



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Yorann BARON

préparée à l'unité de recherche 6061 IGDR
Institut de Génétique et Développement
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Régulation
transcriptionnelle UV-
induite de gènes de la
réparation de l'ADN
par le facteur de
transcription USF-1
(Upstream
Stimulating Factor 1)**

**Thèse soutenue à Rennes
le 14 décembre 2009**

devant le jury composé de :

Corine BERTOLOTTO

CR1 INSERM, U 597, Nice / *rapporteur*

Filippo ROSSELLI

DR2 CNRS, FRE 2939, Villejuif / *rapporteur*

Franck CHESNEL

CR1 CNRS, UMR 6061, Rennes / *examineur*

Gilles SALBERT

Pr. UR1, UMR 6026, Rennes / *examineur*

Sophie VAULONT

DR1, INSERM, institut Cochin, Paris / *examineur*

Marie-Dominique GALIBERT

MCU-PH1, UMR 6061, Rennes / *directeur de thèse*



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : biologie

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Yorann BARON

préparée à l'unité de recherche 6061 IGDR
Institut de Génétique et Développement
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Régulation
transcriptionnelle UV-
induite de gènes de la
réparation de l'ADN
par le facteur de
transcription USF-1
(Upstream
Stimulating Factor 1)**

**Thèse soutenue à Rennes
le 14 décembre 2009**

devant le jury composé de :

Corine BERTOLOTTO

CR1 INSERM, U 597, Nice / *rapporteur*

Filippo ROSSELLI

DR2 CNRS, FRE 2939, Villejuif / *rapporteur*

Franck CHESNEL

CR1 CNRS, UMR 6061, Rennes / *examineur*

Gilles SALBERT

Pr. UR1, UMR 6026, Rennes / *examineur*

Sophie VAULONT

DR1, INSERM, institut Cochin, Paris / *examineur*

Marie-Dominique GALIBERT

MCU-PH1, UMR 6061, Rennes / *directeur de thèse*

A mes Parents,

A ma Chérie,

Remerciements:

En préambule de ce manuscrit je tiens à exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui ont permis de réaliser ce travail passionnant et prenant. Durant ces quatre années de thèse, j'ai eu la chance de pouvoir compter sur de nombreux soutiens sans lesquels ce travail n'aurait pu être mené à terme.

Je voudrais commencer par remercier les membres du jury d'avoir accepté avec enthousiasme de juger mon travail de thèse et de s'être déplacé à Rennes. Tout d'abord merci à Filippo Rosselli et Corine Bertolotto d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit et modifié leur planning, que je sais très rempli en cette période, pour être rapporteurs de ce travail. Merci également à Sophie Vaulont à la fois dans l'examen de ce manuscrit et pour sa collaboration dans la réalisation de certains aspects de mon travail sur le gène USF-1. Merci à Gilles Salbert, dont j'ai eu la chance de suivre les excellents enseignements sur les bancs de l'université, d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Enfin, je remercie Franck Chesnel d'avoir accepté d'examiner ma thèse ainsi que pour tous ses conseils avisés, son aide précieuse dans des domaines que je ne connaissais pas et les nombreuses discussions passionnantes que nous avons pu avoir durant ces années passées à l'UMR.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Marie-Dominique Galibert de m'avoir accueilli dans son équipe, il y a maintenant presque cinq ans déjà, et de m'avoir permis de réaliser cette thèse sur un sujet passionnant. Merci Marie-Do de m'avoir constamment encouragé et soutenu malgré les nombreux moments de doute et d'avoir réussi à me transmettre ta passion pour la recherche. Merci de m'avoir donné la chance de réfléchir sous ta direction et de m'avoir fait profiter de l'ensemble de tes connaissances scientifiques, dont j'espère en retenir une partie. Ce travail n'aurait jamais pu être réalisé sans la confiance que tu m'as continuellement accordé, des premiers jours de stage de master jusqu'à la rédaction de cette thèse.

Je voudrais également exprimer tous mes remerciements à l'ensemble de l'équipe "Régulation Transcriptionnelle et Oncogénèse", à tous les personnes qui la composent ou qui l'ont composé: Sébastien, Nicolas, Ariane, Audrey, Amaal, Anne-Gaëlle, Virginie, Aline. Merci à tous pour votre aide, pour l'ambiance toujours excellente, les pauses régénératrices sucrées et les moments de détente. Je voudrais particulièrement te remercier Seb pour toute ton aide précieuse à la paillasse des premiers moments de stage jusqu'aux dernières manip d'articles, pour l'écriture et l'illustration du manuscrit et des articles qui le composent et pour tes relectures toujours avisées. On a partagé de nombreux moments, que ce soit à l'intérieur du labo, par ordinateurs interposés lorsque tu étais à Oxted ou dans la vie extérieure à la recherche. Et ces moments furent tous agréables.

Au cours de cette thèse, j'ai eu souvent besoin d'aide de nombreuses personnes de l'UMR, des plates formes et des autres structures de recherche de Rennes, que ce soit pour des aspects techniques expérimentaux ou administratifs, je vous remercie tous. Je tiens aussi à remercier les organismes qui m'ont financé, la région Bretagne et l'Association pour la Recherche contre le Cancer.

La vie d'un thésard ne s'arrête pas aux frontières des laboratoires et je tiens à remercier tous les doctorants passés ou actuels de l'UMR, les amis rennais, de lokemo et d'ailleurs avec qui j'ai passé de nombreux et très bons moments, parties de franches rigolades qui permettent d'évacuer la pression, de penser et de parler d'autre chose. Ces bonheurs font énormément de bien. Et pour ceux que les aléas de ma thèse ont un peu éloigné, promis je ne vous oublie pas. Merci à vous tous les amis, je ne me risquerai pas à vous nommer tellement j'ai peur d'oublier des prénoms. J'ai une pensée particulière pour mon coloc et poto, Nico. Je te remercie de ton soutien inconditionnel et de ta bonne humeur à toute épreuve et si communicative. J'espère ne pas trop t'avoir gavé par moments.

Je veux vous remercier Papa, Maman, Titi et Judi, ma petite famille qui a su me supporter, m'aider et toujours croire en moi. Ces années d'études ont parfois été dures, il y a eu de longs moments de doute mais jamais je ne me suis senti seul parce que je vous ai toujours eu derrière moi, à m'écouter, à y croire pour moi parfois plus que moi. Merci de m'avoir donné la force que vous aviez sans jamais rien me demander en retour. Sans vous, jamais je n'aurais pu arriver là. J'espère avoir été à la hauteur de la fierté que vous me témoignez.

Et je voudrais terminer en te remerciant toi mon cœur qui a connu tous les moments euphoriques ou durs de cette thèse. Merci Emilie d'avoir supporté mes sautes d'humeurs et mon sale caractère. Merci pour ne jamais m'en avoir voulu pour les horaires tardifs, les week-ends ratés. Je sais que ça a été parfois aussi dur pour toi que pour moi, et pourtant jamais tu ne me le faisais sentir. Saches que sans toi, je n'y serais jamais arrivé et cette thèse est aussi la tienne. J'espère que nous pourrons rattraper tous ces moments perdus et que cette thèse pourra gommer les passages difficiles que je t'ai fait endurer. Merci pour ton amour. Merci d'être toujours là. Je t'aime.

Liste des abréviations

¹O²	Oxygène singulet	ERCC	Excision Repair Cross Complementing
6-4PP	Photoproduits 6-4 Pyrimidine-Pyrimidone	FAD	Flavin Adenin dinucleotide
8-oxo-dG	7,8 dihydro-8-oxodésoxyGuanosine	GGR	Global Genome Repair
8-MOP	Methoxypsoralen	HECT	Homologous to E6AP COOH terminus
AC	Adénylate Cyclase	HNPCC	Cancer Colique Hériditaire sans Polypose
ACTH	Adreno Cortico Trophic Hormon	HR	Homologous Recombination
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	HR23A, B	Homologue of RAD23 A, B
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique	IR	Infra Rouge
a-MSH	alpha-Melanocyte Stimulating Hormon	K7, 48,...	Résidu Lysine en position 7, 48,...
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	kb	kilobase
ARNP II	ARN polymérase de classe II	kDa	kiloDalton
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	KO	Knock Out
ATP	Adénosine TriPhosphate cyclique	MAP	Mitogen Activated Protein
ATR	Ataxia Telangiectasia Related	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
BER	Base Excision Repair	MDM2	Mouse Double Minute 2
b-HLH-LZ	basic-Helix-Loop Helix Leucin Zipper	MEK	MAP ERK kinase
BrAAP	Branched Amino Acid referring peptidase	MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
CAK	Cdk-Activating Kinase	MITF	Microphthalmia
CBC	Carcinome Basocellulaire	MMR	Mismatch Repair
Cdc	Cell division cycle	MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
cdk	cyclin dependent kinase	MTHF	5,10-Methenyl-tetrahydrofolate
CE	Carcinome Epidermoide	Myc	Myelocytomatosis
CGH	Comparative Genomic Hybridization	NER	Nucleotide Excision Repair
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	NHEJ	Non-Homologous End Joining
Chk1, 2	Checkpoint Protein Kinase 1, 2	MMS	methyl methane sulfate
COFS	Syndrome cérébro-oculo-facio-squelettal	MNU	N-méthyl-N-nitroso-urée
CPD	Cyclobutane Pyrimidine Dimer	0^{2°}	Anion superoxyde
CREB	C Responsive Element Bindong Protein	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
CS	Cockayne Syndrome	PCR	Polymerase Chain Reaction
CSN	Cop9 signalosome	PIC	Complexe de Pré-Initiation
DDB1, 2	Damage-specific DNA Binding protein 1, 2	PKA	Protein Kinase A
DDR	Direct DNA Damage Reversal	PMS	Polypeptides de la Segregation Postméiotique
DSB	Double Strand Break Repair	RFC	Replication Factor C
DUB	DéUbiquitinase	ROS	Radical Oxygen Species
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	RPA1, 2, 3	Replication Protein A 1, 2 3
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay		

Rpn	Rpt and putative 19S non-ATPase
RT-PCR	Reverse-Transcription PCR
SNAAP	Small Neutral Amino Acid Peptidase
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable
TCR	Transcription Coupled Repair
TCR	Transcription Coupled Repair
TFIIH	Transcription Factor II H
TTD	TrichoThioDystrophie
TYR	Tyrosinase
UBA	Ubiquitin associated domain
UBD	Ubiquitin Binding Domain
UBL	Ubiquitin Like domain
UBP	Ubiquitin Processing
UCH	Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase
UPS	Ubiquitin Proteasome System
USF-1, 2	Upstream Stimulating Factor 1, 2
UV	Ultra-Violets
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XP	Xeroderma Pigmentosum
WB	Western Blot
XRCC	X-Ray Repair Cross Complementing

Table des illustrations

Figure 1:	Structure de la peau.....	20
Figure 2:	Structure de l'épiderme.....	20
Figure 3:	Spectre de la lumière solaire et pénétrance des radiations UV dans la peau.....	24
Figure 4:	Dommmages de l'ADN induits par les radiations UV.....	28
Figure 5:	Synthèse de la mélanine	30
Figure 6:	Pigmentation constitutive et UV-induite.....	32
Figure 7:	Structure génétique et protéique des facteurs de transcription USF.....	36
Figure 8:	Représentation tri-dimensionnelle des facteurs b-HLH-LZ.....	36
Figure 9:	Réversion directe de dommages (DDR).....	46
Figure 10:	Réparation des mésappariements de bases MMR).....	48
Figure 11:	Réparation par excision de bases (BER).....	50
Figure 12:	Réparation par religation non homologue (NHEJ).....	52
Figure 13:	Réparation par recombinaison homologue (RH).....	54
Figure 14:	Réparation par excision de nucléotide (NER).....	56
Figure 15:	Domaines fonctionnels des protéines humaines HR23A et HR23B.....	60
Figure 16:	Le mécanisme d'ubiquitination.....	78
Figure 17:	Structure et composition du protéasome 26S.....	78
Tableau 1:	Gènes cibles des facteurs de transcription USF.....	38
Tableau 2:	Origine, exemple de dommages et principal mécanisme de réparation associé.....	44
Tableau 3:	Les enzymes du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER).....	66
Tableau 4:	Groupes de complémentation des syndromes XP, CS et TTD.....	70
Tableau 5:	Symptômes associés aux syndromes XP, CS et TTD.....	72

Table des matières

Etude Bibliographique.....	17
I - La peau	19
I.1 L'épiderme	19
I.1.1 Les kératinocytes	21
I.1.2 Les mélanocytes	22
I.1.3 Les cellules de Langerhans.....	22
I.1.4 Les cellules de Merkel.....	22
I.2 Le derme	23
I.3 L'hypoderme.....	23
II - Les radiations UV et leurs impacts biologiques	25
II.1 Radiations UV solaires et dommages associés.....	25
II.1.1 Les UV-A	26
II.1.2 Les UV-B	26
II.1.2.1 Les dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD).....	27
II.1.2.2 Les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone ((6-4) PP)	27
II.1.2.3 Les isomères de Dewar.....	29
II.1.2.4 l'oxydation des guanines (8-oxo-dG).....	29
II.1.3 Les UV-C	29
II.2 La pigmentation : photoprotection cutanée contre les radiations UV.....	31
II.2.1 La mélanine.....	31
II.2.2 La pigmentation constitutive.....	33
II.2.2.1 La voie de l'AMP cyclique (AMPC):	33
II.2.2.2 La voie Steel Factor/Kit.....	34
II.2.2.3 La voie de l'endothéline 1	34
II.2.2.4 La voie FGF2.....	34
II.2.2.5 Le facteur de transcription Microphthalmia (MITF)	34
II.2.3 La pigmentation UV-induite	35
II.3 le facteur de transcription USF-1	37
II.4 Les cancers cutanés	40
II.4.1 Le Carcinome basocellulaire.....	40
II.4.2 Le Carcinome spinocellulaire.....	41
II.4.3 Le Mélanome	42
III - Systèmes de Réparation de l'ADN et désordres génétiques associés.....	43
III.1 La réversion directe des dommages (DDR)	45
III.2 La réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair, MMR)	47
III.3 La réparation par excision de bases (Base Excision Repair, BER)	49
III.4 la réparation des cassures double-brin (Double Strand Break repair, DSB)	51
III.4.1 La réparation par religation non homologue (NonHomologous End Joining, NEHJ)	53
III.4.2 La réparation par recombinaison homologue (Homologous Recombination Repair, RH)	55
III.5 La réparation par excision de nucléotide (Nucleotide excision repair, NER)	57
III.5.1 L'importance du NER	57
III.5.2 Etape initiale du NER: la reconnaissance des lésions.....	59
III.5.2.1 La reconnaissance des lésions dans le Global Genome Repair (GGR).....	59
III 5.2.2 Reconnaissance des lésions dans le Transcription Coupled Repair (TCR-NER).....	63
III.5.3 Ouverture de la double hélice et recrutement des facteurs du NER.....	65
III.5.4 Incision de la région d'ADN endommagée et excision du brin.....	67
III.5.5 Synthèse et ligation.....	68
III.6 Syndromes de déficience du NER.....	69
III.6.1 Le Xeroderma Pigmentosum (XP).....	69
III.6.2 Le Syndrome de Cockayne (CS).....	73

III.6.3 La Trichothiodystrophie (TTD)	74
III.7 Régulation du NER par les UV	75
IV - L'ubiquitination dans la réponse aux radiations UV	77
IV.1 Le système ubiquitine-protéasome	77
IV.2 L'ubiquitination des protéines	77
IV.3 Le protéasome 26S	80
IV.4 L'adressage des protéines polyubiquitinées au protéasome	82
IV.5 Le modèle de p53: ubiquitination et implication dans le NER	83
IV.6 L'ubiquitination dans le NER.....	85
Résultats	87
I – Contexte des travaux	89
II - Le gène <i>HR23A</i> est spécifiquement régulé <i>in vivo</i> en réponse aux UV par le facteur de transcription USF-1.....	93
II.1 Introduction	93
II.2 Résultats	95
Article 1: Baron, Y., Corre S., Mouchet N., Vaultont S., Prince S. and Galibert M.D. <i>The <i>HR23A</i>, but not the <i>HR23B</i>, DNA-repair gene is specifically regulated <i>in vivo</i> in response to UV in a USF-1 dependent manner</i>	
III – Implication du facteur de transcription USF-1 dans le TCR par la régulation UV-induite du gène <i>CSA</i>	123
III.1 Introduction.....	123
III.2 Résultats.....	124
Article 2: Baron, Y., Corre, S., Mouchet, N., Vaultont, S. and Galibert, M.D. <i>Implication of USF in DNA repair, specific UV-induced regulation of CSA expression</i>	
Discussion et Perspectives.....	145
I - Synthèse des résultats.....	147
II - Activation transcriptionnelle UV induite des gènes <i>HR23A</i> et <i>CSA</i>	148
III - Impact de l'induction transcriptionnelle des gènes <i>HR23A</i> et <i>CSA</i>.....	150
IV - Complémentation fonctionnelle des protéines <i>HR23A</i> et <i>HR23B</i>	152
V - <i>HR23A</i> et <i>CSA</i>: Deux nouveaux gènes cibles du facteur USF-1	153
Annexes.....	157
Annexe 1: Galibert, M.D. and Baron, Y. (2009) <i>Identification of specific Protein/DNA complexes: lessons from the ubiquitously expressed USF transcription factors of the b-HLH-LZ super family</i>. Methods in Molecular Biology in press.....	159
Annexe 2: Corre, S., Primot, A., Baron, Y., Le Seyec, J., Goding, C. and Galibert, M.D. (2009) <i>Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation</i>. JBC 284 (28) 18851-62	191
Références Bibliographiques	205

Etude Bibliographique

I - La peau

La peau est un organe complexe à l'interface entre le vivant et le monde extérieur, qui représente environ 10% de la masse corporelle totale de l'adulte. Plus qu'une simple enveloppe, elle est le siège de nombreuses fonctions primordiales dans le maintien de l'intégrité de l'organisme (Figure 1).

La peau se caractérise par une grande capacité de régénération et de cicatrisation constituant ainsi la première barrière physique souple qui protège les tissus et les organes de la plupart des agressions extérieures d'ordres physiques (rayonnements ultra-violets (UV)), mécaniques (extension et élasticité du derme permettant le maintien de la tension de la peau) chimiques ou biologiques (la couche cornée joue un rôle anti-microbien notamment par sa flore résidante, son pH et le phénomène de desquamation). Les cellules dendritiques présentes dans l'épiderme jouent de plus un rôle important dans la protection immunitaire.

Bien qu'étant semi perméable aux liquides extérieurs, la peau permet de maintenir le milieu corporel intérieur isolé et limite les pertes d'eau, tout en contenant les fluides (sang, lymphe...). Son pouvoir isolant participe à la régulation d'une température corporelle constante par la sudation et la dilatation/contraction des vaisseaux en fonction de la température extérieure. Le derme contient un réseau sanguin représentant environ 10% du sang total chez l'adulte.

La peau a également une fonction métabolique systémique, et participe par exemple aux premières étapes de transformation du cholestérol en pro puis en vitamine D, sous l'action des rayonnements UV-B solaires au niveau de l'épiderme. Véhiculée dans l'organisme, cette vitamine permet l'absorption du calcium et ainsi le maintien de la robustesse du squelette.

Sur un plan structural, cette interface protectrice résulte de l'association de trois tissus d'origine différente: un épithélium de revêtement: l'épiderme, un tissu conjonctif : le derme et un tissu adipeux: l'hypoderme (Figure 1) (Césarini, 1990 ; Graham-Brown et Burns, 1991 ; Méliopoulos et Levacher, 1998 ; Avril *et al.*, 2002).

I.1 L'épiderme

Dérivant de l'ectoderme, l'épiderme est la couche superficielle de la peau (Figures 1 et 2). Son épaisseur est variable, maximale pour les régions palmo-plantaires (1mm) et minimale aux paupières (5µm). Il est constitué d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. On y distingue cinq couches de l'extérieur vers l'intérieur : la couche cornée, la couche claire

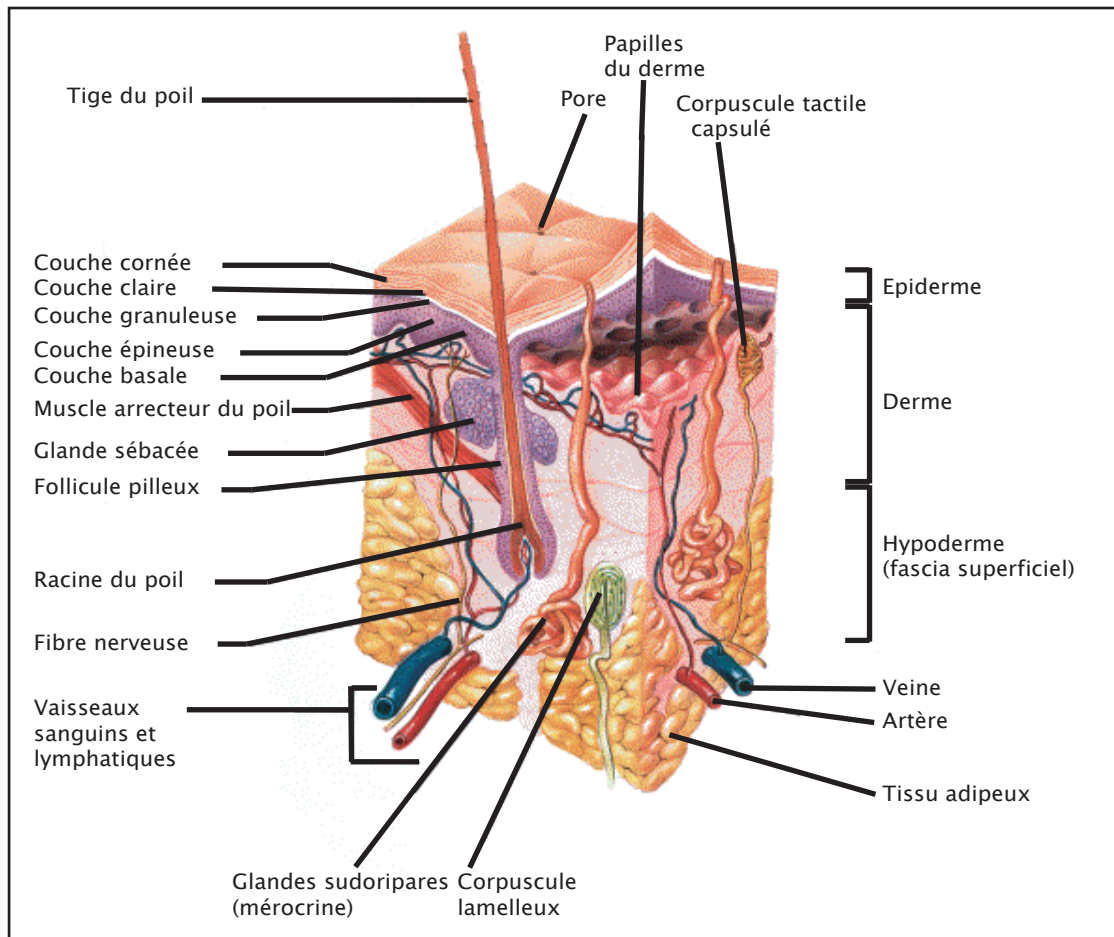


Figure 1: Structure de la peau

La peau résulte de l'association de trois tissus d'origine différente: l'épiderme (épithélium de revêtement), le derme (tissu conjonctif) et l'hypoderme (tissu adipeux).

