependant pas énormes, mais il s'agit tout de même de diminutions de plus de la moitié pour des traitements de 3 minutes et d'environ de moitié pour des expositions de 20 et 60 minutes. Il est donc évident que l'influence de p53 n'est pas à négliger.

Avec les résultats obtenus, on pourrait se demander si l'influence de p53 serait plus importante à faible durée d'exposition aux UVA, la moyenne des rapports de fréquences de mutation étant légèrement plus grande à 3 qu'à 20 et 60 minutes, ces deux dernières étant les mêmes. Il est difficile de tirer des conclusions à ce sujet étant donné que l'écart n'est pas très grand. On ne peut donc pas affirmer que la diminution est vraiment plus grande à faible exposition, à partir des résultats présentés, mais tout ça reste quand même une hypothèse envisageable.

Enfin, les analyses statistiques viennent confirmer que l'influence de p53 dans le cas de traitements aux UVA est significative. Les dommages causés par exposition aux UVA en présence de riboflavine sont principalement des dommages oxydatifs, dont le principal est la 8-oxoG (Ito et coll., 1993). On peut donc proposer que p53 reconnaît les dommages causés par des agents oxydants, permettant une diminution non négligeable de leur fréquence, dans un système comme le nôtre.

Maintenant, pour les traitements au  $H_2O_2$ , ce sont les durées qui ont été variées, soit pour des mises en contact de l'ADN avec le  $H_2O_2$  de 3, 30 ou encore 60 minutes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Dans ces traitements, certains résultats présentent, entre eux, des variations particulièrement importantes. Il semble donc très difficile de reproduire les résultats dans ce cas-

ci. Il faut évidemment considérer l'ensemble des données, plutôt que les résultats individuels, mais il faudra quand même souligner quelques fréquences de mutation qui semblent contradictoires. Tout d'abord, il est évident qu'il y a diminution de la fréquence de mutation pour des traitements au  $H_2O_2$  de 3 minutes. En effet, les traitements suivent une même tendance à savoir qu'il y aurait une influence de p53 dans ces conditions. Les rapports des fréquences le confirment d'ailleurs, sans compter que leur moyenne est assez importante. En général, il y aurait une diminution de 2 fois des fréquences de mutation en présence de p53, par rapport aux fréquences en absence de p53.

Les résultats ne sont cependant pas aussi clairs pour des traitements au  $H_2O_2$  de plus longue durée. En effet, pour ce qui est des mises en contact de 30 minutes, on observe qu'un seul traitement démontre une diminution de la fréquence de mutation par p53. Pour les autres résultats, il semble que la variation soit pratiquement inexistante. Il est à remarquer que là où cette diminution est observable, la fréquence de mutation est relativement plus faible que les autres, dans des conditions identiques. On peut ainsi se demander si cette variation est présente en raison de cette fréquence moins grande.

Pour les résultats des traitements de 60 minutes, ils sont plutôt bizarres. C'est que la moitié d'entre eux démontre une bonne influence de p53 et l'autre moitié n'a pas cet effet positif de p53. Il faut spécifier que les traitements au  $H_2O_2$  d'une heure étaient probablement très endommageables. En effet, dans ces conditions, les vecteurs étaient souvent très peu nombreux en état de se rendre jusqu'à la fin des étapes de transfection, d'extraction et d'électroporation. Ainsi, on peut supposer que les traitements de 30 et de 60 minutes endommageaient beaucoup l'ADN, voir même trop dans certains cas. Peut-être que dans ces conditions p53 n'est pas apte à permettre la réparation des dommages, ceux-ci étant trop nombreux ou trop importants (Agarwal et coll., 1998). Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus ainsi que la difficulté d'avoir des comptes valables à une plus forte concentration.

On peut donc résumer en supposant que p53 a un effet sur les mutations provoquées par la présence du  $H_2O_2$ , mais ce, pour un temps de traitement relativement court. La diminution



observée est assez importante dans ce cas. Il est cependant difficile de prévoir ce qui se passe à des expositions de l'agent mutagène de plus longue durée; où il ne semble pas y avoir d'effet important de p53. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cause lui aussi des lésions de type oxydatif sur l'ADN (Mello-Filho et Meneghini, 1991). Ainsi, ceci vient confirmer que p53 peut reconnaître ces mutations et ainsi en diminuer la fréquence, mais ce, dans certaines conditions seulement. Il faut aussi spécifier que les analyses statistiques démontrent que la variation des fréquences de mutation avec et sans p53 est significative à 3 minutes, ce qui n'est pas le cas à 30 et 60 minutes.

Le dernier agent à l'étude a été le MMS, dont les traitements ont été faits à 20 et 200 mM, étant donné que des concentrations plus élevées d'agent endommageaient l'ADN de façon trop importante, à en juger par les quantités de colonies obtenues à la toute fin des manipulations. Ainsi, des traitements distincts ont été répétés à 20 et 200 mM de MMS et les résultats obtenus sont présentés au tableau 8.

Ce qui est ici évident, c'est que p53 a un effet sur la fréquence de mutation provoquée par le MMS, particulièrement à une forte concentration. En fait, à une faible concentration de MMS, on observe une petite influence de p53, dans la plupart des résultats, mais en considérant les valeurs dans leur ensemble, il semble que l'effet soit faible. La variation observée en présence de p53 n'est d'ailleurs pas significative, selon les analyses statistiques des résultats standardisés. Cependant, les valeurs obtenues à 200 mM montrent une influence certaine de p53 sur les mutations provoquées par le MMS à cette concentration, et les analyses statistiques le démontrent bien. En effet, les valeurs RFM sont toutes supérieures à 1 et la moyenne est assez importante, soit de 2,7. C'est en réalité la variation la plus impressionnante de toutes les fréquences de mutation obtenues parmi les traitements faits avec les quatre agents à l'étude.

Le MMS est un agent alkylant qui va causer des méthylations sur l'ADN (Glaab et coll., 1999). Ainsi, il semble que les dommages retrouvés, soit le N7-meG, le N3-meA et le O6-meG, qui mènent à la formation de sites abasiques (Karran et coll., 1980), soient reconnus par p53, qui pourra permettre leur réparation.

En ce qui concerne la réparation de l'ADN, des études ont démontré l'importance de p53 pour le fonctionnement de la NER (McKay et coll., 1999; Wani et coll., 1999). Les travaux sur la BER sont cependant moins nombreux et les connaissances plus restreintes. Toutefois, certains groupes de recherche suggèrent l'implication de p53 dans ce système (Jayaraman et coll., 1997; Gaiddon et coll., 1999; Offer et coll., 1999). Il est connu que la BER est d'une grande importance pour la réparation des dommages causés par, entre autres, les agents alkylants et certains agents oxydants (Loeb et Preston, 1986; Seeberg et coll., 1995). Les résultats du laboratoire tendent à appuyer cette influence de p53 sur la BER. En effet, le MMS fait partie de ces agents, causant des méthylations sur l'ADN, et nous avons pu observer une diminution des mutations qu'il cause par p53. En supposant que c'est la BER qui est impliquée dans la réparation de ces lésions, on peut poser comme hypothèse l'implication de p53 dans ce système.

Pour ce qui est des résultats avec les trois premiers agents, soit le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ce qui est particulièrement frappant, c'est le faible effet de p53 sur les fréquences de mutation. Normalement, les lésions causées lors de ces traitements devraient être en partie ou en totalité reconnues par la BER, étant des dommages oxydatifs. Ainsi, on peut se questionner sur l'importance de la BER dans ce cas-ci, l'influence de p53 étant relativement faible. On peut donc se demander si la BER a la même efficacité pour la réparation de différents types de dommages. Peut-être que son effet est plus important dans le cas d'ADN méthylé que d'ADN oxydé. De plus, si on propose que p53 est impliqué dans la BER, on peut supposer qu'il est directement impliqué dans la reconnaissance des dommages. Ainsi, il est possible que l'efficacité de la BER dépende de p53. Ceci nous amène à envisager que la différence entre les diminutions des fréquences de mutation pour le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport au MMS pourrait s'expliquer par l'activation plus ou moins importante de p53 par les dommages causés par ces agents.

En fait, dans notre système, nous avons vérifié la présence de p53 dans les cellules (10)3 après la transfection, mais nous ne connaissons pas son état. Généralement, dans une cellule normale, p53 est rapidement dégradée (Agarwal et coll., 1998). Lorsqu'il y a présence de dommages à l'ADN, il doit y avoir stabilisation de p53, principalement par des modifications

covalentes (Prives, 1998). Ces modifications empêcheront la dégradation de p53 par Mdm2 en diminuant leur interaction (Levine, 1997) et augmentera l'activité transcriptionnelle de p53 (Prives, 1998). Ceci pourra permettre, entre autres, la réparation des dommages à l'ADN. Dans notre système, p53 n'est pas présent lors du traitement de mutagenèse, il est seulement mis en présence d'ADN endommagé par les agents utilisés. Il est connu que p53 peut reconnaître directement une lésion sur l'ADN, mais cette reconnaissance peut probablement varier selon le type de dommage présent (McKay et coll., 1999). Donc, p53 est peut-être induit de façon variable selon les lésions prémutationnelles présentes, ce qui influencerait l'action de la BER, donc l'efficacité de réparation. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, la faible influence de p53 pour les traitements au BM, aux UVA et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comparativement au MMS.

Enfin, en mettant tous ces résultats ensemble, on peut en tirer quelques hypothèses (figure 4). L'utilisation de trois agents oxydants, soit le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui causent des lésions oxydatives à l'ADN dont la principale est la 8-oxoG, nous permet de penser que p53 peut reconnaître ce type de dommage, mais de façon plus ou moins importante. Ces reconnaissances semblent dépendre de l'agent en question, mais aussi de la concentration utilisée pour le traitement. L'étude d'un agent alkylant, le MMS, laisse supposer que p53 pourrait reconnaître les dommages causés par ce type d'agent, du moins à une plus forte concentration, et ce, de façon plus importante que dans le cas des dommages oxydatifs.

Finalement, pour pouvoir tirer des hypothèses quant à quels types de dommages peuvent être reconnus par p53, il faut prendre en considération les résultats avec les nouveaux agents utilisés mais aussi ceux qui ont été à l'étude précédemment au laboratoire, soit les UVC, l'AFB1, le BPDE et le CPBA (Courtemanche et Anderson, 1999).

On peut d'abord remarquer que Courtemanche et Anderson (1999) ont obtenu des RFM très impressionnantes, allant jusqu'à des valeurs de près de 5. Il faut cependant spécifier qu'ils réussissaient à atteindre des fréquences de mutation causées par les agents beaucoup plus élevées que celles avec les nouveaux agents à l'étude. Ainsi, il est possible que ces différences dépendent directement des agents utilisés pour la mutagenèse, mais de petites variations

techniques pourraient aussi être à l'origine de ces résultats. Il semble que la première explication soit la plus probable, à en juger par les résultats reproduits lors du traitement au BPDE.

L'hypothèse qui avait été formulée par Courtemanche et Anderson (1999) à partir des données déjà recueillies au laboratoire était que p53 pouvait entre autres reconnaître les dommages de type oxydatif. De plus, ils proposaient que les dommages causés par les UVC, soit les liaisons entre les bases (dimères de pyrimidines) n'étaient pas reconnues par p53. Suite aux nouveaux résultats obtenus, l'hypothèse posée a été légèrement modifiée ou plutôt précisée.

En effet, en analysant tous les résultats dans leur ensemble, il semble que p53 pourrait reconnaître plus d'un type de dommage à l'ADN. Étant donné la diminution de fréquence de mutation à une forte concentration de BPDE et d'AFB1, il semble que p53 pourrait reconnaître les adduits sur l'ADN provoqués par ces agents. Une partie de cette diminution pourrait aussi être attribuable, en partie, à une certaine quantité de dommages oxydatifs causés par ces agents, mais on ne peut probablement pas considérer que cette diminution n'est que le résultat de la réparation de dommages oxydatifs. Les traitements au CPBA, au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au BM et aux UVA viennent appuyer l'hypothèse que p53 reconnaîtrait, de façon plus ou moins importante les lésions oxydatives (particulièrement à une faible concentration de CPBA et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de façon moins prononcée à de faibles expositions d'UVA et à de fortes concentration de BM). De plus, p53 pourrait reconnaître les méthylations à l'ADN (forte concentration de MMS) mais non les dimères de pyrimidines (UVC).

## CHAPITRE 4

### UTILISATION D'INHIBITEURS

#### 4.1 Résultats

Certains agents utilisés en mutagenèse ont été mis en présence d'inhibiteurs de dommages oxydatifs. Les traitements avec le CPBA, le BM, le BPDE, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les UVA et les UVC ont été faits dans les mêmes conditions décrites précédemment, pour traiter le vecteur navette pYZ289, mais en ajoutant des inhibiteurs dans les réactions, soit la catalase, le defferioxamine mesylate, le DMSO, le mannitol ou la SOD.

Les résultats obtenus dans ces différents traitements sont présentés au tableau 8. Certaines données proviennent de résultats non-publiés qui ont été obtenus au laboratoire (UVC par Christian Roberge et confirmation du BPDE et CPBA; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et UVA par Chantal Courtemanche). Les détails des différentes conditions de traitement sont présentés dans le chapitre 3, soit dans la partie Matériel et méthodes. Pour chaque agent, les différentes colonnes du tableau sont des résultats de traitements distincts, fait dans des conditions identiques.

Pour chaque traitement, les fréquences de mutation du témoin ainsi que de chaque échantillon en présence d'inhibiteur sont données, ainsi que le facteur d'inhibition (FI). Cette valeur est le rapport de la fréquence de mutation en absence d'inhibiteur sur celle en présence d'inhibiteur. Cette valeur a été obtenue en divisant la fréquence de mutation du témoin par celle de chacun des échantillons. Pour la plupart des traitements les expérimentations ont été faites plus d'une fois. Cependant, le nombre de répétitions est insuffisant pour procéder à des analyses statistiques.

Les résultats suggèrent qu'il y aurait diminution de la fréquence de mutation dans certains traitements en présence de différents inhibiteurs, soit pour le CPBA, le BPDE, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que les UVA. Les variations sont plus ou moins importantes, selon le cas. Pour le CPBA, il semble y avoir influence de la fréquence de mutation principalement en présence de catalase, mais aussi avec le mannitol. Les mutations causées par le BPDE diminuent lorsque le DMSO est ajouté à l'échantillon. Il semble que cette diminution pourrait aussi être possible dans le cas du defferioxamine mesylate, du mannitol et de la SOD. Pour les traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi qu'aux UVA, tous les inhibiteurs ont permis une diminution de la fréquence de mutation, mais de façon plus faible dans le cas du mannitol. Cependant, pour d'autres agents, tel le BM et les UVC, il ne semble pas y avoir de diminution des mutations en présence d'inhibiteurs de dommages oxydatifs.

**Tableau 1.** Fréquences de mutation obtenues après traitement par différents agents, en présence d'inhibiteurs de dommages oxydatifs ainsi que les FI. Le vecteur pYZ289 a été traité soit au CPBA(a), au BM(b), au BPDE(c), au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(d), aux UVA(e) ou aux UVC(f) en présence, sauf dans le cas des témoins, soit de catalase, de defferioxamine mesylate, de DMSO, de mannitol ou de SOD.

a) CPBA<sup>a</sup>

Inhibiteur <sup>b</sup>	Fréquence de mutation <sup>c</sup> (x10 <sup>-3</sup> )	FI <sup>d</sup>
Témoin	3,8	1,0
Catalase	0,5	7,6
Def. Mesylate	2,5	1,5
DMSO	3,0	1,3
Mannitol	1,0	3,8
SOD	5,0	0,8

b) BM

Inhibiteur	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI
Témoin	7,8	1,0	13,8	1,0	15,6	1,0
Catalase	13,2	0,6			11,6	1,3
Def. Mesyl.	5,3	1,5			9,5	1,6
DMSO	7,9	1,0			15,6	1,0
Mannitol			12,7	1,1	14,3	1,1
SOD			13,0	1,1	13,7	1,1

c) BPDE

Inhibiteur	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI
Témoin	5,2	1,0	2,3	1,0	3,1	1,0
Catalase	8,1	0,6	3,7	0,6	4,3	0,7
Def. Mesyl.	2,5	2,1	2,5	0,9	3,9	0,8
DMSO	3,6	1,4	1,8	1,3	2,4	1,3
Mannitol	2,3	2,3	2,3	1,0	4,9	0,6
SOD	3,3	1,6	3,3	0,7	5,6	0,6

d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Inhibiteur	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI
Témoin	21,3	1,0	26,3	1,0
Catalase	1,5	14,2	1,2	21,9
Def. Mesylate	1,9	11,2	1,7	15,5
DMSO	4,5	4,7	1,5	17,5
Mannitol	5,8	3,7	10,9	2,4
SOD	1,4	15,2	5,5	4,8

## e) UVA

Inhibiteur	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI
Témoin	100	1,0
Catalase	11,8	8,5
Def. Mesylate	7,6	13,2
DMSO	29,4	3,4
Mannitol	90,9	1,1
SOD	47,6	2,1

## f) UVC

Inhibiteur	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI	Fréquence de mutation (x10 <sup>-3</sup> )	FI
Témoin	4,7	1,0	4,5	1,0
Catalase	7,1	0,7	4,9	0,9
Def. Mesylate	5,3	0,9	2,8	1,6
DMSO	5,6	0,8		
Mannitol	4,8	1,0	2,1	2,1
SOD	3,4	1,4	3,8	1,2

<sup>a</sup>Les traitements sont décrits à la section Matériel et méthodes (chapitre 2).

<sup>b</sup>Les inhibiteurs ont été utilisés à des concentrations de 0,01 g/ml pour la catalase, de 50 µg/ml pour la superoxyde dismutase, à 0,1 mM pour le defferioxamine mesylate, à 4% de DMSO ou 0,2 M de mannitol.

<sup>c</sup>Chaque colonne de fréquence de mutation pour un même agent est un traitement distinct.

<sup>d</sup>La valeur du FI a été calculée en comparant la fréquence de mutation sans inhibiteur à celle avec inhibiteur.



## 4.2 Discussion

L'utilisation d'inhibiteurs dans les traitements par le CPBA, le BM, le BPDE, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les UVA et les UVC avait pour objectif d'observer les variations des fréquences de mutation en présence de différents agents connus pour inhiber la formation de dommages oxydatifs. Il s'agissait ainsi de confirmer que certains agents utilisés pour la mutagenèse causaient bel et bien des dommages oxydatifs. En testant différents inhibiteurs, on pouvait aussi avoir une idée de la façon ou par quel intermédiaire les dommages oxydatifs étaient causés, dans ces traitements en particulier.

Pour bien analyser les résultats, il faut savoir quels types de dommages sont reconnus pour être causés par les différents agents mutagènes et sur quoi les inhibiteurs de dommages oxydatifs agissent, pour exercer leur inhibition.