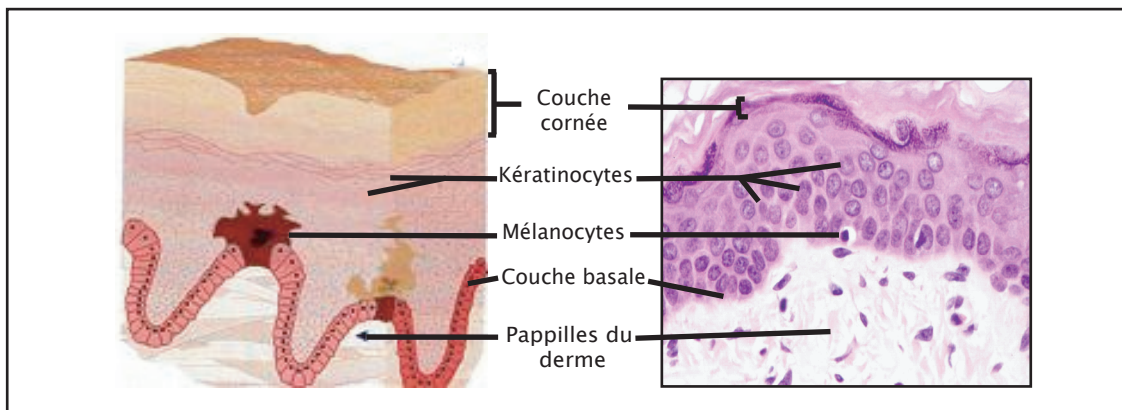


Figure 2: Structure de l'épiderme

Représentation schématique (gauche) et coupe histologique (droite) de l'épiderme. Il représente la couche superficielle de la peau et est majoritairement constitué de keratinocytes (80% de la population cellulaire) et de mélanocytes (10-15% des cellules).

(présente uniquement au niveau de la peau épaisse), la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. Ces cinq couches sont renouvelées tous les mois environ, conséquence de la kératinisation, processus de différenciation continue des kératinocytes apparaissant au niveau de la couche basale et transformés en kératine au niveau de la couche cornée. Ce renouvellement permet la desquamation (détachement de la couche superficielle par petits lambeaux) et peut conduire à un épaissement par la formation de callosités suite à une répétition de traumatismes. Outre les kératinocytes, on retrouve principalement trois autres types cellulaires au niveau de l'épiderme: les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.

I.1.1 Les kératinocytes

Ce sont les cellules les plus nombreuses puisqu'elles constituent 80% de la population cellulaire de l'épiderme (Figure 2). Leur principale caractéristique est leur capacité à se différencier en fabriquant de la kératine selon le processus de kératinisation. La kératine est une protéine fibreuse, insoluble dans l'eau qui confère aux kératinocytes leur fonction de protection.

Au niveau de la couche basale, leur division est régulière. Ils forment une seule assise cellulaire cylindrique dont le grand axe est perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique. Ils sont liés entre eux par des desmosomes et à la membrane basale par des héli desmosomes. Ils se différencient et migrent pour former des cellules polyédriques et semblent hérissées d'épines au niveau de la couche épineuse. Puis les kératinocytes se superposent et continuent leur migration progressive vers la surface en se différenciant et en se chargeant de filaments très résistants de kératine.

Atteignant la couche granuleuse, les kératinocytes (alors cellules granuleuses) commencent à perdre leur noyau ainsi que leurs organites cytoplasmiques par un mécanisme de dégradation impliquant une activation partielle de la machinerie de l'apoptose. Les cellules s'aplatissent et leur axe nucléaire devient parallèle à la jonction dermo-épidermique. Dans la partie supérieure de la couche granuleuse, les cellules sont kératinisées, scellées entre elles pour former la couche protectrice remplissant la fonction la plus importante de la peau.

Enfin, au niveau de la couche cornée les kératinocytes se réduisent à des cellules aplaties remplies de kératine très dense et dépourvues d'organites cellulaires, dont la membrane est renforcée par l'accumulation de protéines. Les cellules situées au niveau le plus superficiel ont perdu leurs jonctions et se détachent, formant ainsi le squame.

I.1.2 Les mélanocytes

Les mélanocytes représentent la deuxième population cellulaire de l'épiderme (10 à 15 % des cellules épidermiques) (Figure 2). Dérivant de cellules totipotentes de la crête neurale, ils sont situés au niveau de la couche basale de l'épiderme, entourés de kératinocytes (1 mélanocyte pour 40 keratinocytes). Leur structure étoilée présente des prolongements cytoplasmiques (dendrites) qui s'insinuent entre les kératinocytes. Les mélanocytes présentent un faible taux de renouvellement, leur nombre varie selon la localisation. Quasiment absents au niveau des paumes, plantes et muqueuses (une centaine/mm²), ils sont très abondants au niveau de la papille des poils et des cheveux et sur les parties découvertes (entre 1000 et 2000/mm²).

Les mélanosomes, vésicules spécifiques des mélanocytes, sont les lieux de synthèse de la mélanine, pigment photoprotecteur qui est ensuite transféré aux kératinocytes. On distingue deux types de pigments, la phéomélanine (rouge) et l'eumélanine (noire), dont les proportions engendrent la diversité de couleur de peau chez l'homme.

I.1.3 Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans représentent 2 à 8% de la population cellulaire épidermique. Elles dérivent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et se localisent majoritairement au niveau de la couche cornée. Ce sont des cellules dendritiques mobiles, possédant de longs prolongements dendritiques s'étendant entre les kératinocytes, et sont les piliers de la réponse immunitaire. Ce sont les seules cellules présentatrices d'antigènes de l'épiderme, capables de phagocytose leur valant le surnom de "macrophages de l'épiderme". Elles sont donc à l'origine de la stimulation lymphocytaire et de l'induction de la réponse immune. Elles sont également capables de reconnaître les kératinocytes en transformation maligne.

I.1.4 Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel (<1% des cellules de l'épiderme) siègent au niveau de la couche basale. D'abord considérées comme dérivant de la crête neurale, de récents arguments démontrent qu'elles dérivent de cellules épithéliales (Van Keymeulen *et al.*, 2009). Récepteurs cutanés, ces cellules neuro-endocrines produisent des neuromédiateurs sensibles à la pression (peptide intestinal vasoactif, sérotonine, somatostatine, neurotensine). Leurs prolongements

cytoplasmiques infiltrés entre les kératinocytes permettent l'enregistrement et la transmission à des terminaisons nerveuses des moindres vibrations à l'intérieur de l'épiderme.

I.2 Le derme

Situé sous l'épiderme, ce tissu conjonctif dense et irrégulier constitue le support solide de la peau et détermine sa structure générale (Figure 1). Beaucoup plus épais que l'épiderme, son épaisseur varie selon les régions, de 0.5 mm aux zones de peau fine (visage, cou, plis de flexion) jusqu'à 1 cm sur la peau épaisse du dos. C'est un tissu de soutien compressible, extensible et élastique composé de collagène (I et III) et d'élastine dont les qualités physiques protègent l'épiderme. Renfermant le système vasculaire de la peau, son rôle est important dans la thermorégulation et dans la nutrition de l'épiderme.

La population cellulaire du derme est majoritairement composée de fibroblastes, cellules d'origine mésenchymateuse responsables de la synthèse des glycoprotéines de structure. On y retrouve aussi macrophages, mastocytes et divers types de leucocytes impliqués dans la surveillance et la réponse immunitaire.

Le derme peut être subdivisé en deux zones. Le derme papillaire en surface, de structure assez lâche mais très vascularisé ce qui en fait la zone d'échanges nutritifs avec les couches profondes de l'épiderme. Dans cette région se trouvent les récepteurs du toucher et de la douleur. La couche réticulaire (la majeure partie du derme), profonde et plus dense contient plus de fibres que la zone papillaire. On y retrouve les récepteurs à la pression.

I.3 L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu adipeux blanc rattaché à la partie inférieure du derme par les expansions de collagène et divisé en lobules graisseux (Figure 1). Représentant 15 à 20 % du poids corporel chez un individu adulte normal, il est le plus grand réservoir énergétique de l'organisme, lieu de stockage des lipides sous forme de triglycérides. Il constitue la partie la plus profonde du derme, richement vascularisée, qui contient les terminaisons nerveuses, les parties inférieures des follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares (Césarini, 1990 ; Graham-Brown et Burns, 1991 ; Mélissopoulos et Levacher, 1998 ; Avril *et al.*, 2002).

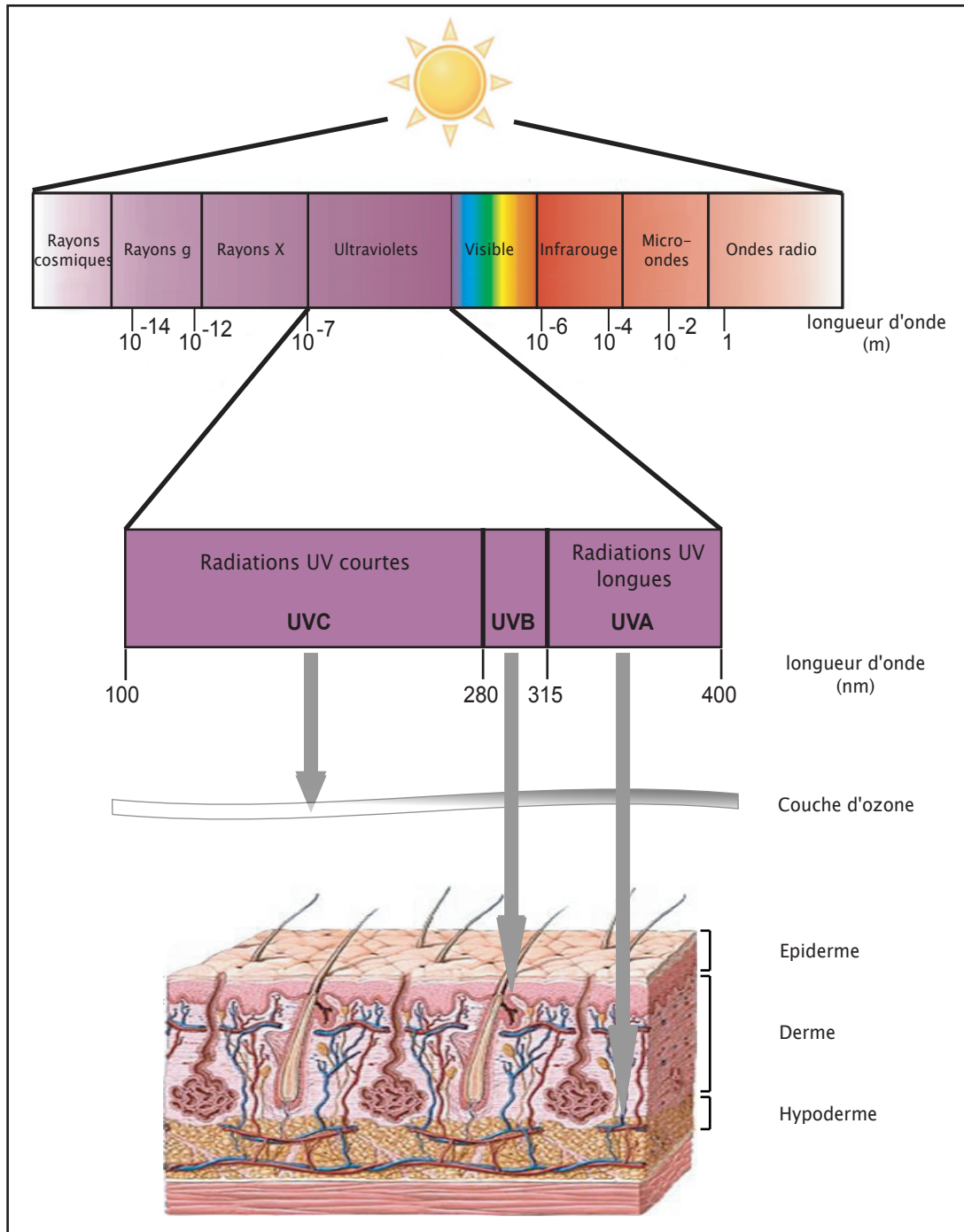


Figure 3: Spectre de la lumière solaire et pénétrance des radiations UV dans la peau

Le spectre solaire se fractionne en ondes radio, micro-ondes, infrarouges, lumière visible, radiations UV, rayons X, rayons γ et rayons cosmiques. Les radiations UV représentent environ 8% du spectre solaire atteignant la surface terrestre et sont séparées en trois fractions selon leurs longueurs d'ondes: UV-C (100-280 nm), UV-B (280-315 nm) et UV-A (315-400 nm). Les UV-C sont normalement bloqués par la couche d'ozone, les UV-B pénètrent l'épiderme jusqu'à la couche basale et les UV-A peuvent atteindre les couches profondes de la peau, l'hypoderme.

II - Les radiations UV et leurs impacts biologiques

La peau est continuellement soumise aux radiations ultravioletes (UV), le plus souvent d'origine solaire mais aussi de plus en plus provenant de l'utilisation sociologique de sources artificielles, les cabines de bronzage. Ces radiations sont responsables de différents dommages de l'ADN des cellules de l'épiderme et du derme (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes), ce qui en fait le principal facteur de risque environnemental de développement de cancers cutanés. La pigmentation UV-induite (le bronzage), constitue une protection cutanée efficace de prévention des effets néfastes de ces radiations.

Dans cette partie nous étudierons les dommages cellulaires, principalement sur l'ADN, induits par les radiations UV d'origine solaire que l'on sépare en trois types selon leur longueur d'onde. D'autres sources d'émission existent, notamment les cabines de bronzage qui sont récemment passées du niveau 2 (probablement cancérigènes) au niveau 1 (cancérigènes pour l'homme) dans la classification du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer), l'agence d'étude du cancer, partie de l'OMS (Organisation mondiale de la Santé). Les radiations UV de ces cabines dont le caractère dangereux est désormais reconnu ne seront pas traitées du fait de leur origine. Nous décrirons dans un second temps les différentes voies permettant la pigmentation constitutive ainsi que les mécanismes permettant l'augmentation de cette protection en réponse aux radiations UV ce qui nous conduira à introduire le facteur de transcription USF-1, acteur majeur de la pigmentation UV-induite. Enfin nous décrirons les principaux cancers cutanés liés à une exposition excessive aux radiations UV.

II.1 Radiations UV solaires et dommages associés

Les rayonnements ultraviolets représentent environ 8% du spectre solaire atteignant la surface terrestre. Les autres fractions incluent les ondes radio, les micro-ondes, les infrarouges, la lumière visible, les rayons X et les rayons γ (Figure 3). Les UV sont des radiations non ionisantes dont la longueur d'onde est comprise entre 400 (lumière visible) et 100 nm (rayons X). Leurs effets biologiques varient selon la longueur d'onde ce qui a conduit à les séparer en 3 sous groupes: UV-A (400-320 nm), UV-B (320-280 nm) et UV-C (280-100 nm) (Diffey, 2002). La couche d'ozone retenant les radiations de faible longueur d'onde (<290nm), seuls les UV-A et une fraction des UV-B atteignent la surface terrestre. Face à la diminution progressive de la couche d'ozone, cette filtration pourrait être remise en question. Ainsi une réduction de 10% de la couche d'ozone pourrait conduire à une augmentation de 15-20% d'exposition aux radiations UV. Par ailleurs, le flux d'UV-A est stable, tandis que la

quantité d'UV-B atteignant la surface terrestre varie selon différents paramètres: l'horaire, la saison, l'altitude... (World Health Organization, 1994. Environmental health criteria 160: ultraviolet radiation, WHO, Geneva) (Kelfkens *et al.*, 1990).

II.1.1 Les UV-A

Les UV-A, dont la longueur d'onde est la plus longue (320-400 nm), représentent près de 95 % des radiations UV atteignant la surface terrestre. Bien plus pénétrants que les UV-B, ils atteignent les couches profondes de la peau jusqu'à l'hypoderme (Bruls *et al.*, 1984). D'abord considérés comme relativement inoffensifs, les UV-A sont maintenant reconnus comme responsables de dommages des protéines (pontages ADN-protéine) et de l'ADN, conduisant à un vieillissement de la peau et à la cancérogenèse (He *et al.*, 2006).

Faiblement absorbés par l'ADN, les effets génotoxiques des UV-A sont majoritairement indirects via la formation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La génération des ROS est la conséquence de l'absorption des photons par des molécules photosensibilisantes endogènes (groupements de type hème, porphyrine, quinone, ou flavine). Ces molécules réagissent ensuite avec un autre substrat (réaction de type I) ou avec l'oxygène (réaction de type II). Dans la réaction de type I, le transfert d'électron produit des ions radicaux comme le radical cation de guanine à l'origine de la formation des 8-oxo-dG (7.8-dihydro-8-oxodesoxyguanosine), signature des UV-A (Figure 4). Cette oxydation des guanines prédispose aux tranversions GC en TA jouant ainsi un rôle dans la carcinogenèse cutanée (Shibutani *et al.*, 1991). Les réactions de type II produisent des ROS avec majoritairement des oxygènes singulets ($^1\text{O}_2$) responsables de modifications des guanines, et plus faiblement des anions superoxydes. Ces derniers sont convertis par les superoxydes dismutases en peroxydes d'hydrogène (H_2O_2), et conduisent à l'apparition de radicaux hydroxyles ($^\circ\text{OH}$) capables d'affecter tout nucléotide, entraînant des lésions de bases à l'origine de mutations (Kawanishi *et al.*, 2001 ; Ridley *et al.*, 2009).

Les UV-A semblent aussi être responsables de dommages de types CPD (dimères de pyrimidine cyclobutane), comme les UV-B mais avec une efficacité moindre d'un facteur 10^4 à 10^6 . Le mécanisme, effet direct ou indirect par transfert de charge de chromophores excités, est sujet à controverse (Runger et Kappes, 2008).

II.1.2 Les UV-B

Les UV-B (280-320nm) représentent environ 5% du spectre solaire. Ce sont les

radiations les plus énergétiques atteignant la surface terrestre. La majorité de ces radiations est absorbée par la couche cornée de l'épiderme, seuls 10% atteignent la couche basale. Ils sont responsables de la pigmentation photo-induite, d'érythème (réaction inflammatoire) et de nombreux dommages de l'ADN qui absorbe fortement les UV-B. L'absorption directe des radiations UV-B par les bases pyrimidiques, entraîne la formation de photoproduits dimériques impliquant deux bases adjacentes.

II.1.2.1 Les dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD)

Les dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD) ont été les premiers dommages UV-induits identifiés (Beukers et Berends, 1960), et représentent la majorité (75%) des photoproduits d'ADN induits par les UV-B. Leur formation est responsable d'environ 80% des mutations UV-B induites dans les cellules de mammifères (You *et al.*, 2001 ; Pfeifer *et al.*, 2005). Les CPD induisent une faible distorsion de la double hélice d'ADN. Ils proviennent d'une cycloaddition des doubles liaisons C5-C6 entre deux bases pyrimidiques adjacentes (Figure 4). La formation de ce dimère peut être reversée par clivage de la boucle cyclobutane sous l'action des radiations UV-B ou C. Ceci peut rétablir les bases pyrimidiques d'origine, ou conduire à l'apparition d'uracile dans le cas où le dimère contient une cytosine subissant une désamination par hydrolyse du groupement amine (NH₂) sur le carbone en position C4 par un groupement hydroxyde (OH). Cette désamination joue un rôle important dans la mutagenèse puisque la présence d'un photoproduit contenant un uracile induit une incorporation prédominante d'adénine à la place de l'uracile. Ce processus entraîne donc le remplacement d'une cytosine en adénine (Ravanat *et al.*, 2001).

II.1.2.2 Les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone ((6-4) PP)

Les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone ((6-4) PP) représentent la deuxième classe de photoproduits pyrimidiques en termes quantitatifs. Ces adduits provoquent une distorsion de l'ADN bien plus importante que les CPD et sont éliminés plus rapidement que ces derniers. Ils apparaissent par cycloaddition, impliquant la double liaison C5-C6 de l'extrémité 5' d'une pyrimidine et le groupement carbonyle C4 en extrémité 3' d'une pyrimidine adjacente (Figure 4). Cette cycloaddition entraîne la formation d'un intermédiaire instable spontanément réarrangé en adduit (6-4) PP (Tornaletti et Pfeifer, 1996 ; Ravanat *et al.*, 2001). Une des propriétés remarquable des (6-4) PP est leur conversion en isomères de Dewar sous l'action des radiations de faible longueur d'onde.

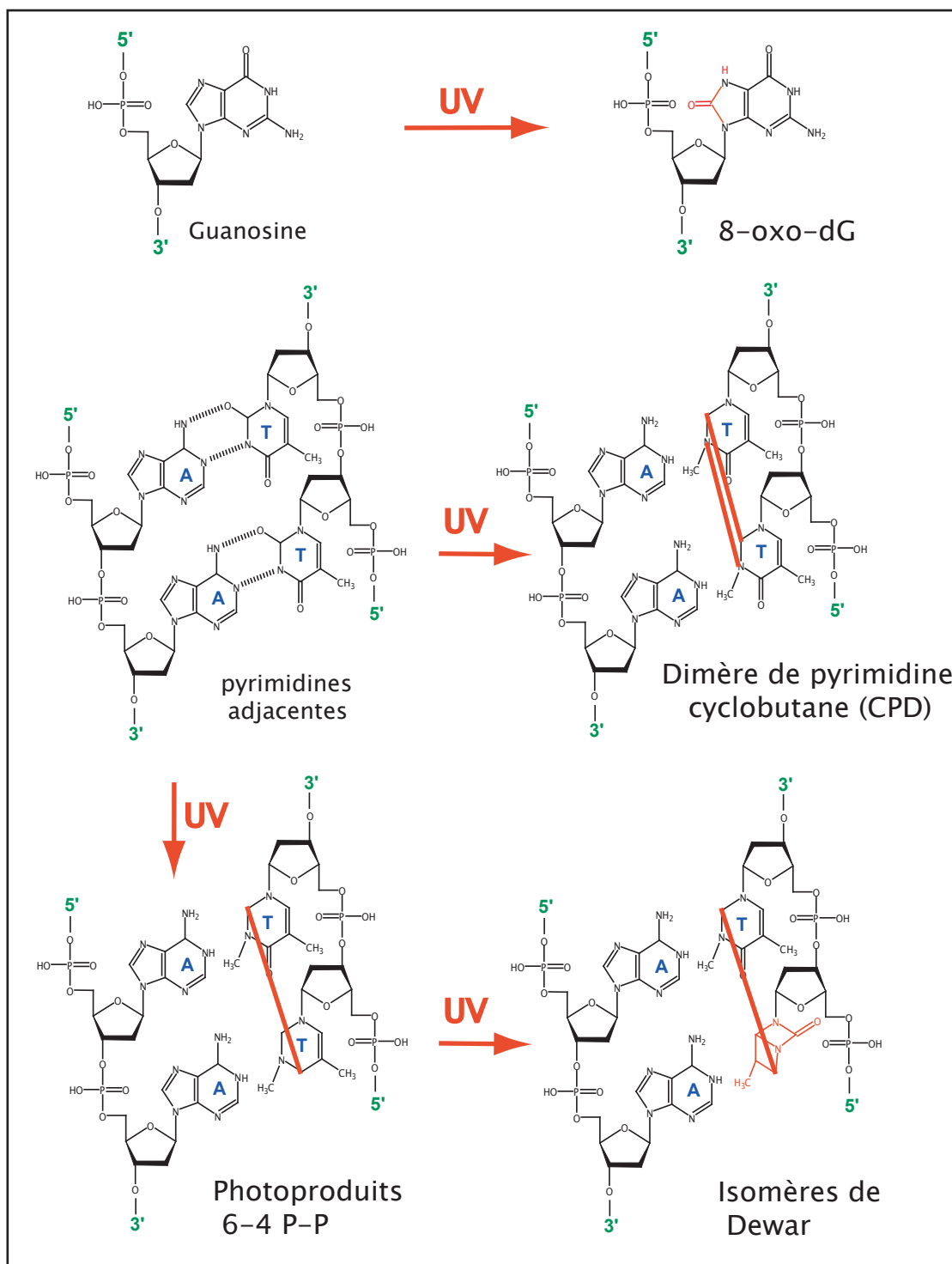


Figure 4: Dommages de l'ADN induits par les radiations UV

Les radiations UV (Ultraviolets) atteignant la peau sont responsables de deux types majeurs de dommages sur l'ADN: les 8-oxo-dG et les photoproduits dimériques. Ces photoproduits impliquent deux bases adjacentes et sont de trois types: des dimères de pyrimidine cyclobutane (CPD), des (6-4) photoproduits ((6-4)PPs) et les isomères de Dewar qui proviennent de la photo-isomérisation des (6-4) PPs. (adapté de S.Corre, 2005)

II.1.2.3 Les isomères de Dewar

Les isomères de Dewar sont le résultat de la photo-isomérisation par les radiations UV d'une des deux pyrimidines d'un (6-4) PP (Taylor *et al.*, 1988) (Figure 4). Longtemps sous-évalués, ces isomères des (6-4) PP ont été beaucoup moins étudiés que les deux autres types de dimères (CPD et (6-4) PP). Ils pourraient jouer un rôle important dans la mutagenèse cutanée du fait de leur fréquence d'apparition et de leur lente élimination, comparable à celle des CPD (Perdiz *et al.*, 2000).

II.1.2.4 l'oxydation des guanines (8-oxo-dG)

Il a été montré que les UV-B pouvaient aussi être responsables de l'apparition de 8-oxo-dG, oxydation de type I des guanines, considérés jusque là comme spécifique des UV-A (cf chapitre II.1.1). Ceci implique que les UV-B comportent, comme les UV-A, une composante oxydative agissant indirectement sur l'ADN (Ahmed *et al.*, 1999).

II.1.3 Les UV-C

Les UV-C sont les radiations UV les plus énergétiques. La séparation des radiations de faibles longueurs d'ondes en UV-B et UV-C a été établie sur le fait que ces radiations sont bloquées par la couche d'ozone et n'atteignent donc pas la surface terrestre sauf dans des hautes altitudes. Cependant l'accentuation du "trou de la couche d'ozone" dans certaines zones terrestres (en particulier Australie et Amérique du Sud) pourrait avoir un impact sur ce blocage des UV-C.

Bien que n'atteignant pas ou très peu, dans des conditions physiologiques, la barrière cutanée, une irradiation d'UV-C provoque les mêmes types de dommages que l'exposition aux UV-B, mais en proportions différentes. On y retrouve moins de CPD, plus de (6-4) PP avec cependant une absence de conversion en isomères de Dewar (Rosenstein et Mitchell, 1987 ; Perdiz *et al.*, 2000). En laboratoire, ils sont fréquemment utilisés pour les expérimentations biologiques du fait de leur grande énergie, l'induction d'importants dommages sur l'ADN ne nécessitant que de très faibles doses et donc des temps d'exposition très courts.

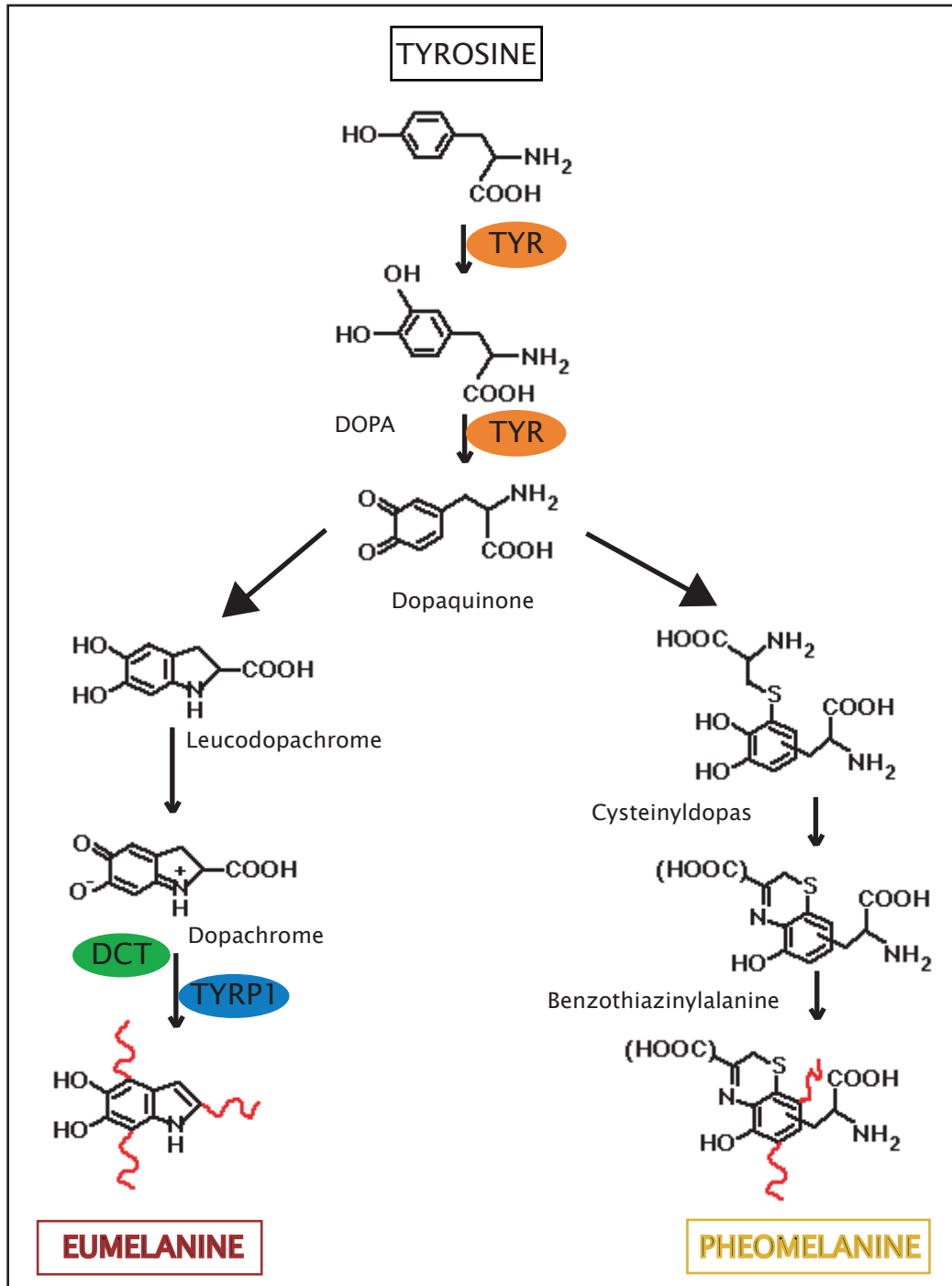


Figure 5: Synthèse de la mélanine

Il existe deux formes de mélanine: l'eumélanine (pigment photoprotecteur noir-marron) et la phéomélanine (jaune orangé non photoprotecteur). Ces deux molécules sont issues d'un précurseur physiologique commun: la tyrosine. TYR: Tyrosinase ; DCT: Dopachrome tautomerase ; TYRP1: Tyrosinase Related Protein 1

II.2 La pigmentation : photoprotection cutanée contre les radiations UV

Contre les effets néfastes des radiations UV, la pigmentation constitue la seule protection efficace de la barrière cutanée, par la production de mélanine, le pigment photoprotecteur.

II.2.1 La mélanine

La mélanine est synthétisée au niveau du mélanocyte, à l'intérieur d'organites cytoplasmiques ovoïdes appelés mélanosomes, puis transférée aux kératinocytes adjacents. On distingue deux types de mélanine: la phéomélanine, de couleur jaune orangée, cytotoxique et non photoprotectrice et l'eumélanine pigment photoprotecteur noir-marron. Leur quantité relative est déterminante dans la photoprotection et se traduit par les différences de phototype, allant de l'individu à peau claire et cheveux blonds/roux, naturellement plus sensible aux radiations UV et dont la phéomélanine est la forme prédominante, à l'individu à peau foncée et cheveux noirs, plus protégé des UV et qui possède majoritairement de l'eumélanine (Hunt *et al.*, 1995).

Les deux formes de mélanine sont issues d'un précurseur physiologique commun, la tyrosine, qui après modifications va conduire à la phéomélanine ou l'eumélanine (Figure 5). Parmi les enzymes impliquées dans la mélanogenèse, la Tyrosinase (TYR), commune aux deux voies, est l'enzyme limitante. La synthèse d'eumélanine nécessite 2 autres enzymes importantes, la DOPAchrome tautomerase (codée par le gène *DCT* ou *TRP-2*) et la DHICA oxydase ou TRP-1 (Tyrosinase Related Protein 1) qui aurait un rôle stabilisateur de l'activité Tyrosinase (Kobayashi *et al.*, 1994 ; Kobayashi *et al.*, 1998). La concentration de ces enzymes est essentielle dans le contrôle de la balance eumélanine/phéomélanine et donc dans la nature de la pigmentation cutanée.

Le rôle de la mélanine est primordial car elle est responsable de la pigmentation, seul mécanisme efficace de protection des cellules contre l'irradiation UV solaire, limitant ainsi la carcinogenèse cutanée. En tant que chromophore, l'eumélanine absorbe les photons, diminuant la quantité de radiations UV atteignant l'épiderme (Smit *et al.*, 2001). *In vivo*, il a ainsi été montré que la quantité de photo-adduits était inversement proportionnelle à la quantité de mélanine présente dans la cellule (Kobayashi *et al.*, 1993 ; Kadarko *et al.*, 2003). De plus, indépendamment de son type (phéo ou eumélanine), la mélanine est capable de se

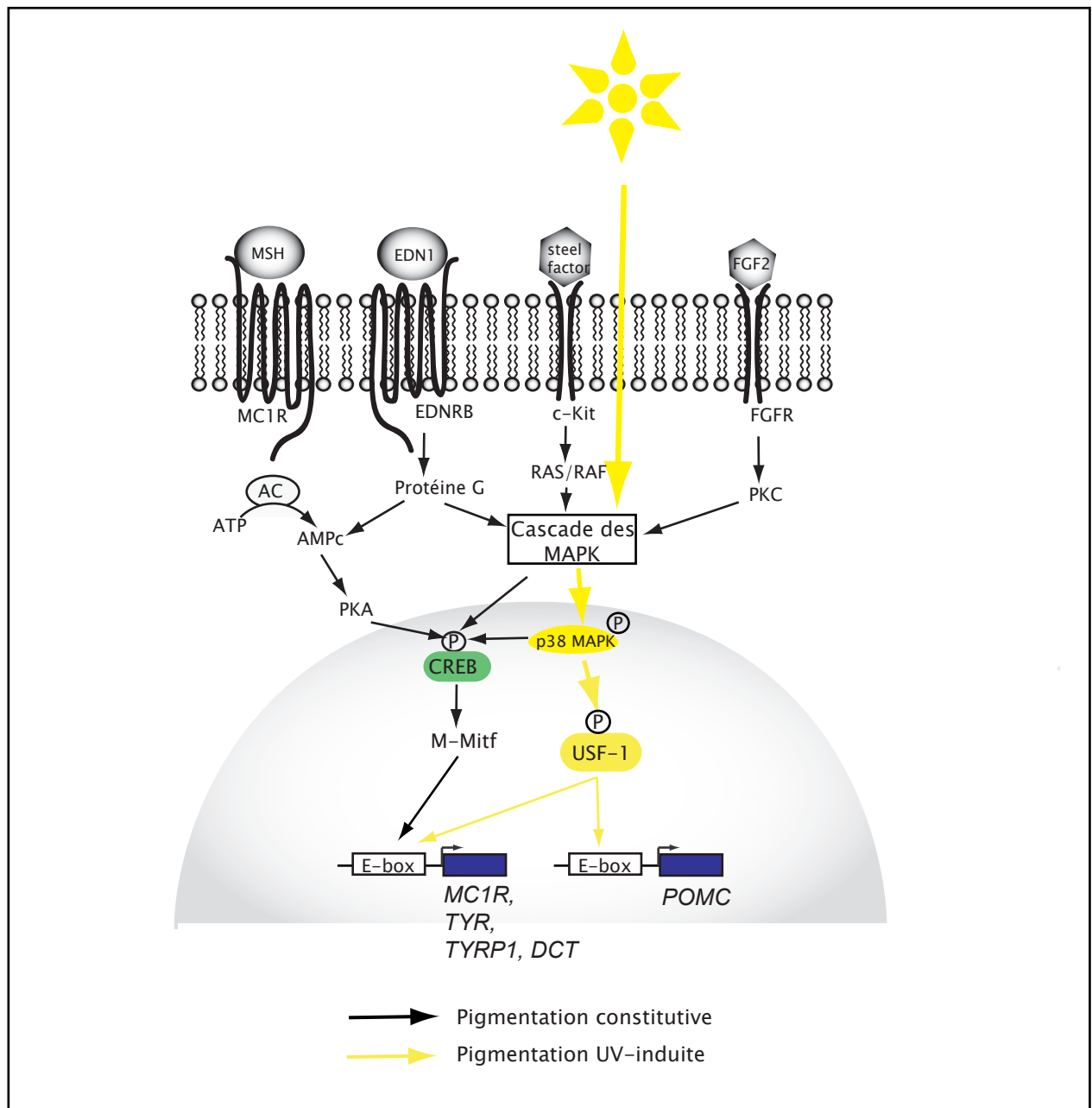


Figure 6: Pigmentation constitutive et UV-induite

La pigmentation constitutive (flèches noires) fait intervenir quatre voies principales qui conduisent à l'activation transcriptionnelle par le facteur de transcription Mitf des gènes codant les protéines MC1R, TYR, TYRP1 et DCT. En réponse à une irradiation UV (flèches jaunes), le facteur de transcription USF-1 est phosphorylé par la protéine kinase p38 MAPK et remplace Mitf, ce qui conduit à une augmentation de l'induction transcriptionnelle des gènes *MC1R*, *TYR*, *TYRP1* et *DCT* et l'induction transcriptionnelle du gène *POMC*.

MSH: Melanocyte Stimulating Hormon; EDN1: Endothelin 1; FGF2: Fibroblast Growth Factor 2; MC1R: Melanocortin 1 receptor; AC: Adenylate cyclase; PKA/C: Protein Kinase A/C; AMP/ATP Acide mono/tri phosphate; CREB: cAMP Responsive Element binding protein; Mitf: Microphthalmia; USF-1: Upstream Stimulating Factor-1 (adapté de S.Corre, 2005)

fixer aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) diminuant le risque d'oxydation des guanines (Bustamante *et al.*, 1993).

II.2.2 La pigmentation constitutive

Les interactions étroites entre les différents types cellulaires de l'épiderme, en particulier les coopérations entre kératinocytes majoritaires et mélanocytes, sont importantes dans le contrôle de la mélanogénèse. Les kératinocytes sont le lieu de synthèse de plusieurs facteurs paracrines (α -MSH, FGF2, END1, SCF) dont les cibles naturelles sont situées à la membrane des mélanocytes. Ces facteurs vont notamment intervenir dans la synthèse constitutive de la mélanine qui comprend quatre voies principales: la voie de l'AMP cyclique, la voie Steel Factor/Kit, la voie de l'endothéline 1 et la voie FGF2, qui conduisent à l'activation du facteur de transcription Microphthalmia (*Mitf*) (Figure 6).

II.2.2.1 La voie de l'AMP cyclique (AMPc):

L'activation de la voie de l'AMP cyclique, après liaison de l'hormone α -MSH (Melanocyte Stimulating Hormon) à son récepteur MC1R, joue un rôle clé dans la pigmentation. Au niveau de l'épiderme, dans les kératinocytes et les mélanocytes, l' α -MSH est produite par le clivage de l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH) précurseur issu du clivage d'une pro-hormone codée par le gène *POMC* (Pro-Opio-Mélano-Cortine) (Schauer *et al.*, 1994 ; Wintzen et Gilchrest, 1996). La liaison de l' α -MSH à son récepteur MC1R situé sur la membrane des mélanocytes, active l'adénylate cyclase conduisant à une augmentation importante du taux intracellulaire d'AMPc. L'AMPc est alors capable de fixer la sous unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA) qui, activée, va être transférée dans le noyau et venir phosphoryler les facteurs de transcription de la famille CREB (cAMP responsive element binding protein). P-CREB active la transcription des gènes dont le promoteur possède un motif CRE (5'-TGACCTCA-3'). Parmi ces gènes cibles, l'augmentation d'expression du facteur de transcription Microphthalmia (*Mitf*) conduit à l'activation transcriptionnelle des gènes codant les enzymes clés de la mélanogénèse, *MC1R*, *TYR*, *TYRP1* et *DCT* (Goding, 2000 ; Widlund et Fisher, 2003).

II.2.2.2 La voie Steel Factor/Kit

Le "steel factor" ou c-kit ligand est un facteur de croissance sécrété par les kératinocytes qui se lie au récepteur tyrosine kinase c-Kit. Cette liaison entraîne l'activation de la voie des MAPK qui conduit à l'activation du facteur CREB et par conséquent Mitf facteur clé de la pigmentation constitutive (Hemesath *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter que l'expression du gène *c-kit* est augmentée après stimulation par les UV-B selon un mécanisme non décrit. Ainsi le couple Steel Factor/Kit interviendrait aussi dans la réponse pigmentaire photo-induite (Hachiya *et al.*, 2001).