En se référant au chapitre 1, il est possible de résumer les dommages causés par les agents utilisés. Pour ce qui est du CPBA, c'est un agent oxydant, donc il causera des lésions oxydatives sur l'ADN (Jacobsen et Humayun, 1986). Ces dommages sont de nombreux types différents, mais le plus abondant est la 8-oxoG. Le BM en présence de lumière visible cause lui aussi des lésions oxydatives, principalement la 8-oxoG (Schneider et coll., 1990). Ces dommages sont causés par l'intermédiaire de l'oxygène singulet, qui réagit directement avec l'ADN (Wiseman et Halliwell, 1996). Pour sa part, le BPDE peut causer lui aussi des dommages oxydatifs mais surtout des adduits sur l'ADN (Friedberg et coll., 1995). Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> va générer le radical OH<sup>•</sup> et c'est ce dernier qui réagira directement avec l'ADN (Moraes et coll., 1989) provoquant des dommages oxydatifs dont la base modifiée 8-oxoG (Mello-Filho et Meneghini, 1991). Enfin, en ce qui concerne les UV, les dommages causés dépendent de leur longueur d'onde. Les UVA peuvent générer des intermédiaires oxydatifs dans les cellules (Tyrrell, 1996) et ainsi provoquer des lésions de type oxydatif. La présence de riboflavine photoexcitée est aussi une autre cause de la présence de ses lésions. En effet, cette dernière pourra s'attaquer à l'ADN pour provoquer la 8-oxoG ou encore générer des ROS (Ito et coll., 1993). Pour leur part, les UVC créeront principalement des photoproduits sur l'ADN (Bohr et coll., 1985; Madhani et coll., 1986).

Au niveau des inhibiteurs, l'action de la plupart de ces agents n'est que partiellement élucidée. En fait, voici les grandes lignes de leur réaction. La catalase peut réduire la quantité de radicaux  $\text{HO}^\bullet$  en agissant directement au niveau du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Friedberg, 1995). Pour ce qui est du defferioxamine mesylate, il va réagir avec l'anion  $\text{O}_2^-$ , formant des composés plus stables (Davies et coll., 1987). Le DMSO est un puissant suppresseur du radical  $\text{HO}^\bullet$  (Moraes et coll., 1989). Le mannitol va inhiber, lui aussi, l'action de radicaux libres, principalement du radical  $\text{HO}^\bullet$  (Desesso et coll., 1994). Enfin, la SOD va catalyser la suppression de l'anion  $\text{O}_2^-$ , réduisant la formation du  $\text{HO}^\bullet$  (McCord et Fridovich, 1969). Évidemment, les inhibiteurs ont des spectres d'action plus ou moins larges, selon le cas. En fait, il n'existe pas d'inhibiteur ultime, donc qui pourrait inhiber toute formation de dommages oxydatifs.

Voici maintenant l'analyse individuelle des effets des différents inhibiteurs sur les fréquences de mutation causées par les agents utilisés en mutagénèse.

Pour ce qui est du CPBA, il semble y avoir eu diminution de la fréquence de mutation par la catalase et le mannitol. Les détails de la production des dommages oxydatifs par le CPBA ne sont pas vraiment connus. Cependant, il semble que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  soit impliqué dans la réaction, étant donné une possibilité d'action pour la catalase. D'autres composés sont sûrement aussi responsables des dommages causés, à en juger par l'influence, toutefois moins considérable du mannitol.

Il faut d'ailleurs spécifier que dès que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est impliqué dans la formation des mutations, d'autres radicaux en découlent. En effet, si le  $\text{H}_2\text{O}_2$  est présent, il pourra être reconnu par la catalase jusqu'à un certain niveau. Cependant, lorsque la catalase n'est pas présente ou l'est en faible quantité seulement, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  générera d'autres radicaux oxydatifs, qui pourront à leur tour en générer d'autres. Ces différents composés pourront être reconnus ou non par certains inhibiteurs spécifiques.

Pour ce qui est du BM, on ne peut observer de diminution des mutations par les inhibiteurs. Il était prévisible que ces inhibiteurs n'auraient pas d'effet étant donné qu'aucun

d'eux n'agit plus particulièrement sur l'oxygène singulet, ce dernier étant l'intermédiaire par lequel le BM cause des lésions à l'ADN. Ainsi, aucun inhibiteur utilisé n'a une spécificité pour cette espèce réactive dérivée de l'oxygène.

En ce qui concerne les traitements au BPDE, en considérant les trois expériences, il est difficile de voir un effet important des inhibiteurs. Il semble toutefois y avoir influence du DMSO. En ne tenant compte que de la première section de résultats, on pourrait se demander si le defferioxamine mesylate, le mannitol et la SOD auraient aussi une influence. Ces résultats n'ont par contre pas pu être confirmés.

Les adduits sur l'ADN causés par le BPDE sont des types de lésions qui n'ont pas pu être évitées par les inhibiteurs de dommages oxydatifs. Cependant, les lésions oxydatives que cet agent est aussi reconnu pour provoquer ont pu être légèrement diminuées par certains inhibiteurs, du moins selon les résultats. De plus, il est possible de supposer que le radical  $\text{HO}^\bullet$  est entre autres impliqué dans cette mutagenèse compte tenu de l'action de la part du DMSO ainsi que possiblement du mannitol et de la SOD.

Pour ce qui est du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , on observe des variations importantes des fréquences de mutation par les inhibiteurs. En effet, tous les agents permettent une diminution particulièrement grande pour la catalase, le defferioxamine mesylate, le DMSO et la SOD, mais aussi une variation plus faible dans le cas du mannitol. Les valeurs de FI sont très grandes en présence de la catalase, cette dernière agissant directement sur le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les autres inhibiteurs agissent probablement plus spécifiquement sur le radical  $\text{HO}^\bullet$  généré par le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ce qui explique les variations tout de même impressionnantes. Pour ce qui est du mannitol, il semble avoir une action moins importante que les autres, du moins dans ces conditions. Il est certain que les inhibiteurs les uns par rapport aux autres peuvent avoir des actions de différentes efficacités, sur différents composés. De plus, il existe sûrement une variété de facteurs qui peuvent jouer sur cette efficacité.

Pour ce qui se rapporte aux UVA, les résultats obtenus sont, pour plusieurs raisons, assez comparables à ceux pour le  $H_2O_2$ . En effet, ce sont ici aussi tous les agents qui permettent une diminution de la fréquence de mutation, mais de façon moindre dans le cas du mannitol. Selon les résultats, il semble que différents inhibiteurs peuvent agir sur les composés qui seraient générés par exposition aux UVA en présence de riboflavine. Ainsi, en plus de la présence de riboflavine photoexcitée, il doit y avoir formation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène qui peuvent être inhibées par soit la catalase, le defferioxamine mesylate, le DMSO, la SOD et de façon moins importante le mannitol.

Enfin, le dernier agent, les UVC, donne des résultats négatifs quant à la diminution de la fréquence de mutation par les inhibiteurs de dommages oxydatifs. Il fallait évidemment s'attendre à ce genre de résultats étant donné que l'exposition aux UVC mène principalement à la formation de dimères de pyrimidines. Ainsi, les inhibiteurs ne peuvent pas exercer leur action dans ce type de traitement, étant donné les lésions qui en découlent.

Pour résumer, les inhibiteurs de dommages oxydatifs ont pu permettre une diminution de fréquences de mutation causées par le CPBA, le BPDE, le  $H_2O_2$  et les UVA. Ces agents provoquent des lésions oxydatives en passant par des intermédiaires qui sont reconnus par les inhibiteurs, ou peuvent être eux-mêmes reconnus par certains de ces inhibiteurs. Pour d'autres agents, soit le BM et les UVC, une telle réduction des lésions n'a pu être décelée. Il est toutefois assez aisé d'expliquer et de comprendre ces différents résultats.

Il serait sans aucun doute avantageux d'avoir un plus grand nombre de données pour un même traitement, car il est parfois subjectif d'évaluer des résultats qui sont plus ou moins confirmés. Il serait évidemment possible de tester d'autres types d'inhibiteurs de dommages oxydatifs, comme par exemple la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et la peroxydase, ou encore d'utiliser des combinaisons de différents inhibiteurs. Ceci permettrait peut-être d'observer d'autres diminutions dans les fréquences de mutation ou encore des diminutions plus importantes, par exemple dans le cas de combinaisons.

Ce qui serait intéressant de faire dans la poursuite de ces expérimentations serait de sélectionner les cas où il y a une diminution importante de la fréquence de mutation par la présence d'un inhibiteur, lors de traitement par un agent particulier. Il s'agirait ensuite de refaire les mêmes traitements, avec inhibiteurs toujours, mais d'y ajouter p53. Ainsi, la transfection de pYZ289 se ferait soit avec le vecteur d'expression de p53, pECM53k, ou encore avec le vecteur contrôle pECMmutk. C'est en comparant ces valeurs qu'on pourrait voir si p53 a encore un effet sur les mutations, en prenant en considération que l'inhibiteur réduit les quantités de dommages oxydatifs. Il serait ainsi possible de poser des hypothèses quant à quels types de dommage seraient ou non reconnus par p53.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les études portant sur p53 ont pris énormément d'ampleur ces dernières années. En fait, l'importance de cette protéine en cancérogénèse n'est plus à démontrer. Son implication dans plus de la moitié des cancers humains en a fait un suppresseur de tumeur des plus importants. Depuis que Lane (1992) a attribué le titre de «gardien du génome» à p53, et même avant, beaucoup de laboratoires ont porté un intérêt particulier à cette protéine. Certains groupes de recherche ont contribué aux connaissances sur le rôle de p53 dans la réparation des dommages à l'ADN. Dans le cas de son influence sur les mutations ponctuelles, peu de choses sont connues et les travaux publiés sont plutôt contradictoires.

C'est sur cet aspect de p53 que s'intéresse notre laboratoire, soit sur l'influence de p53 sur la fréquence des mutations ponctuelles provoquées par divers agents. Suite aux études déjà faites au laboratoire, qui utilisaient les UVC, le CPBA, le BPDE et l'AFB1, d'autres agents ont été choisis pour les travaux qui sont présentés dans ce mémoire, soit le BM en présence de lumière et d'oxygène, les UVA avec riboflavine, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que le MMS.

La méthode utilisée dans cette étude a été mis au point précédemment par Courtemanche et Anderson (1999) et elle est basée sur l'utilisation d'un vecteur navette, pYZ289 (Yagi et coll., 1994) contenant le gène cible pour la mutagenèse *supF*, les origines de répllication nécessaires pour se répliquer chez les cellules de rongeurs et chez les bactéries ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline.

Ce vecteur était soumis à différents traitements *in vitro* par des agents mutagènes, pour ensuite être cotransfecté dans des cellules de mammifères soit avec un vecteur d'expression de p53, pECM53k, ou avec un vecteur contrôle n'exprimant pas p53, pECMmutk. La lignée cellulaire utilisée, des fibroblastes embryonnaires de souris (10)3, est dérivée de la lignée embryonnaire de souris BALB/c et ne possède pas p53 en raison d'une mutation non-sens au codon 173 apparue spontanément (Harvey et Levine, 1991). Dans ces cellules, les lésions prémutationnelles sont converties en mutations. Par la suite, les vecteurs répliqués sont récupérés, purifiés et électroporés dans des bactéries *E.coli* MBM7070 (Seidman et coll., 1985), ces dernières ayant une mutation *amber* dans leur gène *lacZ*. Il est ainsi possible d'identifier les mutants, de les analyser et d'observer si la protéine de p53 influence la fréquence de mutation.

Les études de mutagenèse faites précédemment par Courtemanche et Anderson (1999) impliquaient quatre agents, soit trois agents chimiques, l'AFB1, le BPDE et le CPBA ainsi qu'un physique, les UVC. Les résultats obtenus ont démontré que p53 pouvait diminuer les fréquences de mutation causées par l'AFB1, le BPDE et le CPBA, de façon dépendante de la concentration de l'agent. En effet, cette diminution était plus importante à une plus forte concentration d'AFB1 et de BPDE, et à plus faible de CPBA. Cependant, la fréquence des mutations causées par les UVC ne semblait pas être affectée par p53. Ce dernier résultat appuyant les études d'Ishizaki et coll. (1996) faites avec un système semblable au nôtre.

Suite à ces résultats, des hypothèses ont été posées. En fait, étant donné que p53 induisait une réponse pour une partie des lésions causées par l'AFB1, le BPDE et le CPBA et que ces trois agents avaient pour point commun de causer des lésions oxydatives, il a été proposé que p53 pourrait entre autres reconnaître les dommages oxydatifs sur l'ADN. De plus, il semblait que les liaisons entre les bases, causées ici par les UVC, ne pouvaient pas être reconnues par p53.

C'est suite à ces propositions qu'ont été choisis les nouveaux agents à l'étude, qui font l'objet de ce mémoire. Trois agents causant des lésions oxydatives ont été sélectionnés, soit le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un quatrième agent, le MMS, a aussi été testé, pour avoir un plus grand éventail de produits.

Il y a eu vérification de la présence de p53 dans le système ainsi que de son activité. En fait, étant donné que la méthode utilisée est basée sur la présence de la protéine p53, provenant de son vecteur d'expression, il était nécessaire de faire ces vérifications. C'est par immunofluorescence qu'il a été possible de démontrer clairement la présence de p53 à partir du vecteur pECM53k transfecté dans les cellules (10)3. Par la suite, des expérimentations antérieures répétées, telle le traitement au BPDE, ont démontré la présence d'une protéine p53 active dans notre système.

Le chapitre 3 présente les traitements de mutagenèse faits par la suite qui ont démontré que p53 pouvait diminuer légèrement les dommages causés par le BM, probablement de façon plus importante à plus longue durée d'exposition. Cette diminution des fréquences de mutation était aussi observable dans le cas des traitements aux UVA et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais cette fois-ci de façon plus évidente à une faible concentration. Enfin, les dommages provoqués par le MMS pouvaient aussi être reconnus par p53, mais de façon beaucoup plus importante que pour les trois autres agents, et ce à une plus forte concentration de MMS.

Pour concilier ces résultats avec ceux obtenus par Courtemanche et Anderson (1999), il faut légèrement modifier l'hypothèse de départ. On pourrait ainsi proposer, après analyse de toutes les données disponibles que dans le cas des mutations ponctuelles, p53 pourrait reconnaître les gros adduits sur l'ADN, comme ceux causés par l'AFB1 et le BPDE, qu'il pourrait aussi reconnaître les dommages oxydatifs, mais de façon variable, selon l'agent qui les cause et sa concentration (CPBA, BM, UVA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que les méthylations pourraient aussi être reconnues (MMS) mais que les photoproduits sur l'ADN (UVC) ne provoqueraient pas de réponse par p53.

Ce qui est particulièrement intéressant c'est que les différents agents utilisés causent des lésions qui devraient être reconnues par le système de réparation par excision de bases (BER). En effet, ce mécanisme est connu pour corriger l'alkylation et l'oxydation de l'ADN. Le MMS méthylant l'ADN, le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydant l'ADN, ces dommages devraient être reconnus par la BER. Peu de choses sont connues sur la BER, comparativement au système de



réparation par excision de nucléotides (NER), beaucoup plus étudié. Étant donné que p53 diminue de façon importante la fréquence de mutation causée par le MMS, on peut donc appuyer les travaux de l'équipe de Prives qui proposent que p53 soit impliqué dans la BER (Jayaraman et coll., 1997; Gaidon et coll., 1999) ainsi que ceux de Offer et coll. (1999).

L'effet plutôt faible de p53 dans le cas des dommages causés par le BM, les UVA et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comparativement aux résultats obtenus avec le MMS nous amène à s'interroger sur l'activation de p53. En réalité, dans notre système, nous savons que p53 est synthétisée, mais on ne peut rien affirmer sur son état, à savoir si elle peut être stabilisée et activée en réponse aux dommages présents. En fait, dans une cellule normale, p53 est rapidement dégradée. C'est en réponse à un stress que la protéine est stabilisée, par diminution de sa dégradation et activée, par augmentation de son affinité de liaison à une séquence spécifique d'ADN. Dans notre système, la stabilisation a été vérifiée par western, par Chantal Courtemanche, ce qui n'a pas permis de démontrer une très grande stabilité de la protéine. D'autres expérimentations sont envisagées pour permettre une certaine stabilisation de p53 dans le système et ainsi pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus précédemment. Il est possible que les différents agents utilisés aient des conséquences différentes sur l'induction de p53, ce qui expliquerait son influence variable.

Dans le chapitre 4, des inhibiteurs de dommages oxydatifs ont été ajoutés aux différents traitements, soit la catalase, le defferioxamine mesylate, le DMSO, le mannitol et la SOD. Cette section, un peu en annexe du projet principal avait pris naissance suite à l'hypothèse voulant que les lésions oxydatives pourraient, entre autres, être celles reconnues par p53 (Courtemanche et Anderson, 1999). En utilisant des inhibiteurs de ROS, il était possible de confirmer la formation ou non de dommages oxydatifs, selon le FI observable. En fait, plus la valeur du FI est importante, plus grande est la quantité de dommages oxydatifs supprimer par l'inhibiteur. Les résultats présentés dans ce mémoire permettent d'observer l'effet des inhibiteurs dans les différents traitements. À partir de ces résultats, il serait très aisé de choisir quelques inhibiteurs qui agissent de façon évidente pour réduire les fréquences de mutation provoquées par un agent oxydant en particulier. Par la suite, en ajoutant p53 dans ces traitements, on pourrait observer si l'influence de p53 est encore possible ou non. Ainsi, une bonne partie des dommages oxydatifs

étant éliminés par la présence d'inhibiteurs lors du traitement, si c'est bien ce type de dommage qui est reconnu par p53, son influence ne sera plus observable, ou du moins beaucoup plus négligeable.

Avec les résultats disponibles sur les inhibiteurs, il est possible de vérifier l'importance des dommages oxydatifs par rapport aux adduits causés par traitement au BPDE. En effet, il semble que les adduits soient plus importants, ce qui viendrait appuyer l'hypothèse déjà posée voulant que la diminution de fréquence de mutation par p53 pour ce traitement serait principalement due à la reconnaissance des adduits de BPDE.

Évidemment, plusieurs possibilités seraient envisageables pour la poursuite du projet. En effet, il reste beaucoup de travail à faire pour mieux appuyer les hypothèses posées ainsi que pour approfondir les résultats déjà obtenus. En fait, il faudrait tout d'abord analyser les mutants obtenus pour les divers traitements, par séquençage, pour premièrement démontrer qu'il s'agit de mutations ponctuelles, ce qui devrait être le cas vu le système utilisé, mais surtout pour définir les mutations retrouvées. On pourrait aussi utiliser d'autres agents pour la mutagenèse, pour venir appuyer nos hypothèses à savoir quels dommages sont reconnus ou non par p53.

Un autre objectif du laboratoire est d'améliorer le système à l'étude, qui n'est évidemment pas parfait. Premièrement, nous utilisons un vecteur navette traité et transfecté dans des cellules de mammifères, et nous observons la réparation dépendante de p53 des mutations présentes sur ce vecteur. Nous ne savons cependant pas si cet ADN exogène est soumis au même type de surveillance que l'ADN endogène. Il serait ainsi intéressant d'utiliser un gène endogène, tel *hprt*, afin de comparer les résultats obtenus. Une autre possibilité d'étude serait d'utiliser des cellules de souris p53-négatives ou p53-positives, pour observer l'influence de p53. En fait, en utilisant un vecteur d'expression de p53, il est certain que le niveau de protéine p53 dans la cellule est de beaucoup supérieur au taux physiologique normal dans une cellule soumise à un stress. Ainsi, une expression endogène de p53 permettrait d'obtenir des conditions plus normales physiologiquement. Il y a aussi l'activation de p53 qui attire particulièrement l'attention. En effet, on ne connaît pas l'état de p53 dans notre système à savoir si la protéine est stabilisée et

activée par la présence de dommages. Seule son influence sur la fréquence de mutation nous donne des indices sur son induction, qui semble d'ailleurs varier selon les traitements. Il est donc envisagé de vérifier la stabilité de p53 dans les cellules, par exemple en les traitant préalablement avec soit des agents chimiques ou physiques pour, d'une certaine façon, enclencher le système d'induction de p53, ceci pour ensuite observer si p53 est maintenue plus longtemps dans la cellule et si son influence reste la même dans la reconnaissance des dommages causés par les traitements aux agents déjà utilisés. Il y a aussi la méthode d'extraction qui pourrait être changée (annexe B). Quelques dernières mises au point permettraient probablement de diminuer de beaucoup la durée des manipulations d'extraction, permettant d'obtenir des résultats dans un court laps de temps, ce qui ne pourrait être qu'un avantage pour le projet.