II.2.2.3 La voie de l'endothéline 1

L'endothéline, peptide vasoconstricteur des cellules endothéliales est synthétisé par les kératinocytes. Sécrété dans le milieu extracellulaire, il intervient dans la prolifération mélanocytaire et la pigmentation (Yohn *et al.*, 1993). La fixation de l'endothéline sur son récepteur spécifique (EDNRB) présent sur la membrane des mélanocytes va activer l'AMPC conduisant à une augmentation de l'expression des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* et donc de la mélanogénèse. L'endothéline induit aussi la phosphorylation activatrice de TYR et l'expression de *POMC* (Imokawa *et al.*, 1997).

II.2.2.4 La voie FGF2

Le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) est un facteur de croissance fibroblastique synthétisé et sécrété par les kératinocytes. Sa fixation à son récepteur spécifique (FGFR-1) entraîne l'activation de la voie des MAPK. Ce facteur semble aussi participer dans la pigmentation UV-induite par l'induction de l'expression du gène *MC1R* après stimulation UV (Scott *et al.*, 2002).

II.2.2.5 Le facteur de transcription Microphthalmia (MITF)

C'est par une approche génétique que le gène *MITF* a été impliqué dans la biologie des mélanocytes. En effet, les mutations de ce gène conduisent chez la souris à des anomalies de la couleur du pelage et parfois à une réduction de la taille des yeux (microphthalmie). Chez l'homme, les mutations du gène *MITF* sont responsables du syndrome de Waardenburg de type IV, qui se caractérise entre autre par des troubles de la pigmentation et une perte auditive due à la présence de mélanocytes au niveau de l'oreille interne (Tassabehji *et al.*, 1994). La

perte complète du gène conduit à la perte de la lignée mélanocytaire (Steingrímsson *et al.*, 2003), ce qui a permis d'envisager puis d'impliquer MITF dans la régulation de gènes essentiels pour la survie et différenciation cellulaire $p21^{WAF1/CIP1}$, $p16/INK4A$, $BCL2$ (Levy *et al.*, 2006).

La protéine MITF appartient à la famille des facteurs de transcription de type basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper (bHLH-LZ). Cette famille de facteurs active la transcription de gènes par fixation au niveau de motifs consensus appelés boîtes-E de séquence consensus CANNTG. La séquence de ces boîtes de régulation varie selon la nature des nucléotides centraux et environnants. Ainsi la protéine MITF fixe spécifiquement les boîtes M dérivées des boîtes E et de séquence 5'-tCATGTGa-3' (Aksan et Goding, 1998). Dans la pigmentation constitutive, l'activation majeure du facteur MITF se fait via le facteur CREB phosphorylé, mais il existe aussi d'autres mécanismes de régulation de la protéine par des phosphorylations, ubiquitinations et sumoylations impliquant notamment les voies AMPc et MAPK (Goding, 2000).

De nombreux gènes sont régulés par le facteur MITF notamment dans la différenciation, le développement et la pigmentation. Dans le mécanisme direct de la pigmentation constitutive, l'activation du facteur MITF conduit à sa fixation des boîtes M au niveau des régions promotrices des gènes *TYR*, *TYRP1* et *DCT* conduisant à leur activation transcriptionnelle et ainsi à la synthèse de mélanine (Yasumoto *et al.*, 1994 ; Yasumoto *et al.*, 1997 ; Schwahn *et al.*, 2005). En amont de la mélanogénèse, MITF active aussi la transcription des gènes *MC1R* et *C-KIT*, activateur de la voie des MAPK (Tsujimura *et al.*, 1996 ; Aoki et Moro, 2002).

II.2.3 La pigmentation UV-induite

La pigmentation induite par les UV est un mécanisme essentiel puisqu'il permet d'accroître la principale protection de la barrière cutanée face aux radiations. Cette régulation implique majoritairement un autre membre de la famille des bHLH-LZ, le facteur de transcription Upstream Stimulating Factor 1 (USF-1) (Figure 6). En réponse au stress UV, cette protéine est activée par phosphorylation par la kinase p38-MAPK au niveau de la thréonine 153. Le facteur USF-1 phosphorylé vient suppléer la protéine MITF dans l'activation transcriptionnelle des gènes de la mélanogénèse (*MC1R*, *DCT*, *POMC*, *TYR*) qui conduit à une augmentation de leur expression, ce qui résulte finalement en une synthèse

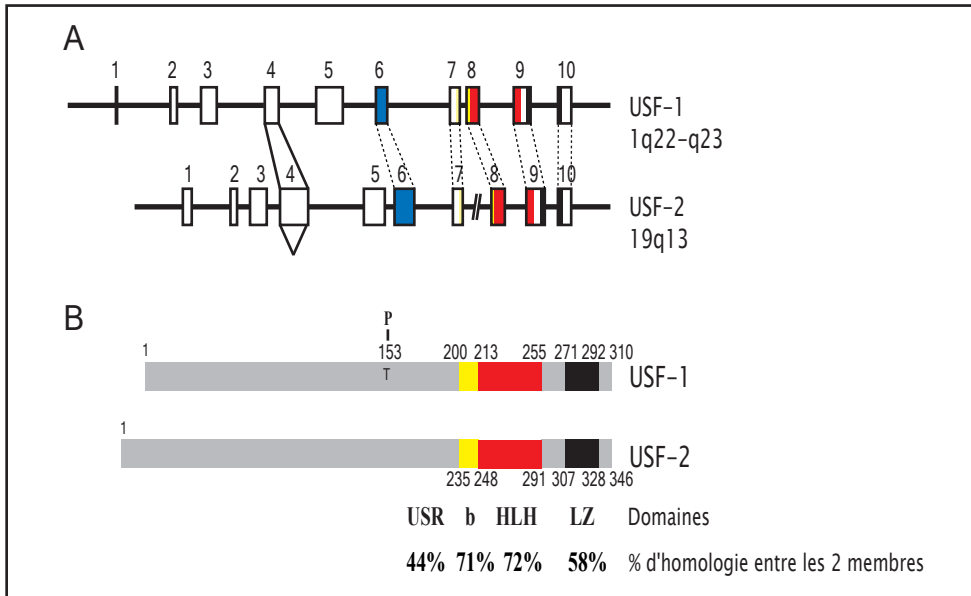


Figure 7: Structure génétique et protéique des facteurs de transcription USF

A: Les gènes *USF-1* et *USF-2* sont constitués de 10 exons. Les couleurs correspondent au domaine USR (région spécifique des facteurs USFs) (bleu), la région basique (jaune), le domaine Hélice-Boucle-Hélice (rouge) et le domaine leucine zipper (noir). B: Organisation protéique des facteurs USF-1 et USF-2. Les facteurs USF appartiennent à la famille des facteurs de transcription b-HLH-LZ (basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper) et présentent une structure protéique similaire avec une bonne conservation des domaines d'activité. (adapté de S.Corre, 2005)

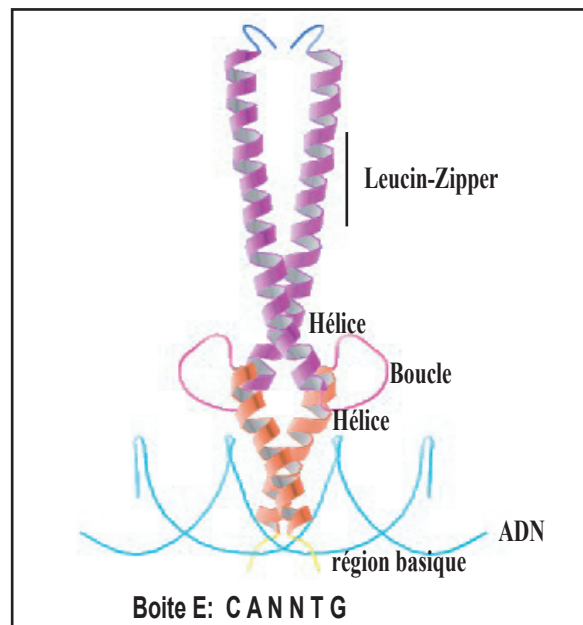


Figure 8: Représentation tri-dimensionnelle des facteurs b-HLH-LZ

Les facteurs USF appartiennent à la famille des facteurs de transcription b-HLH-LZ (basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper) qui se caractérisent par une région basique de liaison à l'ADN au niveau de séquences consensus boîtes-E, et deux structures de dimérisation, les régions HLH et LZ. (adapté de S.Corre, 2005)

accrue du pigment mélanique et donc à une photoprotection plus efficace de la peau (Galibert *et al.*, 2001 ; Corre *et al.*, 2004).

En réponse à une irradiation UV, il a de plus été montré une activation transcriptionnelle des gènes codant l'endothéline et le facteur FGF2, selon un mécanisme non décrit mais indépendant du facteur de transcription USF-1 (Corre *et al.*, 2006).

II.3 le facteur de transcription USF-1

Le facteur de transcription USF-1 appartient à la famille des Upstream Stimulating Factor (USF). Cette famille USF compte deux membres, USF-1 et USF-2 respectivement de 43 et 44 kDa (Sawadogo, 1988 ; Sawadogo *et al.*, 1988). Ils ont été mis en évidence lors d'une purification biochimique des éléments de régulation *trans* du promoteur tardif de l'adénovirus (MLPA) (Sawadogo et Roeder, 1985). Ces deux facteurs ubiquitaires sont codés par deux gènes distincts *USF-1* et *USF-2*, localisés chez l'homme respectivement en 1q22-23 et 19q13 (Figure 7). L'organisation de ces gènes est comparable et présente une forte homologie au niveau de leur séquence protéique très conservée chez les mammifères (Lin *et al.*, 1994 ; Groenen *et al.*, 1996 ; Henrion *et al.*, 1996).

Les facteurs USFs appartiennent à la super famille des b-HLH-LZ (basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper) qui comprend aussi notamment les facteurs MTF, Myc, Mad, Max,... Cette famille se caractérise par une région basique responsable de la liaison à l'ADN, et deux domaines de dimérisation contigus (HLH et LZ) (Figure 8). L'interaction avec l'ADN se fait au niveau de séquences consensus CANNTG (Baxevanis et Vinson, 1993). La petite taille de cette séquence palindromique, spécifique des facteurs de la famille des b-HLH, en fait un motif très représenté dans le génome. Le nombre important de ces sites consensus implique une sélection fine des boîtes, par la nature des nucléotides centraux, préférentiellement CG pour les facteurs USFs, et par l'environnement entourant ce motif avec la présence de résidus T en 5' et AC en 3'. Ainsi le motif préférentiel de liaison des facteurs USFs est la séquence 5'-TCACGTGAC-3'. Les régions HLH et LZ permettent principalement l'interaction entre deux membres de la même sous famille, USF-1 et USF-2, conduisant à la formation d'homo ou d'hétérodimères (Sirito *et al.*, 1992).

L'activation transcriptionnelle après liaison aux motifs spécifiques boîtes-E, présents dans les séquences régulatrices des gènes cibles n'est pas le seul mécanisme de régulation impliquant le facteur USF-1. En effet des interactions protéines-protéines ont été mises en évidence entre USF-1 et d'autres facteurs tels que SP1, Pea3 ou MTF1 permettant de moduler

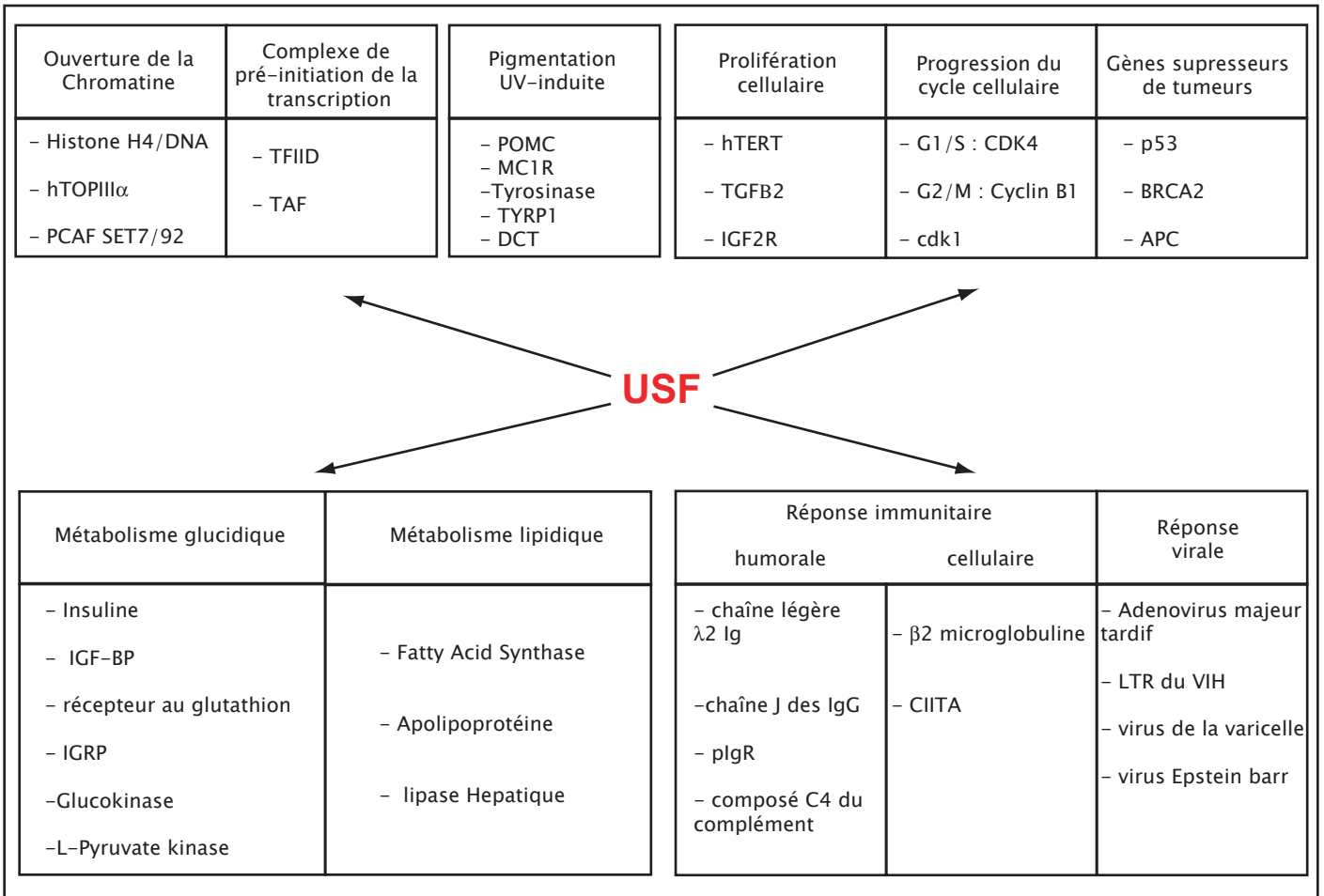


Tableau 1: Gènes cibles des facteurs de transcription USF

Les facteurs de transcription USF (Upstream Stimulating Factor) sont des activateurs de la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans la transcription et la réponse à différents stress cellulaires. Ce schéma présente ces gènes cibles et les voies cellulaires dans lesquelles interviennent leurs produits.

(adapté de S. Corre, 2005)

cette régulation transcriptionnelle (Andrews *et al.*, 2001 ; Ge *et al.*, 2003 ; Firlej *et al.*, 2005). De plus USF-1 interagit directement avec le facteur TFIID et certains TAFs présents dans le complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription de gènes possédant une boîte TATA, ou avec le facteur TFII-I et SP1 impliqués dans la reconnaissance des séquences initiatrices (Inr) de la transcription dans le cas des promoteurs TATA-less (Roy *et al.*, 1991). Enfin la protéine USF-1 régule le gène de la Topoisomérase III (hTOP3A) et recrute CAF et SET7/9, enzymes impliquées dans l'acétylation et la méthylation des histones. Ces protéines entraînent un remodelage de la chromatine favorisant ainsi son ouverture pour l'accès de la machinerie de transcription (Corre et Galibert, 2005).

Outre son rôle central dans la régulation de la pigmentation UV-induite, le facteur USF-1 est un facteur clé impliqué dans la régulation de nombreux mécanismes notamment en réponse au stress (Tableau 1). Ce rôle essentiel et la coopération des deux membres de la famille USF est mis en évidence par le phénotype létal des souris double KO USF-1 et USF-2 (Sirito *et al.*, 1998 ; Casado *et al.*, 1999).

Ainsi le facteur USF-1 est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire humorale et cellulaire en contrôlant partiellement l'expression des gènes codant certaines chaînes des immunoglobulines, le récepteur spécifique pIgR, le gène codant la protéine C4 du complément, le gène de la $\beta 2$ microglobuline ou encore le gène *CIITA*. USF-1 est aussi impliqué dans la prolifération virale, par détournement de sa fonction au profit de la machinerie transcriptionnelle virale dans des infections par l'adénovirus majeur tardif, le VIH, le virus de la varicelle ou le virus Epstein-Barr (Corre et Galibert, 2005).

Ce facteur est aussi impliqué dans la progression du cycle cellulaire en régulant l'expression des gènes codant la cycline B1 et cdk1 favorisant la transition G2/M (Cogswell *et al.*, 1995 ; North *et al.*, 1999), et dans la prolifération par la régulation du gène hTERT nécessaire dans le maintien de l'intégrité télomérique (Goueli et Janknecht, 2003). Les protéines USF pourraient ainsi contribuer à la maintenance d'une immortalité cellulaire mais leur rôle dans le processus cancéreux reste ouvert puisque ces facteurs sont aussi responsables de la régulation des gènes suppresseurs de tumeurs *p53*, *BRCA2* et *APC* (Reisman et Rotter, 1993 ; Hale et Braithwaite, 1995 ; Davis *et al.*, 1999 ; Jaiswal et Narayan, 2001).

Enfin la protéine USF-1 est aussi impliquée dans le métabolisme glucidique et lipidique participant notamment à la régulation de l'insuline et de l'IGF-BP1 (insulin growth factor-binding protein 1). Des polymorphismes du gène *USF-1* sont aussi associés à des maladies de type diabète et à des risques élevés de développement de maladies cardio-

vasculaires (Read *et al.*, 1993 ; Matsukawa *et al.*, 2001 ; Collings *et al.*, 2008 ; Holzapfel *et al.*, 2008 ; Wierzbicki *et al.*, 2008).

Les facteurs de transcription USF sont impliqués dans la régulation de nombreux processus cellulaires via la présence d'éléments régulateurs boîtes E dans les promoteurs des gènes cibles. Le nombre de gènes identifiés comme étant des cibles de ces facteurs de transcription est en augmentation constante, leur activité est régulée notamment par la signalisation de réponse au stress. Ainsi les protéines USF sont reconnues comme des facteurs de réponse à une situation de stress cellulaire. Les facteurs USF-1 et USF-2 présentent une grande conservation de séquence et une redondance de fixation et parfois d'activation de gènes cibles communs, en homo ou hétéro dimères. Cette similarité amène des interrogations quant à leur importance respective dans la régulation de leurs cibles communes selon le contexte cellulaire ou temporel (fixation séquentielle). La caractérisation de nouveaux gènes cibles de ces facteurs USF, impliqués dans d'autres voies cellulaires liées à une situation de stress est un enjeu important.

II.4 Les cancers cutanés

Parmi la grande quantité de cancers pouvant survenir au niveau cutané, on en distingue trois qui sont les plus fréquents et liés aux radiations UV. Les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires qui appartiennent au groupe des carcinomes épithéliaux, c'est-à-dire développés aux dépens des keratinocytes de l'épiderme et le mélanome, tumeur maligne issue des mélanocytes.

II.4.1 Le Carcinome basocellulaire

Le carcinome basocellulaire est certainement le plus fréquent des cancers cutanés (2/3 des carcinomes cutanés) et le moins agressif car il ne métastase quasiment jamais. Son incidence varie selon le phototype et la latitude, de 70 cas pour 100 000 habitants par an en France, à 400 cas dans des populations de type claire comme en Australie. La plupart de ces carcinomes apparaissent de manière sporadique après l'âge de 50 ans. Leur apparition est liée à des expositions solaires intermittentes aiguës sur une peau non préparée et des expositions chroniques sur de longues années avec une corrélation au phototype cutané. Dans tous les cas, le lien avec les radiations UV est étroit, plus de 85% des carcinomes basocellulaires apparaissant sur des zones photo-exposées.

Typiquement le CBC est une lésion perlée translucide dont le nodule va s'étaler progressivement, cette évolution est lente. On note de nombreux aspects variés: 60% des cas sont des CBC nodulaires: petite tumeur ferme, bien limitée, lisse, d'aspect kystique, et dont la surface peut devenir squameuse. Le nodule est parfois associé à une intense fibrose (CBC sclérodémiforme, 5% des cas environ), à une bordure perlée qui a tendance à se multiplier (CBC superficiel) ou présente un aspect noir et une hyperpigmentation (CBC pigmenté). Malgré son pouvoir métastatique très faible à nul, le carcinome basocellulaire est invasif localement et peut être très destructeur avec l'apparition de formes ulcéreuses. Il se traite par excision chirurgicale, parfois par radiothérapie (Graham-Brown et Burns, 1991 ; Avril *et al.*, 2002 ; Lipsker et Cribier, 2005)

II.4.2 Le Carcinome spinocellulaire

Le carcinome spinocellulaire ou épidermoïde cutané (CE), deuxième groupe de cancer épithélial est moins fréquent que le CBC mais nettement plus agressif et capable de métastaser. L'incidence des carcinomes épidermoïdes cutanés est plus faible que celle des CBC: 10 à 20 pour 100 000 habitants/an en France chez l'homme et 5 à 10/ 100 000 habitants chez la femme. En Australie, l'incidence est de 250 pour 100 000 habitants. Comme pour le CBC, le degré d'ensoleillement et le phototype sont des facteurs de risques importants, la plupart des CE surviennent de manière apparemment sporadique mais un déficit immunitaire peut favoriser la survenue de CE (sujets transplantés sous immunosuppresseurs, sujets atteints de leucémie lymphoblastique chronique,...). Contrairement au CBC, le CE survient souvent sur une lésion précancéreuse dont les plus fréquentes sont les kératoses UV-induites (kératoses actiniques), les radiodermites, les brûlures et les plaies chroniques. Son apparition peut être plus tardive, après 60 ans.

L'exposition solaire chronique est le principal facteur causal. En effet les radiations UV sont responsables de la formation de lésions précancéreuses sur la peau photo-exposée (les kératoses actiniques) ce qui explique que les lésions sont situées surtout chez les personnes âgées dans les zones photo-exposées. Ces lésions peuvent régresser spontanément ou au contraire se transformer en carcinome épidermoïde, les phototypes clairs sont plus touchés. Chez les sujets immunodéprimés, il existe des co-facteurs carcinogènes viraux tels que les papillomavirus oncogènes, facteur de prédisposition aux CE cutanés et des muqueuses (notamment col de l'utérus et de l'anus). D'autres carcinogènes exogènes sont aussi cités tels que l'arsenic et le tabac (ce dernier notamment dans le CE de la lèvre inférieure).

Le carcinome épidermoïde est une affection grave car son pouvoir métastatique est très fort. Ces lésions métastasent aux ganglions lymphatiques locaux et au-delà, notamment pour les lésions survenant autour de la bouche et sur les organes génitaux. Il est à noter que ces carcinomes muqueux sont de moins bon pronostic du fait de la plus grande fréquence d'extension ganglionnaire.

Parmi les carcinomes épidermoïdes, on distingue le CE intraépithélial (*in situ*), ou maladie de Bowen qui est une lésion strictement limitée à l'épiderme ne franchissant pas la membrane basale et sans composante invasive. Elle se présente comme une macule érythémateuse rosée ou brune, bien limitée, de caractère fixe et s'observe sur la peau glabre et les muqueuses (Graham-Brown et Burns, 1991 ; Avril *et al.*, 2002 ; Lipsker et Cribier, 2005).

II.4.3 Le Mélanome

Le mélanome correspond à une lésion néoplasique des mélanocytes épidermiques. Par comparaison aux carcinomes précédemment décrits, c'est un cancer très fortement invasif et agressif qui s'accompagne d'un taux de mortalité élevé. Directement lié à une exposition intense aux radiations UV, son incidence varie selon la latitude, le phototype et double environ tous les 10 ans. En France, l'incidence des mélanomes n'échappe pas à l'évolution mondiale, environ 7 cas pour 100 000 habitants avec 6000 à 7000 nouveaux cas par an. Même si ce cancer touche principalement les adultes et les personnes âgées, l'augmentation de son incidence chez l'adulte jeune en fait une des principales causes de mortalité chez cette population.

Parmi les nombreux types de mélanomes qui ne diffèrent pas seulement par leur aspect mais aussi par leur fréquence et leur agressivité, on distingue cinq principaux :

- Le mélanome à extension superficielle (Superficial Spreading Melanoma) représente 70% des mélanomes. Il touche le sujet jeune (principalement entre 30 et 50 ans) et se développe au niveau de zones cutanées photo-exposées. Il se manifeste initialement par une petite tache pigmentée brune ou noire de 5 à 10 mm, asymétrique et irrégulière. Son aspect rappelle celui du naevus pigmentaire bénin mais son évolution est caractéristique: asymétrie, bord irréguliers, polychromie, et diamètre évolutif. Lorsque son diamètre atteint 15 à 35 mm, l'apparition d'un nodule traduit généralement l'infiltration du derme.

- Le mélanome nodulaire: c'est une forme agressive qui représente 10 à 20% des

mélanomes. Elle se caractérise par une progression verticale immédiate qui favorise l'échappement de cellules tumorales et qui conduit à un pronostic très défavorable de par l'épaisseur de la lésion d'emblée élevée. Il survient à tout âge, parfois à partir d'un naevus préexistant. Son évolution conduit à un nodule noir de croissance rapide, bourgeonnant et hémorragique.

- Le mélanome de Dubreuilh (Lentigo Malignant Melanoma) représente 5 à 10% des mélanomes et constitue la forme la "moins grave". Il se développe chez les sujets âgés au niveau des zones cutanées photo-exposées et principalement le visage. Son aspect est celui d'une grande tache sans signe fonctionnel de 2 à 6 cm, plane, de couleur brune polychromique. Sa malignité est locale mais peut parfois évoluer en nodule invasif avec un envahissement du derme.

- Le mélanome acral lentigineux (Acral Lentigo Melanoma) se développe au niveau des extrémités (région plantaire, pourtour de l'ongle). Son incidence est rare en Europe (2 à 10 %) mais plus fréquente sur la population noire et orientale, 30 à 60 % des cas au Japon. Il touche l'adulte à partir de 50 ans et débute par une macule brun-noir évoluant en une plaque pigmentée de 2 à 3 cm aux bords déchiquetés avec des plages achromiques puis plus tardivement en un nodule ou une ulcération.

- Le mélanome muqueux est rare dans la population caucasienne mais plus fréquent dans la population noire ou asiatique. Il se localise au niveau des muqueuses buccales, nasales, oesophagiennes, trachéales et vaginales. Son diagnostic est difficile et le pronostic sombre.

Contre les cancers cutanés épithéliaux ou mélaniques il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace. Seule l'excérèse chirurgicale permet l'élimination de la tumeur et la prévention d'une récurrence. Ainsi la détection précoce des cancers cutanés est très importante et permet d'accroître la survie du patient.

III - Systèmes de Réparation de l'ADN et désordres génétiques associés

Face aux nombreux dommages induits par les agressions extérieures, les organismes vivants se sont adaptés au cours de l'évolution afin de détecter et réparer ces dommages. L'absence de réparation de ces lésions participe à la transformation cellulaire tumorale. Ainsi

ORIGINE DES DOMMAGES	TYPE DE DOMMAGE	MECANISME DE REPARATION
<ul style="list-style-type: none"> - agents alkylants - radiations UV 	<ul style="list-style-type: none"> - dommages alkylants - dimères de pyrimidine 	Direct Reversal of DNA Damage (DDR)
<ul style="list-style-type: none"> - erreurs de réplication 	<ul style="list-style-type: none"> - mésappariements A-G - mésappariements T-C - insertions - délétions 	Mismatch Repair (MMR)
<ul style="list-style-type: none"> - rayons X - espèces réactives de l'oxygène - agents alkylants - réaction spontanée 	<ul style="list-style-type: none"> - uracil - site abasique - 8-oxoguanine - cassures simple brin 	Base Excision Repair (BER)
<ul style="list-style-type: none"> - rayons infrarouges (IR) - radiations UV - hydroxyurée - rayons X - agents anti-tumoraux 	<ul style="list-style-type: none"> - cassures double brin 	Réparation par recombinaison Non Homologous End Joining (NHEJ) Homologous Recombinaison (HR)
<ul style="list-style-type: none"> - radiations ultraviolettes (UV) - carcinogènes chimiques 	<ul style="list-style-type: none"> - dimères de pyrimidine (CPD et 6-4 PP) 	Nucleotide Excision Repair (NER) Global Genomique Repair (GGR) Transcription Coupled Repair (TCR)

Tableau 2: Origine, exemple de dommages et principal mécanisme de réparation associé
(adapté de M. Allinen, 2002)

il existe plusieurs mécanismes de réparation selon le type de lésion et son emplacement dans le génome. Six principaux mécanismes sont conservés au cours de l'évolution ([Tableau 2](#)):

- La réversion directe des dommages ou "direct reversal of DNA damage" (DDR)
- La réparation de mésappariements de bases ou "mismatch repair" (MMR)
- La réparation par excision de base ou "base excision repair" (BER)
- La réparation par recombinaison homologue ou "homologous recombination repair" (HHR)
- La réparation par religation d'extrémités non homologues ou "non-homologous end joining" (NHEJ)
- La réparation par excision de nucléotide ou "nucleotide excision repair" (NER)

III.1 La réversion directe des dommages (DDR)

La réversion directe des dommages (DDR) est probablement le plus simple et le plus correct des mécanismes de réparation des lésions car la réaction ne comprend qu'une seule étape. Deux types de lésions sont principalement réparés par ce mécanisme.

Les dimères de pyrimidines induits par les radiations UV peuvent être réparés par le DDR, bien que la plupart des organismes ait développé le mécanisme du NER pour exciser ces lésions. La réaction implique des enzymes de photoréactivation, les photolyases, bien connues chez les bactéries et chez certains eucaryotes inférieurs pour leur pouvoir de monomériser les dimères de pyrimidines, CPD et (6-4) PPs sous l'action de la lumière ([Figure 9A](#)). Les photolyases sont des flavoprotéines de 50-55 kDa qui ont la propriété de fixer ces dimères et, en présence de lumière visible (bleu) ou proche du visible (>300 nm), l'énergie fournie par l'absorption d'un photon est utilisée pour envoyer un électron dans le dimère permettant la reformation du monomère initial. L'absorption de la lumière visible requiert la présence d'un groupement chromophore. Les photolyases possèdent deux cofacteurs chromophores fonctionnellement différents. Le premier chromophore, FAD, est le centre catalytique de la réaction photo-chimique. Sous forme réduite et excitée (*FADH-), ce chromophore envoie un électron dans le dimère de thymine, ce qui provoque son retour à une forme semi réduite (FADH). Le second chromophore MTHF agit comme un catalyseur auxiliaire de la lumière. Sa présence n'est pas obligatoire pour la réaction mais elle augmente considérablement son efficacité. En fin de réaction, le transfert d'un électron du monomère de pyrimidine reformé vers le chromophore FADH provoque le retour à l'état initial de la photolyase. Il existe de nombreuses photolyases différentes, spécifiques d'un type de dimère

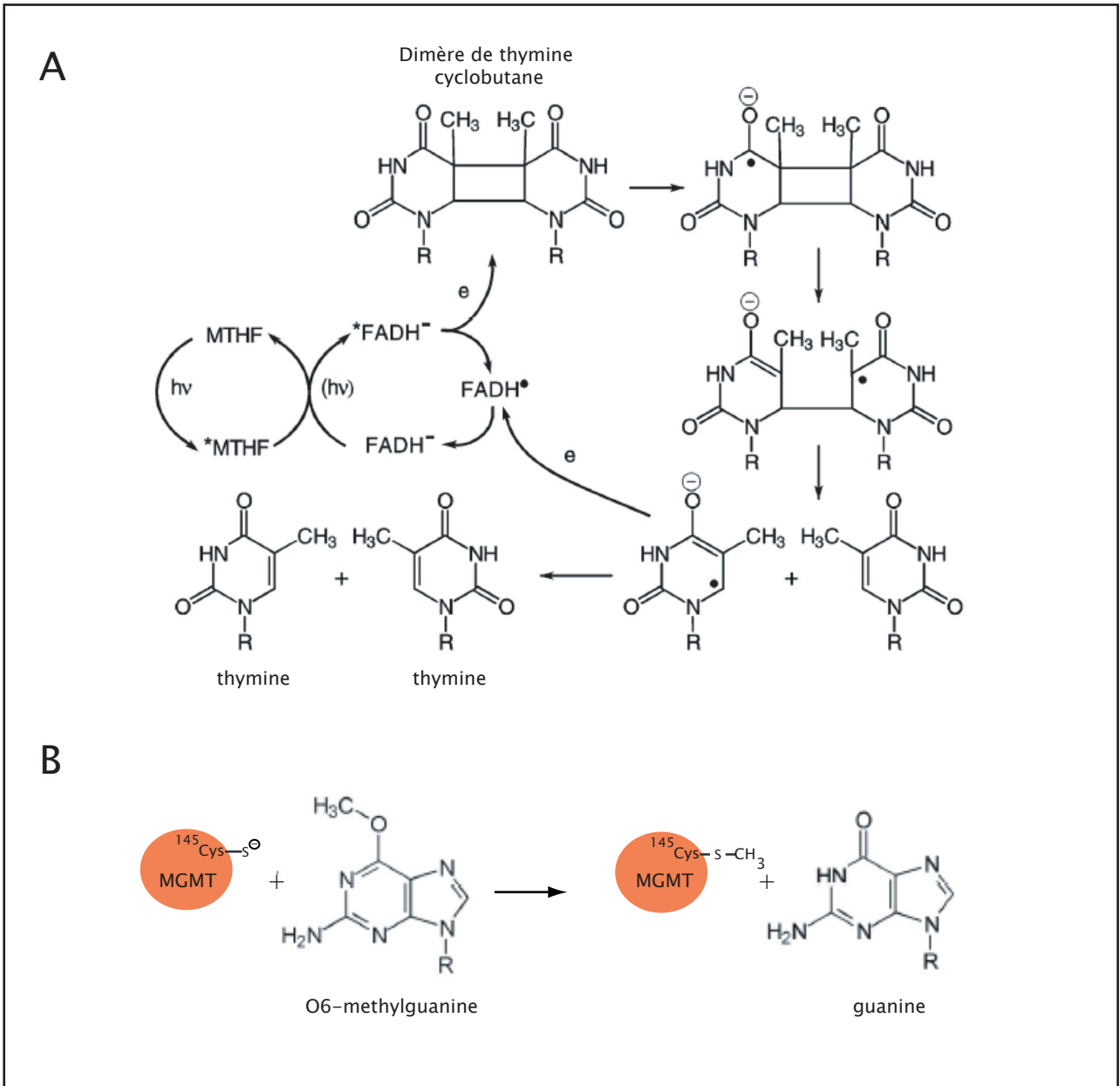


Figure 9: Réversion directe des dommages (DDR)

La réversion directe des dommages est un mécanisme simple qui ne comprend qu'une seule étape. L'enzyme impliquée diffère selon le type de lésion réversée. A: Exemple de photoréaction: élimination des CPD. La photolyase possède deux cofacteurs chromophores, MTFH et FADH. Après absorption d'un photon par le cofacteur MTFH, l'énergie est transférée au cofacteur FADH. Un électron de la forme ainsi excitée de FADH⁻ est envoyé vers le dimère provoquant la cassure de la liaison cyclobutane. En fin de réaction, le transfert d'un électron du monomère reformé permet le retour à l'état initial de la photolyase. Il n'existe pas de photolyase fonctionnelle chez les mammifères placentaires. B: Élimination des groupements alkyles. Chez l'homme, la déméthylation des O6-méthylguanines se fait par l'action de l'enzyme MGMT qui possède un site receveur de groupement méthyl, le résidu Cyst145. La réaction de transfert du groupement méthyl est irréversible et l'enzyme MGMT est ensuite dégradée. (adapté de Eker *et al.*, 2009)

(CPD ou (6-4) PP). La réaction est similaire dans les deux cas même si la réversion des (6-4) PP nécessite un réarrangement intermédiaire (anneau oxetane) avant la reformation du monomère. Les photolyases sont présentes chez un grand nombre d'organismes vivants mais sont absentes chez les mammifères placentaires, c'est-à-dire tous les mammifères sauf la sous-classe des marsupiaux. Les mammifères placentaires ne possèdent que des formes appelées cryptochromes photolyase-like qui présentent une structure homologue aux photolyases mais qui ont perdu leur activité de réparation des lésions UV-induites. Durant leur évolution ces mammifères placentaires ont probablement traversé une phase nocturne qui a conduit à la perte de leur version du gène ancestral de la photolyase. Chez ces mammifères, la réparation de ces lésions UV-induites se fait par le mécanisme du NER (voir chapitre NER) (Eker *et al.*, 2009).

Le second type de lésion réparé par ce mécanisme est induit par les agents alkylants (MNU, MMS...) qui engendrent des adduits alkyles dont notamment les O⁶-méthylguanine (O⁶-meG). La formation de ces lésions peut avoir un effet mutagène car elle peut conduire à une transversion G:C => A:T durant la réplication. Chez l'homme la réversion de ces lésions O⁶-meG requiert l'action de l'enzyme MGMT (O⁶-meG-DNA methyltransferase) (Figure 9B). Cette protéine possède un résidu Cys145 présent dans le motif actif Pro-Cys-His-Arg qui est un site receveur du groupement méthyl. Le groupement méthyl est ainsi transféré de la base endommagée à l'enzyme MGMT. Cette réaction est irréversible, l'enzyme MGMT méthylée ainsi générée ne peut être réutilisée et est rapidement dégradée par le système ubiquitine-protéasome (Eker *et al.*, 2009).

III.2 La réparation des mésappariements de bases (Mismatch Repair, MMR)

Les mésappariements de bases apparaissent principalement lors la réplication de l'ADN à la suite d'erreurs de copie qui échappent à la correction du système enzymatique contenu dans les polymérases. La réplication étant un processus très fidèle, ces erreurs non corrigées sont extrêmement rares, de l'ordre de 10⁻⁹ à 10⁻¹⁰ paires de bases/division cellulaire. La réparation des mésappariements de bases ou mismatch repair (MMR) est un système de réparation conservé des bactéries aux mammifères qui cible ces substitutions, délétions ou insertion de base, augmentant la fidélité du processus de réplication d'un facteur 100 à 1000 (Hsieh et Yamane, 2008). Chez les mammifères comme chez les bactéries, ce processus se divise en quatre étapes (Figure 10).

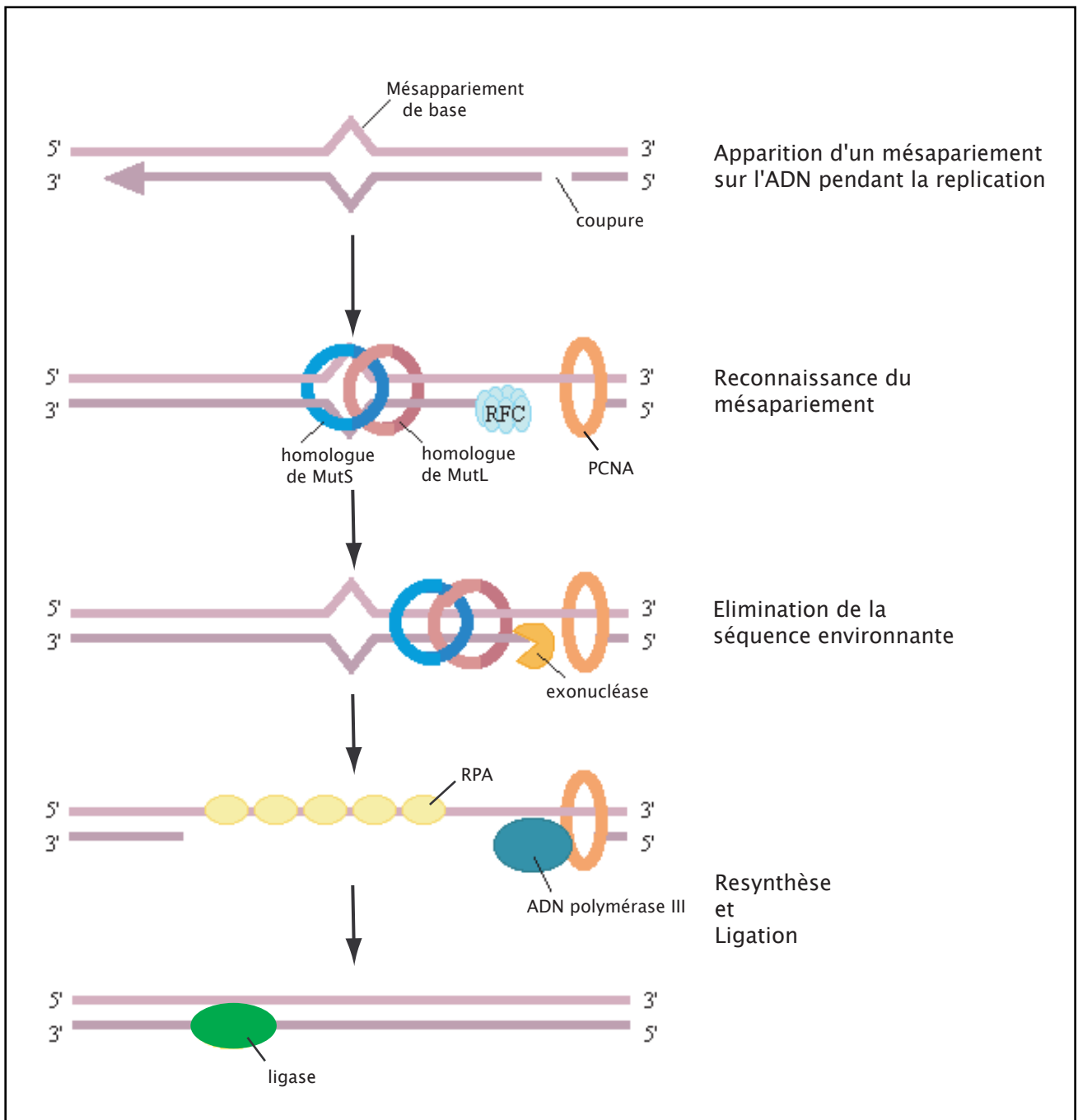


Figure 10: Réparation des Mésappariements de bases (MMR)

Chez les mammifères, la réparation des mésappariements de bases ou Mismatch Repair (MMR) est un mécanisme comprenant quatre étapes: reconnaissance de la base mal appariée par les homologues de MutS ; recrutement du réparosome (protéines homologues de MutL, polypeptides de la ségrégation postméiotiques et facteurs de réplication) ; élimination de la base mal appariée et de la séquence environnante par une exonucléase ; resynthèse par l'ADN polymérase III et ligation. PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; RFC: Replication Factor C; RPA Replication Protein A.