En conclusion, le travail présenté dans ce mémoire représente une contribution pour définir l'influence de p53 sur les mutations ponctuelles. Les hypothèses déjà posées par le laboratoire ont pu être précisées et de nouvelles voies d'étude ont pu être envisagées. Il reste évidemment encore beaucoup de travail à faire pour bien comprendre le rôle de p53 dans la réparation des dommages à l'ADN, mais il faut aussi se rappeler que chaque élément nouveau dans les connaissances sur p53 nous permet de démystifier un peu plus cette protéine qui attire tant d'attention et qui est appelée le "gardien du génome".

## RÉFÉRENCES

1. Abarzua P., LoSardo J.E., Gubler M.L., Spathis R., Lu Y.A., Felix A. and Neri A., Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene* (1996) **13**: 2477-2482
2. Agarwal M.L., Taylor W.R., Chernov M.V., Chernova O.B. and Stark G.R., The p53 network. *J. Biol. Chem.* (1998) **273** : 1-4
3. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. and Lee F.D., Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1973) **70** : 2281-2285
4. Ames B.N., Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radical Res. Commun.* (1989) **7**: 121-128
5. Amundson S.A., Myers T.G. and Fronace A.J., Roles for p53 in growth arrest and apoptosis : putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* (1998) **17** : 3287-3299
6. Anson R.M., Croteau D.L., Stierum R.H., Filburn C., Parsell R. and Bohr V.A., Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* (1998) **26**: 662-668
7. Aoyama T., Yamano S., Guzelian P.S., Gelboin H.V. and Gonzalez F.J., Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) **87**: 4790-4793
8. Araújo S.J. and Wood R.D., Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* (1999) **435** : 23-33
9. Bailey E.A., Iger R.S., Harris T.M. and Essigmann J.M., A viral genome containing an unstable aflatoxin B<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-guanine DNA adduct situated at a unique site. *Nucleic Acids Res.* (1996) **24** : 2821-2828
10. Baker S. and Reddy P., Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* (1998) **17** : 3251-3270
11. Beckman K.B. and Ames B.N., Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** : 19633-19636
12. Bishop J.M., Molecular themes in oncogenesis. *Cell* (1991) **64** : 235-248

13. Bohr V.A., Smith C.A., Okumoto D.S. and Hanawalt P.C., 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* (1985) **40** : 359-369
14. Boiteux S. and Radicella J.P., Réparation de l'ADN et cancer : Les gènes de réparation des bases oxydées dans l'ADN sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs?. *Med. Sci.* (1998) **14** :310-313
15. Bouffler S.D., Kemp C.J., Balmain A. and Cox R., Spontaneous and ionizing radiation-induced chromosomal abnormalities in p53-deficient mice. *Cancer Res.* (1995) **55** : 3883-3889
16. Braithwaite A.W., Strurzbecher H.-W., Addison C., Palmer C., Rudge K. and Jenkins J.R., Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent DNA replication. *Nature* (1987) **329** : 458-460
17. Brash D.E., Sunlight and the onset of skin cancer. *Trends Genet.* (1997) **13** : 410-414
18. Bredberg A., Kraemer K.H. and Seidman M.M., Restricted ultraviolet mutational spectrum in a shuttle vector propagated in *xeroderma pigmentosum* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) **83** : 8273-8277
19. Buchkovich K., Dyson N., Whyte P. and Harlow E., Cellular proteins that are targets for transformation by DNA tumour viruses. *Ciba Found. Symp.* (1990) **150** : 262-271
20. Cederbaum A.I. and Dicker E., Inhibition of microsomal oxidation of alcohols and of hydroxyl-radical-scavenging agents by the iron-chelating agent defferioxamine. *Biochem. J.* (1983) **210** : 107-113
21. Cerutti P.A., Prooxidant states and tumor promotion. *Science* (1985) **227** : 375-381
22. Cherpillod P. and Amstad P.A., Benzo[*a*]pyrene-induced mutagenesis of p53 hot-spot codons 248 and 249 in human hepatocytes. *Mol. Carcinog.* (1995) **13** : 15-20
23. Chin K.V., Veda K., Pastan I. and Gottesman M.M., Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53. *Science* (1992) **255** : 459-462
24. Chu F.S., Mycotoxins : food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat. Res.* (1991) **259** : 291-306

25. Courtemanche C. and Anderson A., The p53 tumor suppressor protein reduces point mutation frequency of a shuttle vector modified by the chemical mutagens ( $\pm$ )7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene, aflatoxin B<sub>1</sub> and meta-chloroperoxybenzoic acid. *Oncogene* (1999) **33** : 4672-4680
26. Courtemanche C., Mutagénèse d'un vecteur navette traité par des agents cancérigènes : influence de la protéine p53 sur la fréquence des mutations ponctuelles. *Mémoire de doctorat* (Juin 1998)
27. Cross S.M., Sanchez C.A., Morgan C.A., Schimke M.K., Ramel S., Idzerda R.L., Raskind W.H. and Reid B.J., A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* (1995) **267** :1353-1356
28. Croteau L.D. and Bohr A.V., Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** : 25409-25412
29. Davies M.J., Donkor R., Dunster C.A., Gee C.A., Jonas S. and Willson R.L., Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide. *Biochem. J.* (1987) **246** : 725-729
30. De Laat W.L., Jaspers N.G.J. and Hoeijmakers J.H.J., Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Dev.* (1999) **13** : 768-785
31. Desesso J.M., Scialli A.R. and Goeringer G.C., D-mannitol, a specific hydroxyl free radical scavenger, reduces the development toxicity of hydroxyurea in rabbits. *Teratology* (1994) **49** : 248-259
32. Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A.K., Moore M., Finlay C. and Levine A.J., Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet.* (1993) **4** : 42-46
33. Dobbelstein M., Wienzek S., Konig C. and Roth J., Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene* (1999) **18** : 2101-2106
34. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A.Jr., Butel J.S. and Bradley A., Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* (1992) **356** : 215-221
35. Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W., High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* (1988) **16**: 6127-6145

36. Dragovich T., Rubin C.M. and Thompson C.B., Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* (1998) **17** : 3207-3213
37. Eaton D.L. and Gallagher E.P., Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1994) **34** : 135-172
38. Eliyahu D., Michalovitz D. and Oren M., Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* (1985) **316** : 158-160
39. Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D. and Oren M., Participation of p53 cellular tumor antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* (1984) **312**: 646-649
40. Fang L., Lee S.W. and Aaronson S.A., Comparative analysis of p73 and p53 regulation and effector functions. *J. Cell. Biol.* (1999) **147** : 823-830
41. Feig D.I., Reid T.M. and Loeb L.A., Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* (1994) **54**: 1890-1894
42. Finlay C.A., Hinds P.W. and Levine A.J., The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* (1989) **57** : 1083-1093
43. Floyd R.A., Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* (1990) **9** : 2587-2597
44. Foster P.L., Eisenstadt E. and Miller J.H., Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B<sub>1</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) **80** : 2695-2698
45. Friedberg E.C., Walker G.C. and Siede W., DNA Repair and Mutagenesis. *American Society for Microbiology Press*, Washington DC (1995)
46. Friend S., p53 : a glimpse at the puppet behind the shadow play. *Sciences* (1994) **265** : 334-335
47. Gaiddon C., Moorthy N.C. and Prives C., Ref-1 regulates the transactivation and proapoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J.* (1999) **18**: 5609-5621
48. Garner R.C., Microsome-dependent binding of aflatoxin B<sub>1</sub> to DNA, RNA, polyribonucleotides and protein in vitro. *Chem.-Biol. Interact.* (1973) **6** : 125-129
49. Giaccia A.J. and Kastan M.B., The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Dev.* (1998) **12**: 2973-2983
50. Gimenez-Conti I., Viaje A., Chesner J., Conti C. and Slaga T.J., Induction of short-term markers of tumor promotion by organic peroxides. *Carcinogenesis* (1991) **4** : 563-569

51. Glaab W.E., Tindall K.R. and Skopek T.R., Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutat. Res.* (1999) **427** : 67-68
52. Gözükara E.M., Parris C.N., Weber C.A., Salazar E.P., Seidman M.M., Watkins J.F., Prakash L. and Kraemer K.H., The human DNA repair gene, ERCC2 (XPD), corrects ultraviolet hypersensitivity and ultraviolet hypermutability of a shuttle vector replicated in *xeroderma pigmentosum* group D cells. *Cancer Res.* (1994) **54** : 3837-3844
53. Green D. and Kroemer G., The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* (1998) **8** : 267-271
54. Grollman A.P. and Moriya M., Mutagenesis by 8-oxoguanine : an enemy within. *Trends Genet.* (1993) **9** : 246-249
55. Gu W. and Roeder R.G., Activation of p53-sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* (1997) **90**: 595-606
56. Gualberto A., Aldape K., Kozakiewicz K. and Tlsty T.D., An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) **95** : 5166-5171
57. Guengerich F.P. and Shimada T., Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzyme. *Chem. Res. Toxicol.* (1991) **4** : 391-407
58. Hagiwara K., McMenamin M.G., Miura K. and Harris C.C., Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res.* (1999) **59** : 4165-4169
59. Halliwell B. and Aruoma O.I., DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* (1991) **281**: 9-19
60. Hann B.C. and Lane D.P., The dominating effect of mutant p53. *Nature Genet.* (1995) **9**: 221-222
61. Harvey D.M. and Levine A.J., p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* (1991) **5**: 2375-2385