(d'après Kanehisa laboratories)

La reconnaissance de la base mal appariée se fait par le complexe hMutS α composé d'un hétérodimère hMSH2-hMSH6, protéines homologues de MutS chez les bactéries. La fixation du mésappariement provoque un changement de conformation de ce complexe et permet le recrutement d'un complexe appelé réparosome composé des protéines hMLH (homologues de MutL chez les bactéries), des polypeptides de la ségrégation postméiotiques (PMS), de l'ADN polymérase δ et des facteurs de réplication comme PCNA, RPA ou RFC. A ce complexe viennent s'ajouter des exo et endonucléases ainsi que des hélicases, la composition exacte du réparosome n'est pas clairement établie. Prenant le brin parental non modifié comme modèle, il s'ensuit l'élimination de la base mal appariée ainsi que d'une petite partie de la séquence environnante. L'ADN polymérase III synthétise alors la séquence manquante et une ligase restaure l'intégrité de la structure de l'ADN (Hsieh et Yamane, 2008 ; Li, 2008).

Par ailleurs on peut noter que les protéines homologues de MutS sont aussi impliquées dans la reconnaissance de mésappariements apparus suite à des modifications ou des dommages de bases induits par des agents carcinogènes comme les UV photoproduits, les adduits dérivés du cisplatine et d'autres carcinogènes environnementaux (Jiricny, 2006 ; Wang *et al.*, 2006)

La réparation des mésappariements de bases est très souvent associée à d'autres mécanismes de réparation faisant apparaître des mésappariements pendant la réparation (l'excision de bases, la recombinaison et la réparation translésionnelle). L'inactivation de ce processus de réparation confère un phénotype mutant dans lequel le taux de mutations spontanées est élevé. Une propriété de ces cellules déficientes est l'instabilité au niveau des régions microsatellites constitués de répétitions nucléotidiques. Cette instabilité est étroitement liée à l'apparition de processus cancéreux notamment le cancer colique héréditaire sans polypose (Hsieh et Yamane, 2008).

III.3 La réparation par excision de bases (Base Excision Repair, BER)

Le mécanisme de réparation par excision de base (BER) est un processus multienzymatique ciblant principalement les modifications de bases comme la méthylation, l'oxydation, la réduction ou la fragmentation de bases par les radiations ionisantes et le métabolisme oxydatif de la cellule (Yu *et al.*, 1999). Deux voies sont décrites, une voie classique et une variante plus complexe (Figure 11).

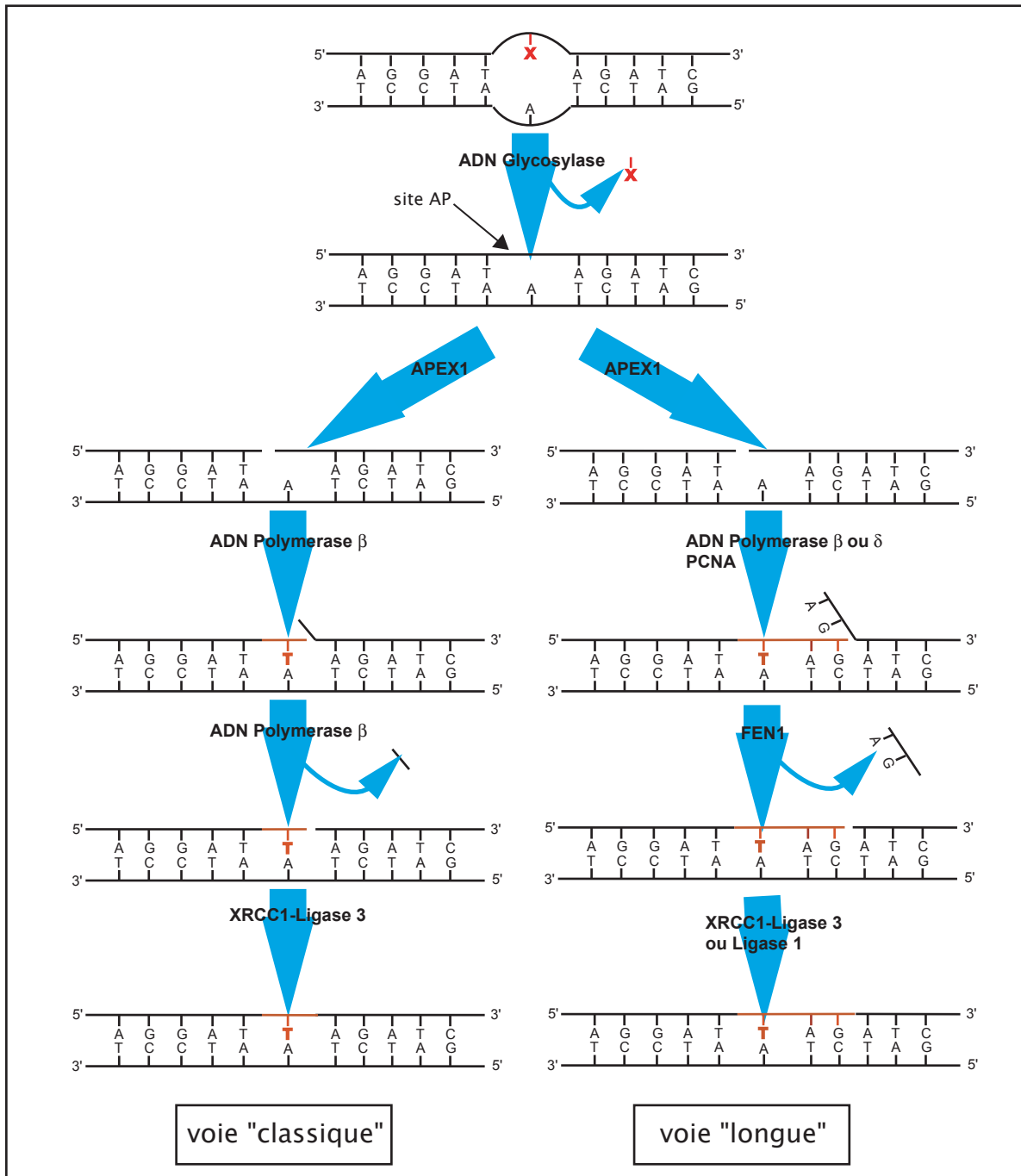


Figure 11 : Réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de bases ou Base Excision Repair (BER) est un mécanisme comprenant deux voies: dans la voie "classique", la lésion est reconnue par une ADN glycosylase qui catalyse le clivage base-sucre entraînant l'excision de la base. Ce clivage génère un site AP (site apurinique ou apyrimidique) qui sert de substrat pour l'endonucléase APEX1 (AP endonucléase 1). Le brin est resynthétisé par l'ADN polymérase β et la ligation est réalisée par le complexe ligase 3-XRCC1. La voie "longue" fait intervenir la protéine APEX1 ainsi que le facteur de réplication PCNA associé à l'ADN polymérase β . Dans cette voie, la synthèse génère une extrémité trop longue qui ne peut être liée et qui va être excisée par l'enzyme FEN1 (Flap endonucléase-1) pour permettre la ligation finale par la ligase 1 ou le complexe ligase 3-XRCC1. (adapté de R&D Systems, 2003)

Le mécanisme classique fait intervenir quatre protéines: une glycosylase, une endonuclease ou une lyase, une polymérase et une ligase. Ces protéines fonctionnent ensemble pour exciser la base nucléotidique endommagée et la remplacer par une correcte. Tout d'abord la base endommagée est reconnue par l'ADN glycosylase qui va catalyser le clivage de la liaison base-sucre entraînant l'excision de la base. Ce clivage génère un site AP (site apurinique/apyrimidique) appelé aussi site abasique, qui sert de substrat pour l'endonuclease APEX1 qui va générer une extrémité 5' d'ADN simple brin. Le brin coupé est complété par la polymérase β et l'action de la ligase 3 complète le processus de réparation restaurant l'intégrité de la double hélice (Robertson *et al.*, 2009).

Plus récemment, il a été montré une seconde voie plus longue fait intervenir la protéine APEX1, la polymérase β ou δ , le facteur de replication PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen), FEN1 (flap structure-specific endonuclease 1) et la ligase 1 ou 3. D'une manière dépendante de PCNA, la polymérase β complète la synthèse du brin coupé en générant une extrémité trop longue, qui ne peut être liée. Cette extrémité est ensuite coupée et excisée par l'enzyme FEN1 permettant ainsi la ligation finale par la ligase 1 ou 3 (Robertson *et al.*, 2009).

La décision d'opter vers la voie classique ou plus longue du BER reste peu comprise. Une hypothèse suggère que ce choix dépendrait de la concentration en ATP à proximité du site AP, concentration qui serait modulée par le complexe ligase 3-XRCC1 (X-ray cross-complementing protein 1). Cette hypothèse est basée sur l'observation que la voie longue intervient plus souvent à des concentrations faible d'ATP (Petermann *et al.*, 2003).

III.4 la réparation des cassures double-brin (Double Strand Break repair, DSB)

Les cassures double brin surviennent dans les cellules lors d'attaques exogènes (irradiation UV, agents chimiques) comme endogènes (nucléases, produits métaboliques comme les ROS) mais aussi lors de l'anaphase mitotique lorsque les chromosomes remontent vers les pôles opposés de la cellule. Les organismes eucaryotes ont ainsi développé deux mécanismes de réparation des cassures double brin, la réparation par religation non homologue (nonhomologous end joining, NHEJ) (Figure 12) et la recombinaison homologue (homologous recombination, HR) (Figure 13). En comparaison de la levure où ces processus ont été très étudiés, chez les vertébrés le NHEJ est plus fréquemment utilisé lors de la réparation des DSB. Parmi les possibles raisons, on peut évoquer la taille et la complexité de leur génome rendant difficile la recherche d'homologie nécessaire pour la HR, la présence de

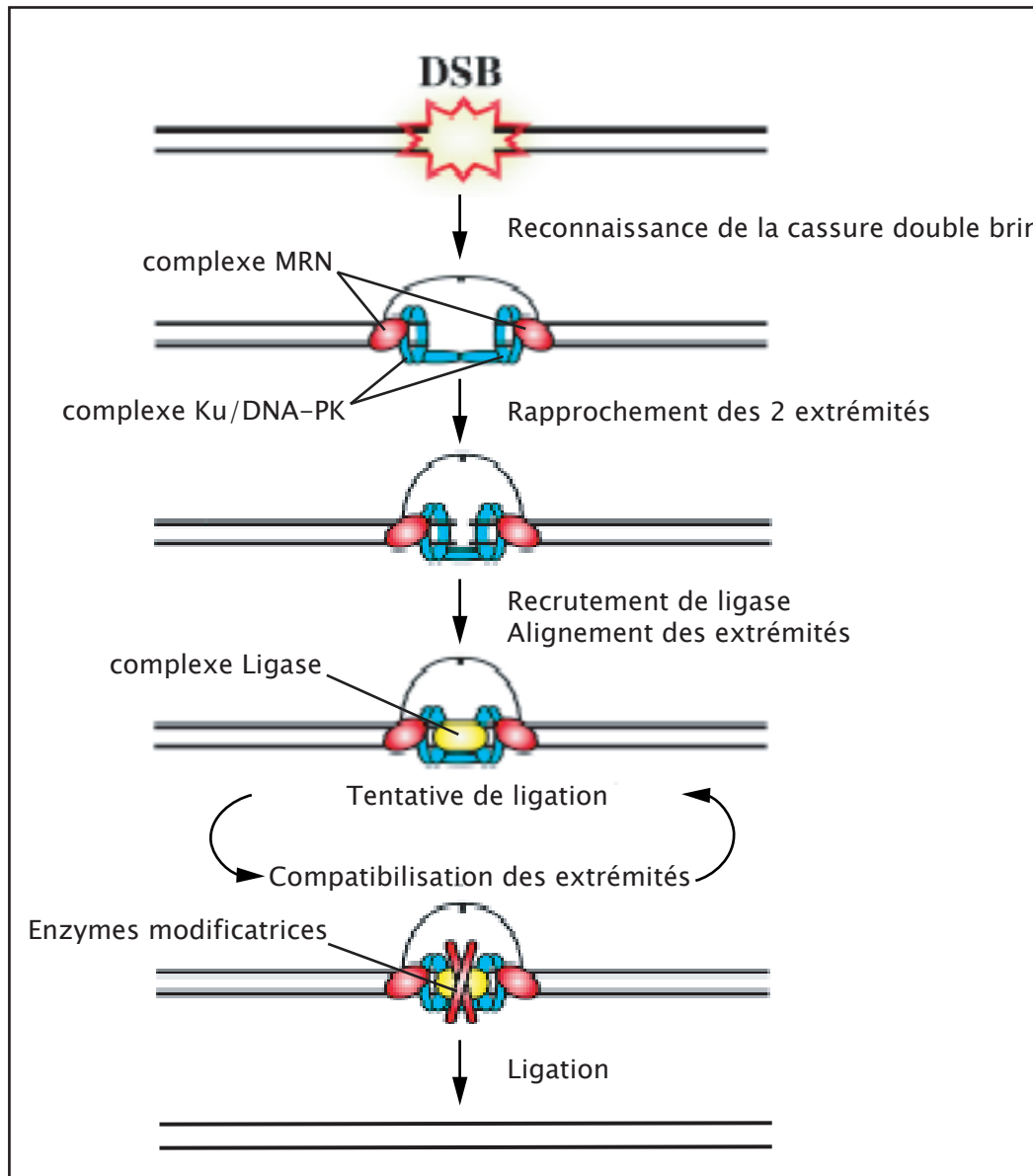


Figure 12: Réparation par religation non homologue (NHEJ)

La réparation par religation non homologue ou Non Homologous End-Joining (NHEJ) permet la réparation des cassures double-brin. Les extrémités de ces cassures sont reconnues par le complexe MRN (Mre11, RAD50 et NBS1) et le complexe Ku partie du complexe DNA-PK. Ces complexes protègent et rapprochent les deux extrémités qui vont être alignées puis liguées par le complexe ligase 4-XRCC4/XLF après compatibilisation par l'action d'enzymes (kinases, déphosphatases, dé-adenylases...). (adapté de B. Pardo, 2009)

nombreux sites de répétitions qui constituent une dangereuse source d'instabilité génétique dans le cas de la HR, ou enfin la présence accrue de facteurs du NHEJ qui le rend plus efficace que chez la levure. Ces deux mécanismes partagent quelques facteurs, notamment dans la première étape (Pardo *et al.*, 2009).

III.4.1 La réparation par religation non homologue (NonHomologous End Joining, NEHJ)

Préférentiellement utilisé par les cellules de mammifères, ce mécanisme permet la ligation de tout type de cassure double brin sans nécessité de séquence homologue, par opposition au processus de recombinaison homologue.

Chez les vertébrés, la machinerie du NHEJ (Figure 12) requiert la présence de deux ou trois complexes dont l'ordre d'action n'est pas encore clairement défini: suite à la formation de cassures double brin, les extrémités nucléotidiques sont reconnues et fixées par le complexe MRN (composé de MRE11, RAD50 et NBS1) analogue au complexe MRX chez la levure et le complexe hétérodimérique Ku (KU70/KU80), partie du large complexe DNA-PK (DNA-dependent protein Kinase). Cette fixation aux deux extrémités empêche notamment leur dégradation (Gottlieb et Jackson, 1993 ; Lisby *et al.*, 2004).

La fonction de ces facteurs a surtout été étudiée chez la levure. Bien que les orthologues chez les vertébrés semblent conserver leurs rôles, des interrogations subsistent, particulièrement sur l'importance du complexe MRN dont la présence ne semble pas obligatoire pour le NHEJ, à l'inverse du complexe MRX chez la levure. Succinctement, RAD50, par son domaine de forte affinité à l'ADN, semble impliqué dans le rapprochement des deux extrémités facilitant la religation finale (Hopfner *et al.*, 2002). MRE11 (homologue of meiotic recombination 11) possède une activité nucléase responsable du clivage des structures présentes aux extrémités et du blocage de la religation (Trujillo *et al.*, 1998). NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) semble être la sous unité régulatrice, stabilisant ce complexe et donnant le signal d'arrêt du cycle cellulaire (D'Amours et Jackson, 2001). Enfin, le complexe hétérodimérique Ku protège et stabilise les extrémités DSB et permet le recrutement de l'ADN ligase 4 et son interaction directe sur les double brin d'ADN (Ribes-Zamora *et al.*, 2007).

Chez les vertébrés il a été montré que le complexe DNA-PK contenant l'hétérodimère Ku fonctionnait comme un facteur de liaison aux extrémités double brin ce qui pourrait expliquer la non absolue nécessité du complexe MRN dans le NHEJ (Spagnolo *et al.*, 2006).

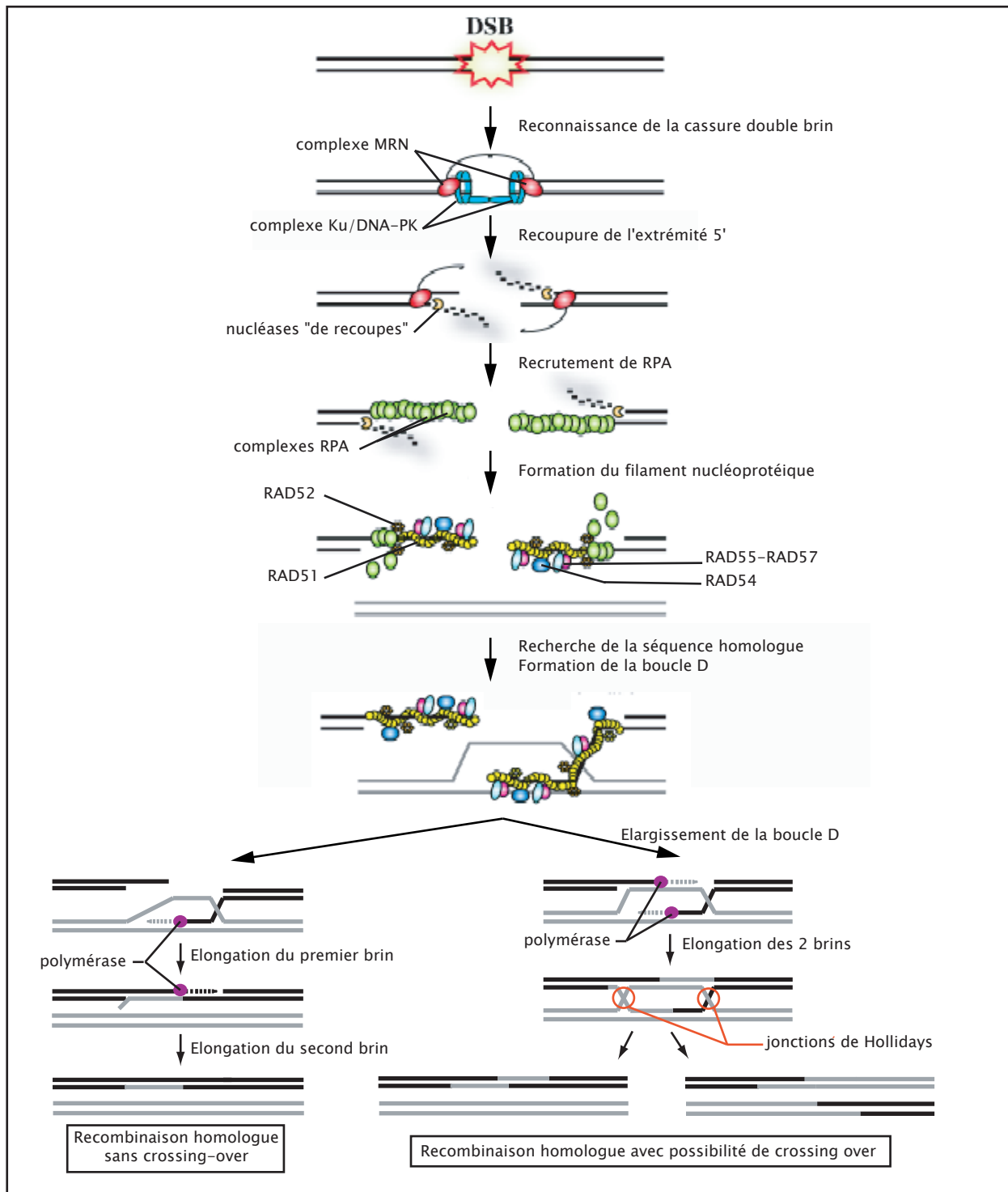


Figure 13: Réparation par recombinaison homologue (RH)

La réparation par recombinaison homologue (RH) permet la réparation des cassures double brin et implique l'appariement et l'échange de matériel génétique entre deux brins d'ADN. La réaction est initiée par la reconnaissance de la cassure et la fixation des extrémités par les complexes MRN (Mre11, RAD50, NBS1) et Ku/DNA-PK. L'extrémité 5' est ensuite recoupée par le complexe MRN et d'autres nucléases de recoupe. Le simple-brin 3' flaqueur est protégé de la dégradation par la fixation du complexe RPA, ce qui permet le recrutement de RAD51 et la formation d'un filament nucléoprotéique impliquant RAD52, RAD55-RAD57 et RAD54. La recherche d'homologie de ce filament et l'invasion de brin entraînent la formation d'une boucle D. Deux cas sont possibles: (gauche) élongation du brin invasif, disparition de la boucle D, élongation du brin complémentaire et ligation. (droite) élargissement de la boucle D, élongation et ligation des deux brins: formation de deux jonctions de Holliday pouvant conduire à un crossing-over. (adapté de B. Pardo, 2009)

Enfin, la ligation des extrémités est effectuée par l'ADN ligase 4 en complexe avec l'un des cofacteurs XRCC4 (X-ray repair cross-complementing group 4) ou XLF (XRCC4-like factor) qui permettent le recrutement éventuel d'autres protéines. En effet, cette ligation ne peut avoir lieu que si les extrémités des cassures sont compatibles. Ainsi, avant l'étape de ligation, les modifications engendrées par les radiations UV (par exemple des extrémités 5'-hydroxyle ou 3'-phosphate) nécessitent souvent l'action de kinases, déphosphatases, déadénylase, polymérase "amorces-indépendantes" (Pol λ , Pol μ) ... (Pardo *et al.*, 2009).