62. Harvey M., McArthur M.J., Montgomery C.A.Jr., Butel J.S., Bradley A. and Donehower L.A., Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genet.* (1993) **5** : 225-229
63. Harvey M., Sands A.T., Weiss R.S., Hegi M.E., Wiseman R.W., Pantazis P., Giovannella B.C., Tainsky M.A., Bradley A. and Donehower L.A., In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* (1993) **8** : 2457-2467
64. Harvey M., Vogel H., Morris D., Bradley A., Bernstein A. and Donehower L.A., A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genet.* (1995) **9** : 305-311
65. Hecht S.S., Carmella S.G., Murphy S.E., Foiles P.G. and Chung F.L., Carcinogen biomarkers related to smoking and upper aerodigestive tract cancer. *J. Cell Biochem. Suppl.* (1993) **17F** :27
66. Henle E.S. and Linn S., Formation, prevention and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** : 19095-19098
67. Herskowitz I., Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* (1987) **329** : 219-222
68. Hinds P., Finlay C. and Levine A.J., Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with ras oncogene and transformation. *J. Virology* (1989) **63**: 739-746
69. Hirt B., Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* (1967) **26**: 365-369
70. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C.C., p53 mutations in human cancers. *Science* (1991) **253** : 49-53
71. Honda R. and Yasuda H., Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* (1999) **18**: 22-27
72. Honda R., Tanaka H. and Yasuda H., Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* (1997) **420**: 25-27
73. Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C. and Chu G., Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependant and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) **96** : 424-428

74. Institut national du cancer du Canada, *Statistiques canadiennes sur le cancer* (1999) Toronto, Canada 1999. [www.cancer.ca/stats/index.htm](http://www.cancer.ca/stats/index.htm)
75. Ishizaki K., Nishizawa K., Mimaki S. and Aizawa S.-i., UV-induced mutations of supF gene on a shuttle vector plasmid in p53-deficient mouse cells are qualitatively different from those in wild-type cells. *Mutat. Res.* (1996) **364** : 43-49
76. Ito K., Inoue S., Yamamoto K. and Kawanishi S., 8-hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J. Biol. Chem.* (1993) **268**: 13221-13227
77. Iwamoto K.S., Mizuno T., Ito T., Tsuyama N., Kyoizumi S. and Seyama T., Gain-of-function p53 mutations enhance alteration of the T-cell receptor following x-irradiation, independently of the cell cycle and cell survival. *Cancer Res.* (1996) **56** : 3862-3865
78. Jacks T., Remington L., Willams B.O., Schmitt E.M., Halachmi S., Bronson R.T. and Weinberg R.A., Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* (1994) **4** : 1-7
79. Jacobsen J.S. and Humayun M.Z., Chloroperbenzoic acid induced DNA damage and peracid activation of aflatoxin B1. *Carcinogenesis* (1986) **3** : 491-493
80. Jayarama L., Murthy K.G., Zhu C., Curran T., Xanthoudakis S. and Prives C., Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev.* (1997) **11**: 558-570
81. Jayaraman L. and Prives C., Covalent and non-covalent modifiers of the protein. *Cell. Mol. Life Sci.* (1999) **55**: 76-87
82. Jenkins J.R., Rudge K. and Currie G.A., Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* (1984) **312**: 651-654
83. Jiang M.C., Liang H.J., Liao C.F. and Lu F.J., Methyl methanesulfonate and hydrogen peroxyde differentially regulate p53 accumulation in hepatoblastoma cells. *Toxicol. Lett.* (1999) **106**: 201-208
84. Johnson P., Gray M., Mowat M. and Benchimol S., Expression of wild-type p53 is not compatible with continued growth of p53-negative tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* (1991) **11** : 1-11
85. Justus T. and Thomas S.M., Construction of a umuC'-luxAB plasmid for the detection of mutagenic DNA repair via luminescence. *Mutat. Res.* (1998) **398**: 131-141
86. Kaelin W.G.Jr., Another p53 Doppelgänger? *Science* (1998) **281** : 57-58

87. Kaghad M., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J.M., Dumont X., Ferrara P., McKeon F. and Caput D., Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* (1997) **90** : 809-819
88. Karran P., Lindahl T., Ofsteng I., Evensen G.B. and Seeberg E., *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J. Mol. Biol.* (1980) **140** : 101-127
89. Ko J.L. and Prives C., p53 puzzle and paradigm. *Genes & Dev.* (1996) **10** :1054-1065
90. Kraemer K.H. and Seidman M.M., Use of supF, an *Escherichia coli* tyrosine suppressor tRNA gene, as a mutagenic target in shuttle-vector plasmids. *Mutat. Res.* (1989) **220** : 61-72
91. Kubbutat M.H., Jones S.N. and Vousden K.H., Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* (1997) **387**: 299-303
92. Kussie P.H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A.J. and Pavletich N.P., Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* (1996) **274**: 948-953
93. Lane D.P., p53, guardian of the genome. *Nature* (1992) **358** : 15-16
94. Lane D.P. and Crawford L.V., T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* (1979) **278**: 261-263
95. Lassus P., Bertrand C., Zugasti O., Chambon J.P., Soussi T., Mathieu-Mahul D. and Hibner U., Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant. *Oncogene* (1999) **18** : 4699-4709
96. Levine A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* (1997) **88** : 323-331
97. Levy D.D., Saijo M., Tanaka K. and Kraemer K.H., Expression of a transfected DNA repair gene (XPA) in *xeroderma pigmentosum* group A cells restores normal DNA repair and mutagenesis of UV-treated plasmids. *Carcinogenesis* (1995) **16** : 1557-1563
98. Li G. and Ho V.C., p53-dependant DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br. J. Dermatol.* (1998) **139** : 3-10
99. Lin J.-K., Miller J.A. and Miller E.C., 2,3-dihydro-2(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B<sub>1</sub>, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver in vivo. *Cancer Res.* (1977) **37** : 4430-4438

100. Lindahl T., Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* (1993) **362**: 709-715
101. Linzer D.I.H. and Levine A.J., Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* (1979) **17**: 43-52
102. Livingstone L.R., White A., Sprouse J., Livanos E., Jacks T. and Tlsty T.D., Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* (1992) **70** : 923-935
103. Loeb L.A. and Preston B.D., Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* (1986) **20**: 201-230
104. Loeb L.A., Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* (1991) **12**: 3075-3079
105. Lomax M.E., Barnes D.M., Gilchrist R., Picksley S.M., Varley J.M. and Camplejohn R.S., Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family. *Oncogene* (1997) **14** : 1869-1874
106. Madhani H.D., Bohr V.A. and Hanawalt P.C., Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes : c-abl and c-mos. *Cell* (1986) **45** : 417-423
107. Madzak C., Armier J., Sary A., Daya-GrosJean L. and Sarasin A., UV-induced mutations in a shuttle vector replicated in repair deficient trichothiodystrophy cells differ with those in genetically-related cancer prone *xeroderma pigmentosum*. *Carcinogenesis* (1993) **14** : 1255-1260
108. Maki C.G., Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**: 16531-16535
109. Malkin D., Li F.P., Strong E.C., Fraumeni J.F. Jr., Nelson C.E., Kim D.H., Kassel J., Gryka M.A., Bischoff F.Z., Tainsky M.A. et al., Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* (1990) **250** : 1233-1238
110. Mariën K., Moyer R., Loveland P., Holde K.v. and Bailey G., Comparative binding and sequence interaction specificities of aflatoxin B1, aflatoxicol, and aflatoxin M1 with purified DNA. *J. Biol. Chem.* (1987) **262** : 7455-7462
111. Marshall C.J., Tumor suppressor genes. *Cell* (1991) **64** : 313-326

112. May P. and May E., Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* (1999) **18**: 7621-7636
113. Mayo L.D., Turchi J.J. and Berberich S.J., Mdm2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res.* (1997) **57**: 5013-5016
114. McBride T.J., Schneider J.E., Floyd R.A. and Loeb L.A., Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13mp2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) **89** : 6866-6870
115. McCord J.M. and Fridovich I., Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocyanin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* (1969) **244** : 6049-6055
116. McKay B.C., Ljungman M. and Rainbow A.J., Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* (1999) **20** : 1389-1396
117. Meek D.W., Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* (1999) **18**: 7666-7675
118. Mello-Filho A.C. and Meneghini R., Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutat. Res.* (1991) **251** : 109-113
119. Moraes E.C., Keyse S.M., Pidoux M. and Tyrell R.M., The spectrum of mutations generated by passage of a hydrogen peroxide damaged shuttle vector plasmid through a mammalian host. *Nucleic Acids Res.* (1989) **17** : 8301-8312
120. Moriwaki S.-i., Yagi T., Nishigori C., Imamura S. and Takebe H., Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle vector plasmid propagated in mouse O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells. *Cancer Res.* (1991) **51** : 6219-6223
121. Moshinsky D.J. and Wogan G.N., UV-induced mutagenesis of human p53 in a vector replicated in *saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) **94** : 2266-2271
122. Naqui A. and Chance B., Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* (1986) **55** : 137-166
123. Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hostetter R., Cleary K., Bigner S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P. et al., Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* (1989) **342** : 705-708

124. Offer H., Wolkowicz R., Matas D., Blumenstein S., Livneh Z. and Rotter V., Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett.* (1999) **450**: 197-204
125. Ogawa H., Ohyama T., Katsura E. and Katoh Y., Characterization of the pUC19-lacZC<sup>141</sup> reversion system for assaying chemical mutagenesis. *Mutat. Res.* (1997) **394**: 141-151
126. Oliner J.D., Kinzler K.W., Meltzer P.S., George D.L. and Vogelstein B., Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* (1992) **358**: 80-83
127. Osada M., Ohba M., Kawahara C., Ishioka C., Kanamaru R., Katoh I., Ikawa Y., Nimura Y., Nakagawara A., Obinata M. and Ikawa S., Cloning and functional analysis of human p51 which structurally and functionally resembles p53. *Nat. Med.* (1998) **4** : 839-843
128. Ozturk M., p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* (1991) **338** : 1356-1359
129. Peden K.W.C., Pipas J.M., Pearson-White S. and Nathans D., Isolation of mutants of an animal virus in bacteria. *Science* (1980) **209**: 1392-1396
130. Peters U.R., Tschan M.P., Kreuzer K.A., Baskaynak G., Lass U., Tobler A., Fey M.F. and Schmidt C.A., Distinct expression patterns of the p53-homologue p73 in malignant and normal hematopoiesis assessed by a novel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay and protein analysis. *Cancer Res.* (1999) **59** : 4233-4236
131. Pietenpol J.A. and Vogelstein B., No room at the p53 inn. *Nature* (1993) **365**: 17-18
132. Prives C., Signaling to p53 : breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* (1998) **95** : 5-8
133. Protic-Sabljić M. and Kremer K.H., One pyrimidine dimmer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) **82**: 6622-6626
134. Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S. and Boiteux S., Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997) **94** : 8010-8015
135. Razzaque A., Mizusama H. and Seidman M.M., Rearrangement and mutagenesis of a shuttle vector plasmid after passage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) **80** : 3010-3014

136. Rodriguez-Lopez J.N., Hernandez-Ruiz J., Garcia-Canovas F., Thorneley R.N., Acosta M. and Arnao M.B., The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with *m*-chloroperoxybenzoic acid. A spectrophotometric and transient kinetic study. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** : 5469-5476
137. Rodriguez H., Holmquist G.P., D'Agostino R.Jr., Keller J. and Akman S.A., Metal ion-dependent hydrogen peroxide-induced DNA damage is more sequence specific than metal specific. *Cancer Res.* (1997) **57** : 2394-2403
138. Roth J., Dobbstein M., Freedman D.A., Shenk T. and Levine A.J., Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* (1998) **17**: 554-564
139. Rotter V., Aloni-Grinstein R., Schwartz D., Elkind N.B., Simons A., Wolkowicz R., Lavigne M., Beserman P., Kapon A. and Goldfinger N., Does wild-type p53 play a rôle in normal cell differentiation? *Semin. Cancer Biol.* (1994) **5**: 229-236
140. Rotter V., Schwartz D., Almon E., Goldfinger N., Kapon A., Meshorer A., Donehower L.A. and Levine A.J., Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) **90** : 9075-9079
141. Sakamuro D., Sabbatini P., White E. and Prendergast G.C., The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* (1997) **15**: 887-898
142. Sarasin A., The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat. Res.* (1999) **428** : 5-10
143. SAS Institute, Inc. SAS Procedures Guide, Version 6, Third edition. Cary, North Carolina: SAS institute (1990)
144. Schneider J.E., Price J.E., Mardt L., Gutteridge J.E. and Floyd R.A., Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.* (1990) **18** : 631-635
145. Seeberg E., Eide L. and Bjørås M., The base excision repair pathways. *TIBS* (1995) **20** : 391-397
146. Seetharam S. and Seidman M.M., Modulation of an ultraviolet mutational hotspot in a shuttle vector in xeroderma cells. *Nucleic Acids Res.* (1991) **19** : 1601-1604

147. Seidman M.M., Dixon K., Razzaque A., Zagursky R.J. and Berman M.L., A shuttle vector plasmid for studying carcinogen-induced point mutations in mammalian cells. *Gene* (1985) **38**: 233-237
148. Shaw P., Freeman J., Bovey R. and Iggo R., Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* (1996) **12**: 921-930
149. Shen H.-M. and Ong C.-N., Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. *Mutat. Res.* (1996) **366** : 23-44
150. Shen H.-M., Ong C.-N., Lee B.-L. and Shi C.-Y., Aflatoxin B<sub>1</sub> induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* (1995) **16** : 419-422
151. Sherr C.J., Cancer cell cycles. *Science* (1996) **274** : 1672-1676
152. Sherr C.J., Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes & Dev.* (1998) **12**:2984-2991
153. Shimada A., Kato S., Enjo K., Osada M., Ikawa Y., Kohno K., Obinata M., Kanamaru R., Ikawa S. and Ishioka C., The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63 : similarities and differences. *Cancer Res.* (1999) **59** : 2781-2786
154. Sionov R.V. and Haupt Y., The cellular response to p53 : the decision between life and death. *Oncogene* (1999) **18** : 6145-6157
155. Sledziewska-Gojska E. and Janion C., Alternative pathways of methyl methanesulfonate-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* (1989) **216**: 126-131
156. Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q.M., O'Connor P.M. and Fornace A.J., Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* (1995) **10** : 1053-1059
157. Soussi T., Caron de Fromentel C. and May P., Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* (1990) **5** : 945-952
158. Taylor W.R., DePrimo S.E., Agarwal A., Agarwal M.L., Schonthal A.H., Katula K.S. and Stark G.R., Mechanisms of G<sub>2</sub> arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell.* (1999) **10** : 3607-3622

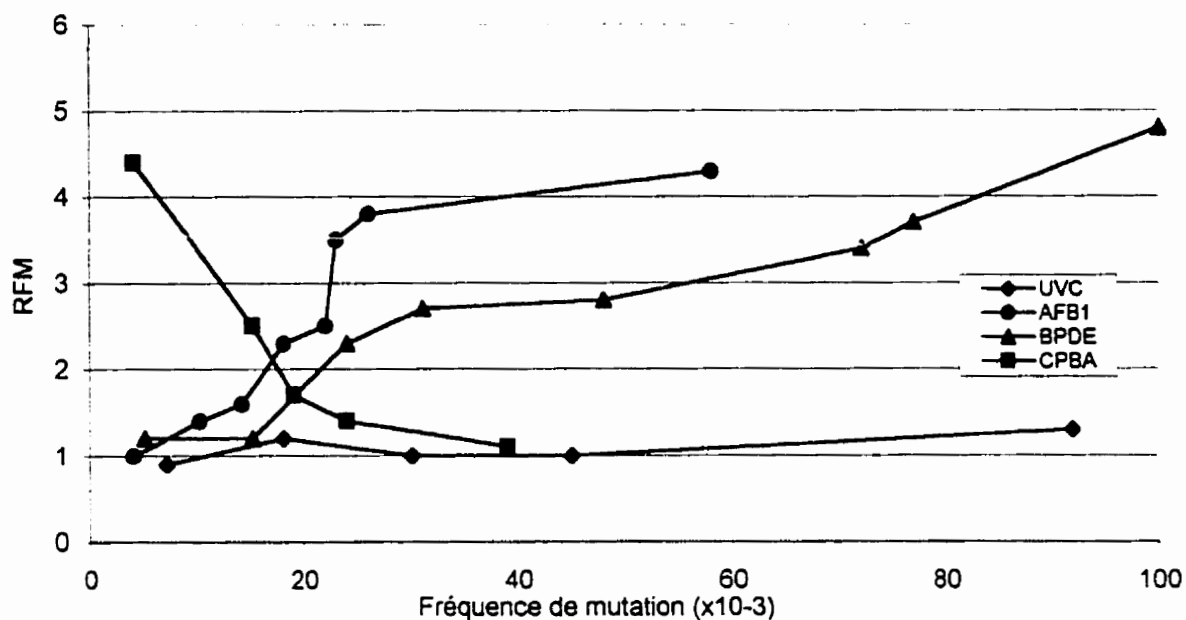


159. Tokuchi Y., Hashimoto T., Kobayashi Y., Hayashi M., Nishida K., Hayashi S., Imai K., Nakachi K., Ishikawa Y., Nakagawa K., Kawakami and Tsuchiya E., The expression of p73 is increased in lung cancer independent of p53 gene alteration. *Br. J. Cancer* (1999) **80** : 1623-1629
160. Tornaletti S. and Pfeifer G.P., UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays* (1996) **18** : 221-228
161. Trotter Y., Waith W.I. and Anderson A., Kings of mutations induced by aflatoxin B1 in a shuttle vector replicating in human cells transiently expressing cytochrome P450 1A2 cDNA. *Mol. Carcinog.* (1992) **6** : 140-147
162. Tsou T.C., Lai H.J. and Yang J.L., Effects of mannitol or catalase on the generation of reactive oxygen species leading to DNA damage by chromium (VI) reduction with ascorbate. *Chem. Res. Toxicol.* (1999) **12** : 1002-1009
163. Tyrrell R.M., Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight—from models to reality. *BioEssays* (1996) **18** : 139-148
164. Van der Kemp P., Thomas D., Barbey R., de Oliveira R. and Boiteux S., Cloning and expression in E.coli of the OGG1 gene of S.cerevisiae which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996) **93** : 5197-5202
165. Varshavsky A., The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* (1997) **22**: 383-387
166. Vojta P.J. and Berrett J.C., Genetic analysis of cellular senescence. *Biochim. Biophys. Acta.* (1995) **1242**: 29-41
167. Wang E.H., Friedman P.N. and Prives C., The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell* (1989) **57** : 379-392
168. Wang X.W., Vermeulen W., Coursen J.D., Gibson M., Lupold S.E., Forrester K., Xu G., Elmore L., Yeh H., Hoeijmakers J.H. and Harris C.C., The XPB and XPD DNA helicase are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev.* (1996) **10**: 1219-1232
169. Wang Y. and Prives C., Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* (1995) **376**: 88-91