III.4.2 La réparation par recombinaison homologue (Homologous Recombination Repair, RH)

La recombinaison homologue est un mécanisme qui implique l'appariement et l'échange de matériel génétique entre une molécule d'ADN portant une cassure double brin et la molécule homologue intacte (Figure 13). Ce processus utilise la région chromosomique homologue et non endommagée comme matrice, entraînant donc la formation temporaire d'hétéroduplexe brin endommagé / région bibrin intacte. A l'inverse de ce qui est observé chez la levure, ce mécanisme de réparation est peu fréquent chez les mammifères, probablement afin d'éviter une perte d'hétérozygotie qui peut contribuer au développement d'instabilités génétiques et de processus cancéreux. En effet, selon les brins impliqués dans la réaction, la recombinaison homologue conduit à des échanges génétiques et à des recombinaisons intergéniques de type crossing-over.

La réaction de recombinaison homologue est initiée par la reconnaissance de la cassure double brin et du déroulement du brin d'ADN puis la dégradation nucléotidique de l'extrémité 5' du double brin endommagé générant ainsi une extrémité 3' simple brin. Comme dans le processus du NHEJ, cette étape est assurée chez les eucaryotes par le complexe MRN (analogue au complexe MRX chez la levure) contenant la protéine RAD50 (reconnaissance de la cassure), la nucléase MRE11 et la sous unité régulatrice NBS1 (Wyman *et al.*, 2004). L'extrémité 3' simple brin est alors façonnée, capable de rechercher son homologue qui servira de matrice.

Rapidement après la recoupe, l'extrémité 3' est fixée par le complexe hétérotrimérique RPA (Replication Protein A) qui va protéger le simple brin flanquant de la dégradation enzymatique et empêcher la formation de structures secondaires (Alani *et al.*, 1992). Ce complexe interagit directement avec la protéine RAD52, facteur nécessaire pour la plupart des réactions de recombinaison. Chez les vertébrés, on peut noter que le facteur

BRCA2 (Breast Cancer susceptibility gene 2), dont le gène codant est régulé de manière transcriptionnelle par la protéine USF-1, peut remplacer RAD52 dans ce processus de d'invasion du brin (Davis *et al.*, 1999 ; Davies et Pellegrini, 2007 ; Esashi *et al.*, 2007). RAD52/BRCA2 va alors faciliter la fixation de protéine recombinaise RAD51 sur le brin d'ADN, déplaçant le complexe RPA (Song et Sung, 2000). Ce remodelage conduit à la formation d'un filament nucléoprotéique composé de l'extrémité 3' du brin endommagé recouvert de protéine RAD51.

Ce filament nucléoprotéique va être capable de rechercher et trouver la séquence homologue dans le génome. Les mécanismes permettant cette recherche d'homologie restent encore mal caractérisés, mais elle semble être le résultat de collisions aléatoires entre les deux molécules d'ADN et l'appariement ne semble pouvoir avoir lieu qu'en présence de RAD52 (Mortensen *et al.*, 1996). Le résultat de cet appariement est la formation d'un hétéroduplex appelé boucle D (Displacement loop) dans lequel l'échange de brin va avoir lieu. D'autres protéines sont importantes comme RAD55 et RAD57 qui stabilisent le filament et stimulent l'échange de brin et RAD54 qui facilite la fixation de RAD51, la recherche d'homologies et la maturation des intermédiaires de recombinaison après formation de la boucle D (Sung, 1997 ; Sugawara *et al.*, 2003).

Les brins intacts servent de matrice pour l'étape d'élongation par une ADN polymérase puis l'ADN ligase 1 vient rétablir l'intégrité de la séquence nucléotidique créant deux jointures. Deux cas sont à distinguer: dans le premier cas, seul un des 2 brins est resynthétisé. Après déplacement de la boucle D du brin néosynthétisé, il y a élimination des nucléotides en surplus puis ligation. La séquence complémentaire est alors synthétisée. Dans ce cas il ne peut y avoir d'échange de brin (crossing-over) (Nassif *et al.*, 1994). Dans le second cas, l'élongation du premier brin peut conduire à l'élargissement de la boucle D, résultant en l'élongation du deuxième brin. Ceci conduit à la formation de deux structures de quatre brins d'ADN appelées jonctions de Hollidays (HJs). Dépendant du clivage effectué, ces jonctions peuvent entraîner un processus d'échange de brin (crossing-over) (Szostak *et al.*, 1983). Récemment, il a été montré que ces jonctions peuvent être dissoutes par l'action conjointe d'ADN hélicase et de topoisomérases (Wu *et al.*, 2006 ; Pardo *et al.*, 2009) .

III.5 La réparation par excision de nucléotide (Nucleotide excision repair, NER)

III.5.1 L'importance du NER

Les CPD et les (6-4) PP constituent la majorité des lésions introduites dans l'ADN par les radiations UV. Ces lésions induisent une torsion de l'ADN d'un angle allant de 4 à 30° et 44° respectivement, courbure qui est le signal d'alarme conduisant à l'élimination de ces lésions par le système de réparation du NER (Kim *et al.*, 1995).

Au cours de ces quinze dernières années, les différentes étapes de ce mécanisme ont été très étudiées et révèlent une grande conservation au cours de l'évolution, bien que les protéines diffèrent entre les procaryotes et les eucaryotes. La plupart des acteurs sont aujourd'hui identifiés mais les rôles exacts et leur importance respective restent parfois encore mal connus. Classiquement, après la reconnaissance des lésions qui diffère selon leur emplacement, l'action séquentielle d'hélicases et d'endonucléases conduit à l'ouverture et à la coupure de la double hélice d'ADN permettant l'excision de la séquence nucléotidique entourant les pyrimidines endommagées. La polymérisation rétablit l'intégrité du brin utilisant son homologue intact comme matrice.

L'importance du NER est attestée par l'existence de maladies humaines graves se caractérisant notamment par une hypersensibilité aux radiations UV et de nombreuses lésions cancéreuses. Trois syndromes particulièrement étudiés, le Xeroderma Pigmentosum (XP), le Syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie (TTD), résultent de mutations d'enzymes du NER conduisant toutes trois à un mécanisme de réparation partiellement ou totalement déficient. Hormis la photosensibilité accrue, leurs manifestations cliniques diffèrent considérablement. L'utilisation de lignées cellulaires provenant de patients atteints de ces syndromes génétiques a largement contribué à l'identification des acteurs du NER et à leur séparation en groupes de complémentations. Sept groupes ont ainsi été identifiés pour le syndrome XP (XP-A à XP-G) et deux pour le syndrome CS (CS-A et CS-B) (Tableau 4 p64).

Les reconstitutions de la réaction du NER, *in vitro* en 1995 puis *in vivo* en 2001 requièrent plus de 25 polypeptides et montrent que le NER est un mécanisme versatile qui ne résulte pas d'un complexe pré-assemblé mais bien d'un assemblage séquentiel et coordonné de protéines sur la région endommagée (Tableau 3, Figure 14) (Aboussekhra *et al.*, 1995 ; Volker *et al.*, 2001 ; Riedl *et al.*, 2003). La dynamique de la réaction est dépendante de la reconnaissance de la lésion, l'initiation du mécanisme qui est l'étape cruciale et dont on distingue deux sous-voies: la réparation couplée à la transcription ou TCR (transcription

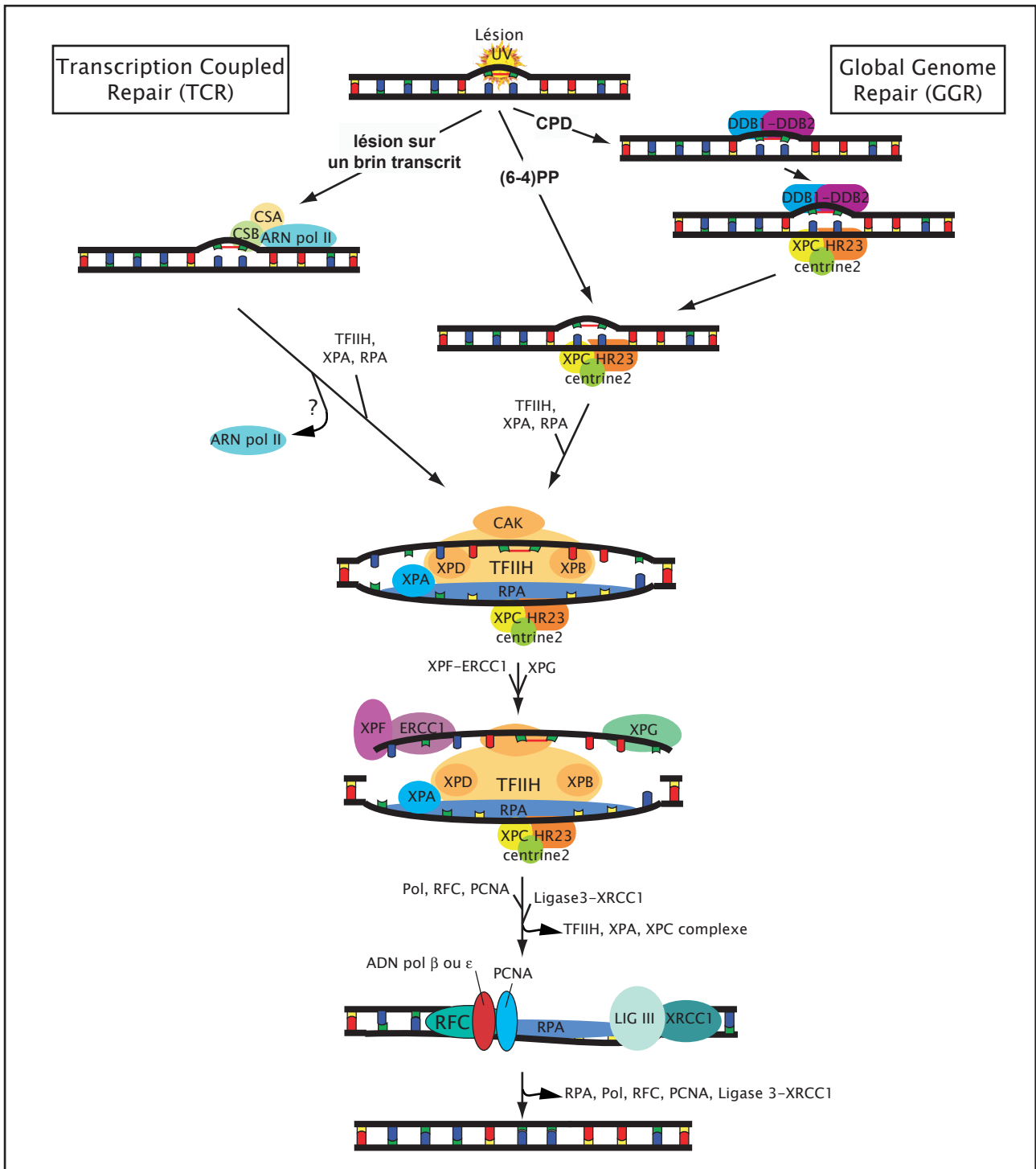


Figure 14: Réparation par excision de nucléotide (NER)

La réparation par excision de nucléotides (Nucleotide Excision Repair, NER) est divisée en deux sous-voies. A gauche le TCR (Transcription Coupled Repair) est initié par le blocage de l'ARN polymérase II sur une lésion. Le complexe composé de l'ARN pol II, CSA et CSB permet le recrutement du TFIIH, XPA et RPA. A droite, le GGR (Global genome repair), responsable de la réparation dans l'ensemble du génome, est initié par le complexe de reconnaissance XPC-HR23-centrine 2. Ce complexe permet le recrutement du TFIIH, XPA et RPA. Dans le cas des CPD (dimères de cyclobutanes pyrimidine), la reconnaissance est facilitée par la fixation préalable du complexe DDB1-DDB2. Dans les étapes suivantes, les deux sous-voies convergent: ouverture de la double hélice, protection du brin intact par l'action conjointe des complexes TFIIH, XPA et RPA puis incision du brin endommagé par les endonucléases XPF-ERCC1 et XPG du TFIIH. Synthèse par les polymérase β ou ε en présence des cofacteurs et ligation par le complexe ligase 3-XRCC1. (adapté de shane McLoughlin, 2009)

coupled repair) spécifique des lésions situées sur le brin transcrit d'un gène en cours d'expression et la réparation génomique globale ou GGR (global genome repair) qui intervient à tout endroit du génome. L'existence de ces deux sous voies explique la rapidité de réparation du brin d'ADN transcrit comparé au reste du génome incluant le brin non transcrit de gènes actifs (Hanawalt, 2002).

III.5.2 Etape initiale du NER: la reconnaissance des lésions

III.5.2.1 La reconnaissance des lésions dans le Global Genome Repair (GGR)

Le terme de GGR est employé pour désigner la composante du NER impliquée dans la réparation de toutes les lésions autres que celles apparues sur le brin transcrit de gènes actifs, à savoir les lésions survenues dans les régions non codantes, les gènes silencieux et les brins non-transcrits des gènes actifs.

L'apparition d'un dommage tel que la lésion covalente entre deux pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN, dommage majeur des irradiations UV, entraîne une distorsion de l'ADN et constitue le signal d'activation du GGR (Figure 14). Deux prérequis sont nécessaires pour cette activation: une modification biochimique de l'ADN et une torsion de la double hélice (Hess *et al.*, 1997 ; Sugawara *et al.*, 2001). Chez les mammifères, le complexe de reconnaissance de ces distorsions est composé de 3 sous-unités: XPC, HR23 et la centrine 2. La protéine XPC possède un domaine de liaison de l'ADN et présente une forte affinité pour l'ADN endommagé, mais dans le NER, l'équipe de Maillard a montré dernièrement que la protéine XPC se fixe de façon préférentielle sur le brin complémentaire, non endommagé à l'opposé de la lésion (Sugawara *et al.*, 1998 ; Maillard *et al.*, 2007). Ceci suppose l'existence d'un second niveau de vérification de la présence réelle d'une lésion pour autoriser la suite du mécanisme, probablement la fixation de la protéine XPA sur le brin endommagé. Sur le site de la lésion, XPC est poly-ubiquitiné ce qui ne conduit pas à sa dégradation mais au contraire augmente son affinité pour l'ADN, endommagé ou non (Sugawara *et al.*, 2005).

La majorité de la protéine XPC est retrouvée associée au produit du gène *HR23B* qui a un rôle activateur en stabilisant le complexe et le protégeant de la dégradation par le protéasome. La protéine HR23B est l'homologue de RAD23 chez la levure et le complexe XPC-HR23B est similaire au complexe RAD4-RAD23 chez *sacharomyces cerevisiae*. Mais si

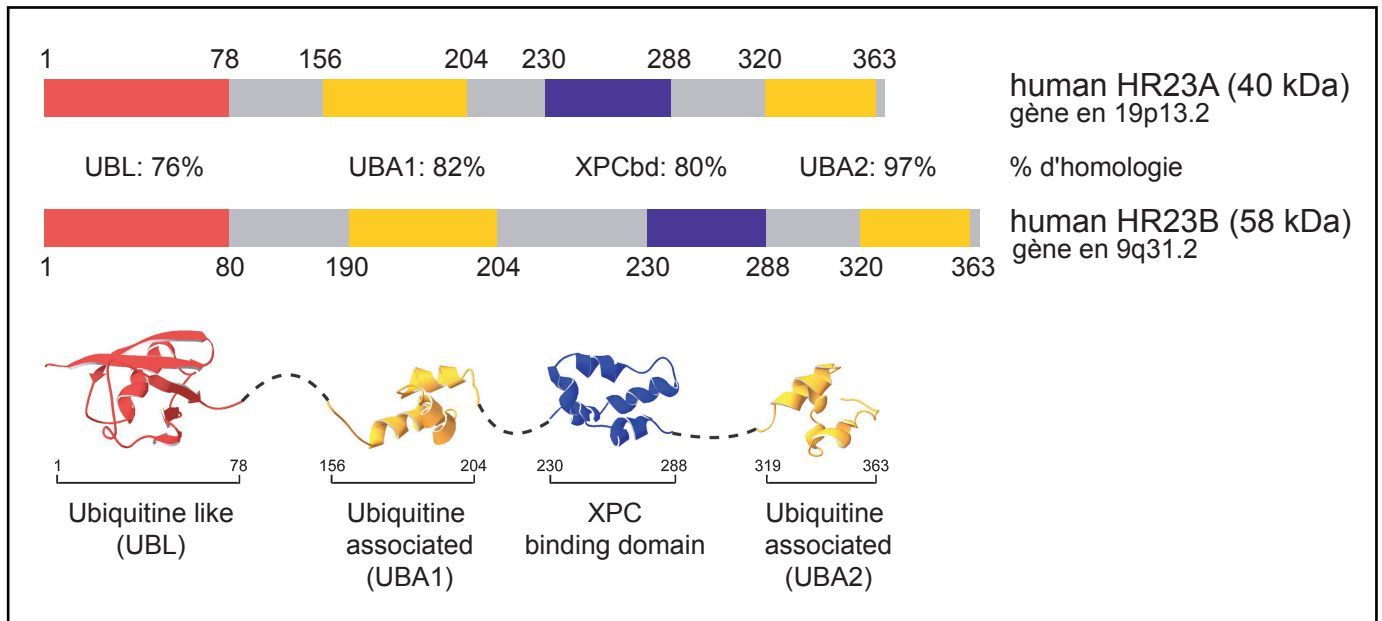


Figure 15: Domaines fonctionnels des protéines humaines HR23A et HR23B

Les protéines HR23A et HR23B sont les homologues de RAD23 chez la levure. Ces protéines sont les produits de deux gènes distincts dont la localisation est indiquée. Ces protéines possèdent quatre domaines fonctionnels dont l'homologie entre les deux membres est précisée. La représentation tridimensionnelle des quatre domaines (UBL, UBA1, XPC-bd, UBA2) est basée sur l'homologue humain hHR23A.

(représentation adaptée de N. Dantuma *et al*, 2009)

les travaux de purification de XPC, protéine de 125 kDa, ont montré que ce facteur semblait majoritairement associé à HR23B, des traces de son homologue HR23A ont aussi été copurifiées dans ce complexe (Masutani *et al.*, 1994 ; Masutani *et al.*, 1997 ; Araki *et al.*, 2001 ; Ng *et al.*, 2003 ; Okuda *et al.*, 2004 ; Ortolan *et al.*, 2004).

Chez la plupart des mammifères la protéine RAD23 de la levure possède deux protéines orthologues HR23A (40 kDa) et HR23B (58 kDa). Produits de 2 gènes distincts localisés respectivement en 19p13.2 et 9q31.2 chez l'homme, ces deux membres présentent une grande homologie de séquence, particulièrement au niveau de leurs domaines fonctionnels (75 à 95% de conservation): un domaine UBL (ubiquitin like) dont la conformation imite l'ubiquitine et est responsable d'interaction avec le protéasome, deux domaines UBA (ubiquitin associated) de liaison à l'ubiquitine et un domaine de liaison à XPC (Figure 15). Cohérent avec cette forte conservation de séquence, des travaux ont montré qu'à la fois *in vitro* et *in vivo* HR23A et HR23B étaient capables d'interaction avec la protéine XPC et qu'ainsi ces facteurs étaient interchangeable dans la formation du complexe de reconnaissance XPC-HR23 (Li *et al.*, 1997 ; Sugawara *et al.*, 1997). Ainsi, malgré les études de purification du complexe XPC et de reconstitution du GG-NER qui n'impliquent que l'enzyme HR23B, l'interchangeabilité des protéines HR23A et HR23B dans le complexe de reconnaissance des dommages du GGR est argumentée par la génération de souris KO pour l'un des deux membres ou les deux (Masutani *et al.*, 1994 ; Volker *et al.*, 2001 ; Riedl *et al.*, 2003). En effet, le double KO mHR23A/B engendre un phénotype de déficience de GGR, phénotype comparable au KO XPC, tandis que le KO d'un seul membre n'entraîne pas de déficience dans ce mécanisme de réparation. De plus la réintroduction de protéine recombinante mHR23A rétablit une activité NER dans les souris double KO HR23A/B (Ng *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2003 ; Okuda *et al.*, 2004). Ce phénotype implique clairement les protéines HR23 dans le GG-NER et montre leur fonction redondante dans ce processus. Il est intéressant de noter que le double KO HR23A/B engendre une létalité embryonnaire, démontrant ainsi que le rôle de ces deux protéines ne se restreint pas au mécanisme de réparation, avec notamment un rôle dans la dégradation protéique protéasome-dépendante liée à la présence des domaines UBL et UBA.

Le complexe de reconnaissance des dommages du GG-NER comporte un troisième membre récemment identifié: la centrine 2. Chez l'homme, cette protéine est l'une des trois isoformes de la famille des centrines impliquées dans la duplication du centrosome lors de la division cellulaire. Bien que sa présence ne soit pas nécessaire pour reconstituer le mécanisme

in vitro, la centrine 2 semble stabiliser le complexe XPC-HR23 augmentant ainsi l'activité du GG-NER (Araki *et al.*, 2001).