170. Wani M.A., Zhu Q.Z., El-Mahdy M. and Wani A.A., Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* (1999) **20** : 765-772
171. Wei S.-J.C., Chang R.L., Wong C.-Q., Bhachech N., Cui X.X., Hennig E., Yagi H., Sayer J.M., Jerina D.M., Preston B.D. and Conney A.H., Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by an ultimate carcinogen from benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) **88** : 11227-11230
172. Wichens D.G., Li M.K., Atkins G., Fuller B.J., Hobbs K.E. and Dormandy T.L., Free radicals in hypothermic rat heart preservation-prevention of damage by mannitol and desferrioxamine. *Free Radic. Res. Commun.* (1987) **4** : 189-195
173. Wiseman H. and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* (1996) **313** : 17-29
174. Wolf D., Harris N. and Rotter V., Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* (1984) **38** : 119-126
175. Wong K.B., DeDecker B.S., Freund M.V., Proctor M.R., Bycorft M. and Fersht A.R., Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) **96**: 8438-8442
176. Wynford-Thomas D., Cellular senescence and cancer. *J. Pathol.* (1999) **187**: 100-111
177. Yagi T., Sato M., Nishigori C. and Takebe H., Similarity in the molecular profile of mutations induced by UV light in shuttle vector plasmids propagated in mouse and human cells. *Mutagenesis* (1994) **9** : 73-77
178. Yamagishi N., Miyakoshi J., Yagi T. and Takebe H., Suppression of UV-induced mutations by wild-type p53 protein in human osteosarcoma cells. *Mutagenesis* (1997) **12** : 191-194
179. Yamaizumi M. and Sugano T., UV-induced nuclear accumulation of p53 is evoked through DNA damage of actively transcribed genes independent of the cell cycle. *Oncogene* (1994) **9** : 2775-2784

180. Yang J.-L., Maher V.M. and McCornick J.J., Kinds of mutations formed when a shuttle vector containing adducts of ( $\pm$ )-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene replicates in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) **84**: 3787-3791
181. Zhang Y., Xiong Y. and Yarbrough W.G., ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53 : ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* (1998) **92**: 725-734

## ANNEXE A



La réduction de la fréquence de mutation dépendante de p53 en fonction de la fréquence de colonies blanches obtenues. pYZ289 a été traité avec différentes concentrations de quatre agents mutagènes et cotransfecté dans des cellules  $(10)^3$  avec pECMmutk ou pECM53k. La réduction de la fréquence de mutation dépendante de p53 est la fréquence de colonies blanches en absence de p53 (pECMmutk) divisée par celle en présence de p53 (pECM53k). La fréquence de mutation en abscisse de la figure est celle en absence de p53 (Courtemanche et Anderson 1999).

## ANNEXE B

ESSAIS POUR UTILISATION  
D'UNE NOUVELLE MÉTHODE D'EXTRACTION

La méthode d'extraction utilisée au laboratoire pour extraire et isoler les plasmides pYZ289 des cellules de souris (Hirt, 1967) est un procédé simple mais comportant plusieurs étapes élaborées, donc étant plutôt de longue durée. En fait, il faut près de trois jours, seulement pour obtenir le vecteur purifié.

C'est pour cette raison que des études ont été faites pour mettre au point une nouvelle méthode d'extraction alternative, qui pourrait être de plus courte durée. Cette diminution du temps pourrait permettre l'obtention d'une plus grande quantité de résultats et donc une plus grande efficacité de travail.

C'est Chantal Courtemanche qui a mis sur pied un protocole, basé sur l'utilisation du kit d'extraction "QIAprep spin Miniprep" de QIAGEN et complété avec la méthode déjà existante. Le protocole a été mis au point à partir de différents tests, pour déterminer, entre autres, la quantité de substrat à utiliser par colonne, l'importance et la durée des périodes d'incubation ainsi que la température, les conditions de précipitation les plus efficaces, les volumes d'élution ainsi que le volume idéal pour reprendre les culots. Ces tests ont été faits en utilisant le vecteur navette pYZ289 non traité. Les détails de ce protocole sont présentés à la page suivante.

**Extraction d'ADN plasmidique de cellules de mammifères  
avec le "QIAprep Spin Miniprep Kit" de QIAGEN modifié**

1. Laver les cellules deux fois avec 10 ml de tampon phosphate salin (PBS 1X composé de NaCl, de KCl, de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à température de la pièce. Bien aspirer tout le PBS.
2. Mettre 250 µl de tampon P1 (avec le RNase ajoutée) dans le pétri. Décoller les cellules avec un grattoir Costar et mettre dans un tube Eppendorf 1,5 ml.
3. Ajouter 250 µl de tampon P2. Mélanger par inversion 4-6 fois. Incuber à la température de la pièce, pendant 5 minutes.
4. Ajouter 350 µl de tampon N3. Mélanger par inversion 4-6 fois. Incuber dans la glace, pendant 5 minutes.
5. Centrifuger pendant 15 minutes.
6. Mettre une colonne dans un tube de 2 ml. Mettre le surnageant sur la colonne. Centrifuger pendant une minute et jeter le liquide.
7. Mettre 500 µl de tampon PB sur la colonne. Centrifuger pendant une minute et jeter le surnageant.
8. Mettre 700 µl de tampon PE (avec ETOH ajouté) sur la colonne. Centrifuger pendant une minute et jeter le surnageant.
9. Centrifuger pendant une minute pour enlever le surplus de tampon PE. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf 1,5 ml sans bouchon.
10. Mettre 200 µl de tampon EB (pré-incubé à 37°C) sur la colonne. Incuber à 37°C, pendant 10 minutes.
11. Centrifuger pendant une minute. Remettre l'éluat sur la colonne et incuber à 37°C, pendant 5 minutes.
12. Centrifuger pendant une minute. Garder l'éluat.
13. Ajouter 20 µl de tampon 4 de "New England Biolabs" (NEB) et 2 µl de Dpn1 (NEB; à 20000 U/ml). Incuber à 37°C, pendant une heure.
14. Ajouter 14,2 µl de NaCl 5M et 590 µl d'éthanol à 95%. Laisser précipiter à 4°C pendant au moins une heure.

15. Centrifuger pendant 15 minutes et disposer du surnageant.
16. Laver le culot avec 470  $\mu$ l d'éthanol à 70%. Centrifuger pendant 10 minutes et jeter le surnageant.
17. Sécher le culot au Speedvac.
18. Reprendre le culot dans 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

Les tampons P1, P2, N3, PB, PE et EB sont ceux de QIAGEN (voir protocole de QIAGEN pour plus d'informations).

Cependant, lorsque j'ai utilisé ce nouveau protocole, dans le cours normal de mes expérimentations, il s'avérait qu'il n'était pas tout à fait au point. En fait, lorsque la méthode était utilisée pour extraire des plasmides traités au BM, les quantités de colonies retrouvées sur pétris à la toute fin de l'expérimentation étaient trop faibles pour donner un compte valable. Le fait de traiter l'ADN du vecteur diminue déjà de beaucoup la quantité d'ADN plasmidique obtenue après extraction et il semblait que cette nouvelle méthode provoquait de trop grandes pertes, comparativement à celle utilisée précédemment.

Après avoir appliqué le protocole à quelques reprises, en prenant beaucoup de précautions lors des manipulations, mais sans succès, il fallait essayer certaines variantes aux conditions du protocole et trouver où, durant l'extraction, l'ADN était perdu.

Les premiers essais visaient à augmenter le nombre de colonies, mais sans changer le protocole déjà établi. C'est ainsi que différentes quantités de milieu, obtenu après électroporation et incubation, ont été déposées sur pétris. Les nombres de colonies étaient toujours insuffisants. D'autres tests ont été faits en centrifugeant le milieu après incubation, pour le reprendre dans un volume plus petit et par la suite l'étendre sur pétris. Même en étalant toutes les bactéries obtenues, le nombre de colonies n'était, dans la plupart des cas, pas suffisant pour donner des résultats significatifs. Par la suite, ce sont les quantités d'ADN plasmidique utilisées pour l'électroporation qui ont été changées. Même augmenter la quantité d'ADN à cette étape ne donnait pas les résultats attendus. Il était cependant possible de remarquer qu'en optimisant les conditions, les nombres de colonies obtenues pour les traitements au BM les plus faibles, soit à des concentrations de 20  $\mu\text{M}$  pendant 5 ou 30 minutes, étaient quand même appréciables, mais le rendement n'était toujours pas assez important pour les traitements plus agressifs.

Il y avait donc une perte importante d'ADN, à une ou plusieurs étapes durant l'extraction. Ainsi, de petits échantillons de solution ont été gardés, tout au long de l'exécution du protocole, pour ensuite vérifier la présence ou non d'ADN. Il a été possible de constater, en mettant les échantillons sur gel, que la perte d'ADN se faisait majoritairement, et ce de façon très évidente, lors de la précipitation, à l'étape 14 du protocole. Ainsi, les conditions de précipitation qui



avaient été choisies ne donnaient pas un rendement assez bon, du moins dans le cas d'extraction du vecteur traité. Il faudrait donc jouer sur les agents utilisés pour la précipitation, pour ainsi déterminer des conditions permettant une plus grande efficacité.

Il est évident que mettre un protocole au point peut demander beaucoup de patience, mais surtout de temps. Exécuter différents tests pourrait s'avérer être très avantageux à long terme, parce que la mise au point du protocole pourrait permettre de diminuer de façon non négligeable les durées d'expérimentation. Il faudrait ajuster les conditions de précipitation pour pouvoir éventuellement utiliser cette nouvelle méthode d'extraction, ce qui sera éventuellement un atout important au sein du projet.