Le complexe XPC-HR23-Centrin2 reconnaît les lésions de l'ADN non pas directement, mais par la déformation de la double hélice qu'elles engendrent. Mais les distorsions induites ne sont pas équivalentes selon les dommages. Si l'on compare les deux types de dommages majoritairement induits par les radiations UV, alors que les lésions de type (6-4) PPs induisent une forte déformation de l'ADN facilement détectables par le complexe XPC, les lésions de type CPDs n'induisent qu'une modeste distorsion, ce qui les rend plus difficilement détectables. Cohérent avec cette observation, il a été montré que l'ajout d'un ou deux mésappariements de base sur le brin opposé d'un CPD augmente la distorsion de la double hélice et améliore la fixation du complexe XPC-HR23-Centrin2 (Kim *et al.*, 1995 ; Kusumoto *et al.*, 2001).

Un second complexe est nécessaire pour améliorer la détection des lésions de type CPDs, l'hétérodimère DDB (damaged DNA binding) constitué de deux protéines p127/DDB1 et p128/DDB2/XPE. Ce complexe présente une forte affinité pour les dommages de l'ADN comme les (6-4) PPs et les CPDs et sa fixation sur la lésion induit une déformation supplémentaire de la double hélice, améliorant la reconnaissance par le complexe XPC-HR23 (Payne et Chu, 1994 ; Tang et Chu, 2002)). *In vitro* la reconstitution du GG-NER ne semble pas nécessiter la présence de ce complexe, mais *in vivo* son action pourrait être cruciale pour une bonne reconnaissance des CPDs. Ainsi la perte de ce complexe DDB peut être associée au groupe de complémentation XPE du syndrome XP mais cette observation est controversée selon les études (Nichols *et al.*, 1996 ; Rapic-Otrin *et al.*, 2003).

Une des particularités du complexe DDB est de posséder une activité E3 ligase. En effet il a été observé l'association de la culine 4 avec d'un côté la sous unité RBX1 comme E2 sous unité de liaison et le complexe DDB comme E3 ubiquitine ligase. Dans ce cas le complexe DDB est composé soit de l'hétérodimère DDB1-DDB2 ou de l'association DDB1-CSA. Quand ce complexe E2-culine4-E3 comporte l'association CSA-DDB1 (Cockayne Syndrome A) comme E3 ubiquitine ligase, on observe une polyubiquitination de CSB (Cockayne Syndrome B) conduisant à sa dégradation (Groisman *et al.*, 2003). A l'opposé, lorsque ce complexe comporte l'hétérodimère DDB1-DDB2 comme E3 ligase, il conduit à la polyubiquitination de XPC, ce qui augmente son affinité pour l'ADN. Ce mécanisme s'autorégule car parallèlement DDB2 est polyubiquitiné, ce qui conduit à sa rapide dégradation par le protéasome. Ainsi une boucle d'auto-régulation s'établit entre le complexe

DDB-XPC-HR23 très affin pour l'ADN et le complexe XPC-HR23 qui l'est moins (Sugasawa, 2006).

III 5.2.2 Reconnaissance des lésions dans le Transcription Coupled Repair (TCR-NER)

La sous voie TCR du mécanisme général NER est impliquée dans la réparation des lésions induites sur les brins transcrits des gènes actifs, dont la reconnaissance se fait lors de la transcription.

Historiquement cette voie dérivée du NER a été mise en évidence suite à l'observation dans des cellules ovariennes d'hamster, de l'efficacité accrue de la réparation de lésions CPDs du gène actif par comparaison à la séquence silencieuse en aval. Ces études trouvèrent un lien entre cette efficacité et la localisation des lésions (Bohr *et al.*, 1985 ; Mellon *et al.*, 1987). En effet, lors de la génération d'un brin d'ARN à partir d'une matrice d'ADN, la présence de lésions entraîne le blocage de l'ARN polymérase II, et cet arrêt semble constituer le signal de départ du mécanisme de réparation initiant le recrutement de facteurs de réparation, selon un mécanisme qui, malgré les avancées actuelles, n'est pas encore entièrement décrit (Mellon *et al.*, 1987). Ainsi pour les lésions de type CPDs, dont la reconnaissance est moins efficace par les facteurs du GG-NER (reconnaissance due à une faible distorsion de la double hélice), ce mécanisme résulte en une plus rapide réparation sur le brin transcrit comparé au reste du génome. Cette différence est moins visible pour les lésions de type (6-4) PPs dont la reconnaissance par les enzymes du NER est très efficace. Bien que le TCR-NER ait été historiquement lié à la réparation de lésions UV-induites, il est possible que ce mécanisme puisse aussi réparer les dommages de types oxydatifs (8-oxoG) mais le débat reste ouvert, les résultats de plusieurs équipes étant contradictoires (Thorslund *et al.*, 2002 ; Larsen *et al.*, 2004 ; Pastoriza-Gallego *et al.*, 2007).

L'arrêt de l'ARN polymérase II (ARNPII) initie la voie du TCR mais, chez les mammifères, les étapes intermédiaires entre cet arrêt et le recrutement du complexe d'excision TFIIH commun aux deux voies du NER sont encore mal connues. Des travaux montrent malgré tout que les produits des gènes *CSA* et *CSB* sont impliqués dans cette reconnaissance, leurs rôles respectifs restant encore mal définis (Figure 14).

Des travaux réalisés chez *E.coli* montrent que le produit du gène bactérien *Mfd* est responsable du déplacement de la polymérase (associée au transcrit incomplet) du site de la lésion jusqu'à son éviction du brin matrice selon un mécanisme ATP dépendant, éviction

rendant la lésion accessible aux systèmes de réparation (Park *et al.*, 2002). La réaction semble bien plus complexe chez les mammifères mais plusieurs données suggèrent que la protéine ERCC6/CSB pourrait jouer le rôle de Mfd (Troelstra *et al.*, 1992). Le produit du gène CSB est une protéine de 168 kDa membre de la famille des SWI/SNF, facteurs de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Comme les facteurs de cette famille, CSB est une ATPase DNA-dépendante capable de lier l'ADN mais elle ne présente pas d'activité hélicase à l'inverse de la plupart des membres de cette famille. De plus CSB est capable de stimuler l'élongation de la transcription lors du blocage de l'ARN polymérase sur une lésion CPD, permettant l'ajout d'un nucléotide sur le transcrit en cours (Selby *et al.*, 1997). Ainsi, le facteur CSB semble impliqué dans le recrutement du complexe TFIID suite à l'arrêt de l'ARN polymérase II. En effet, des travaux montrent que l'association ARNP2/CSB est capable d'interagir avec les sous unités p62 et XPD du complexe TFIID et que les facteurs CSB et XPD fixent *in vitro* d'une manière coopérative l'ARNP2 (Sarker *et al.*, 2005). De plus, *in vivo*, des expériences de ChIP (immuno-précipitation de chromatine) après irradiation UV montrent que l'ARNP2 bloquée sur des lésions est associée à CSB suggérant que le recrutement du TFIID sur les sites d'arrêt de l'ARNP2 nécessite la présence de CSB. De façon assez contradictoire, des travaux de reconstitution *in vitro* du TCR montrent que CSB serait plutôt impliqué dans l'activité d'incision après recrutement du complexe TFIID (Fousteri *et al.*, 2006 ; Laine et Egly, 2006).

CSA est une protéine de 44 kDa contenant cinq séquences répétées WD-40 impliquées dans l'interaction protéine-protéine (Henning *et al.*, 1995). Bien que sa présence semble indispensable pour le TCR, son rôle reste obscur. Il a été montré qu'après dommages de l'ADN, la protéine CSA était rapidement transloquée au noyau, nécessitant pour ceci la présence de CSB. De plus CSA semble colocaliser avec la forme hyper-phosphorylée de l'ARNP2 dans le noyau durant le TCR (Kamiuchi *et al.*, 2002). Récemment il a été montré que ce facteur faisait partie d'un complexe d'ubiquitine ligase E3 comprenant DDB1, la culine 4, Rbx1 et le signalosome (CSN) (Groisman *et al.*, 2003). Une étude montre que l'association du complexe CSA-DDB1-CSN avec l'ARNP2 bloquée serait dépendante de CSB tandis que d'autres travaux montrent que ce complexe serait responsable de l'ubiquitination de CSB conduisant à sa dégradation par le protéasome après irradiation UV (Fousteri *et al.*, 2006 ; Groisman *et al.*, 2006). Il semble ainsi exister un lien fonctionnel entre les protéines CSA et CSB mais les mécanismes ne sont pas encore bien connus.

III.5.3 Ouverture de la double hélice et recrutement des facteurs du NER

La reconnaissance des lésions par l'une ou l'autre des machineries du GGR ou du TCR est suivie de l'ouverture de la double hélice d'ADN autour de la lésion, conduisant à la formation d'une structure ouverte (Figure 14). La formation de cette structure nécessite l'action coordonnée d'un ensemble de protéines comprenant le facteur général de transcription TFIIH, super-complexe de 10 sous unités et un complexe formé par la protéine XPA et l'hétéro-trimère RPA (Replication Protein A composé de 3 sous unités, RPA1, RPA2 et RPA3). Le mécanisme exact de recrutement de tous ces acteurs sur le site du dommage n'est pas réellement élucidé mais, dans le GG-NER, l'assemblage de ce gros complexe est lié à la présence du complexe XPC-HR23 puisque dans les cellules déficientes en XPC le recrutement du complexe TFIIH n'a pas lieu suite à une irradiation UV (Volker *et al.*, 2001). Dans la sous voie particulière du TCR-NER, c'est probablement la présence de la protéine CSB qui permet le recrutement du complexe TFIIH (Sarker *et al.*, 2005).

Le complexe TFIIH est un complexe de 10 sous unités dont l'action est essentielle dans le NER, dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II et probablement impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. Les 10 sous unités, cdk7 (cyclin dépendant kinase 7), cycline H, Mat1, XPB, XPD, p34, p44, p52, p62 et TTD-A peuvent être associées en différents réarrangements. Le cœur du complexe constitué de p34, p44, p52, p62, TTD-A est connecté via les 2 sous unités XPB et XPD au sous complexe CAK (cdk-activating kinase) composé de cdk7, cyclin H et Mat1 (Winkler *et al.*, 1998 ; Schultz *et al.*, 2000). Lorsqu'il est associé au reste du TFIIH, ce complexe CAK phosphoryle la grande sous unité de l'ARNPII permettant son entrée en phase d'élongation. Cet état est le résultat final d'une cascade de phosphorylation impliquant la phosphorylation de la cycline H par des kinases extérieures et conduisant aux phosphorylations successives de cdk7 puis de la cible finale, la grande sous unité de l'ARNPII (Larochelle *et al.*, 2001 ; Hirose et Ohkuma, 2007). Mat1 semble être responsable de la spécificité de substrat et de l'interaction du complexe CAK avec le cœur du TFIIH (Rossignol *et al.*, 1997 ; Busso *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2004). Les deux sous unités XPB et XPD sont des ATPases ADN-dépendant et des hélicases de polarité opposée, dont l'action semble complémentaire. En effet XPB est capable d'ouvrir la double hélice d'ADN dans le sens 3' → 5' pendant que XPD est responsable de l'ouverture dans le sens opposé. Les fonctions précises de la protéine XPB dans le complexe TFIIH restent obscures, car récemment des travaux ont montré que c'est l'activité ATPasique de XPB, et non pas son activité hélicase, qui est nécessaire au NER (Coin *et al.*, 2007). Une autre étude montre que la

ETAPE	ENZYMES	ACTIVITE DANS LE NER
Initiation du GGR (global genomic repair)	XPC HR23A, HR23B centrine 2 DDB1, DDB2	reconnaissance et fixation des lésions stabilisation du complexe XPC par ubiquitination stabilisation du complexe XPC reconnaissance des lésions de type CPD, augmente la torsion de l'ADN
Initiation du TCR (transcription coupled repair)	CSA, CSB	associés à l'ARN Pol II bloquée sur une lésion, recrutement du TFIIH
Ouverture et incision de l'ADN / Excision du brin endommagé	XPB XPD	sous unité hélicase (3' > 5') du complexe TFIIH sous unité hélicase (5' > 3') du complexe TFIIH
	p34, p44, p52, p62 p8 (TTDA)	coeur du complexe TFIIH
	Cdk7, cycline H, MAT1	sous unités kinases du complexe TFIIH
	XPA	fixe l'ADN endommagé
	RPA1, RPA2, RPA3	hétéro-trimère RPA, protection de l'ADN intact simple brin
Synthèse et Ligation	XPG XPF, ERCC1	incision en 3' de la lésion incision en 5' de la lésion
	ADN Pol δ , ϵ RFC, PCNA	resynthèse du brin excisé cofacteur des polymérases δ et ϵ
	Ligase III, XRCC1	Ligation

Tableau 3: Les enzymes du mécanisme de réparation par excision de nucléotide (NER)

protéine XPD semble inhiber la prolifération cellulaire en inhibant l'activité du complexe CAK (Chen *et al.*, 2003). Les facteurs XPB et XPD, associés aux sous unités p34, p44, p52 et p62, forment une structure en anneau rattachant le complexe CAK (Schultz *et al.*, 2000). De même les fonctions précises de ces 5 sous unités restent à découvrir, des données montrant l'inter-régulation de ces sous-unités entre elles suggèrent qu'elles seraient impliquées dans la stabilité globale du complexe TFIIH. Ainsi on peut noter que p44 est capable d'activer l'activité hélicase de XPB et que son homologue chez la levure possède une activité E3 ligase (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001 ; Takagi *et al.*, 2005).

Associé au complexe TFIIH, on trouve un complexe constitué de la protéine XPA qui présente une forte affinité pour l'ADN endommagé et l'hétéro-trimère RPA capable de lier l'ADN simple brin (Jones et Wood, 1993 ; Matsuda *et al.*, 1995). Le complexe XPA paraît nécessaire dans le NER mais son rôle reste à déterminer. Initialement présenté comme impliqué dans le complexe de reconnaissance avec le complexe XPC, des données récentes montrent que le complexe XPA est recruté après le TFIIH et entraînerait la dislocation du complexe XPC-HR23 (Volker *et al.*, 2001 ; Hey *et al.*, 2002). D'autres travaux suggèrent que ce complexe permettrait l'identification du brin portant la lésion (Sugasawa *et al.*, 1998). Le trimère RPA1-RPA2-RPA3 dans ce complexe XPA-RPA pourrait avoir un rôle stabilisateur du complexe TFIIH et de protection de l'ADN non endommagé (Kolpashchikov *et al.*, 2001).

III.5.4 Incision de la région d'ADN endommagée et excision du brin

Une fois la double hélice ouverte, l'étape suivante du NER est l'incision du brin endommagé de part et d'autre de la région dénaturée par l'action complémentaire des endonucléases, XPG du côté 3' de la lésion et l'hétérodimère XPF-ERCC1 du côté 5' ([Figure 14](#)) (O'Donovan *et al.*, 1994 ; Mu *et al.*, 1996). L'assemblage et l'action des deux endonucléases ne paraissent pas synchrones, la présence de XPG semble nécessaire pour l'incision de l'autre extrémité par le complexe XPF-ERCC1, le mécanisme exact reste mal connu (Wakasugi *et al.*, 1997). Il semblerait que XPG joue aussi un rôle structural en plus de son activité d'endonucléase, comme le suggère une récente étude montrant que XPG stabiliserait le complexe TFIIH alors que son absence entraînerait une dissociation partielle (Ito *et al.*, 2007). Dans le complexe ERCC1-XPF, l'activité endonucléasique est assurée par XPF, la présence de ERCC1 semblant responsable du bon positionnement de XPF tout en contribuant à la stabilisation du complexe (Houtsmuller *et al.*, 1999). De plus, des études suggèrent que la présence du complexe XPA-RPA n'est pas nécessaire pour le recrutement de

XPG mais pourrait déclencher son activité endonucléasique. A l'inverse la fixation de RPA sur le brin intact semble importante pour la localisation de ERCC1-XPF tandis que l'interaction de ce complexe avec la protéine XPA stabiliserait son bon positionnement (de Laat *et al.*, 1998 ; Sargent *et al.*, 2000 ; Volker *et al.*, 2001). Une fois le complexe assemblé, l'incision peut avoir lieu. Il semblerait que cette incision nécessite la présence d'ATP, sans quoi le complexe TFIIH inhiberait l'activité endonucléasique (Winkler *et al.*, 2001). Les incisions se font de manière asymétrique et indépendante, l'extrémité 3' probablement incisée avant l'extrémité 5'. Cette coupure survient environ 2 à 8 nucléotides en 3' de la lésion par XPG et 15 à 24 nucléotides du côté 5' par le complexe ERCC1-XPF, les localisations précises des incisions pouvant varier en fonction du type de lésion (Mu *et al.*, 1996 ; Evans *et al.*, 1997).

III.5.5 Synthèse et ligation

Chez les mammifères, le fragment d'ADN excisé par le NER fait environ 25 à 30 nucléotides de longueur. Il existe une variation de taille de la séquence excisée car les endonucléases ne coupent pas exactement aux mêmes endroits selon le type de lésion (Svoboda *et al.*, 1993 ; Matsunaga *et al.*, 1995 ; Moggs *et al.*, 1996). L'excision en 5' de la lésion réalisée par le complexe ERCC1-XPF laisse un groupement hydroxyl (3'-OH) à l'extrémité 3' du brin coupé. Cette terminaison sert de matrice pour les ADN polymérases δ ou ϵ qui viennent combler la partie manquante de la double hélice, en association avec le complexe PCNA dont la présence est requise pour l'assemblage de ces deux polymérases et qui permet une synthèse efficace. La polymérisation semble aussi nécessiter la présence du facteur de réplication C (RFC) qui, après fixation de l'extrémité 3' du brin matrice, facilite le recrutement de PCNA. Il est probable qu'à ce stade la plupart des acteurs du NER soient dissociés de la structure ouverte, sauf le trimère RPA dont la présence protège l'ADN de la dégradation par les nucléases comme le montre une reconstitution *in vitro* de la synthèse en présence des quatre éléments, RPA, RFC, PCNA et l'une des deux polymérase δ ou ϵ (Popanda et Thielmann, 1992 ; Shivji *et al.*, 1992 ; Shivji *et al.*, 1995). Enfin la coupure restante est scellée par l'action d'une ligase, non pas par la ligase 1 mais plutôt probablement par la ligase 3 associée à la protéine XRCC1 (Moser *et al.*, 2007). Cette ligation conclue le processus du NER.

III.6 Syndromes de déficience du NER

Les conséquences de la non fonctionnalité de l'une des protéines du NER conduisent à l'apparition d'un des 3 syndromes rares d'hypersensibilité aux radiations UV: Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Syndrome (CS) et la forme photosensible de la trichothiodystrophie (TTD). Ce sont des maladies génétiques autosomiques récessives. Des expériences de fusion cellulaire ont permis l'identification de sept groupes de complémentation différents dans le syndrome XP (désignés XP-A à XP-G) et deux dans le syndrome CS (CS-A et CS-B) (Tableau 4). Certains patients présentent des formes combinées du syndrome XP et CS (XP-B, XP-D et XP-G). Enfin on sépare le syndrome TTD en trois groupes (XP-B, XP-D et TTD-A). Chacun de ses groupes résultant d'une déficience d'une protéine différente, il est intéressant de noter que des mutations distinctes des gènes *XPB*, *XPD* et *XPG* sont associées à des formes cliniques différentes des syndromes XP, XP/CS ou TTD. Ces trois syndromes sont associés à une hypersensibilité aux irradiations solaires mais seul le syndrome XP présente une prédisposition aux cancers cutanés. Les symptômes cliniques de ces trois syndromes diffèrent considérablement, la déficience en un NER actif n'expliquant pas tout (Tableau 5) (de Boer et Hoeijmakers, 2000).

III.6.1 Le Xeroderma Pigmentosum (XP)

Le syndrome de Xeroderma Pigmentosum (XP) fut mis en évidence la première fois en 1870 par le docteur Kaposi, dermatologue hongrois, qui lui donna son nom faisant référence à un aspect de la peau en parchemin (xeroderma) et à la pigmentation hétérogène, taches de rousseurs (pigmentosum) des régions cutanées exposées au soleil. Chez ces patients, l'exposition aux radiations solaires entraîne généralement une dégénération progressive de leur peau et de leurs yeux. La fréquence de cette maladie varie de 1.10^{-6} en Europe et aux Etats-Unis, à 1.10^{-5} au Japon, Maghreb et Moyen Orient. On estime à 3000-4000 le nombre de cas dans le monde (30 à 50 en France), estimation difficile car la plupart d'entre eux ne sont pas identifiés (asso.orpha.net).

La moyenne d'âge d'apparition de ces symptômes est d'environ 2 ans. Ils sont associés à une augmentation de plus de 1000 du facteur de risque de développer un cancer cutané, le plus souvent confiné aux régions exposées au soleil comme le visage, le cou, la tête et l'extrémité de la langue (Kraemer, 1997). Ces lésions cancéreuses cutanées sont majoritairement des carcinomes de type basaux ou squameux, moins fréquemment des mélanomes, avec une moyenne d'âge d'apparition de l'ordre de 8 ans, c'est-à-dire environ 50

Groupes de complémentation	Fréquence relative	Réparation (NER)		Clinique			Syndromes associés
		GGR	TCR	Sensibilité aux UV	Cancers cutanés	Anomalies neurologiques	
XP-A	élevée	-	-	+++	+	++ ^a b	XP
XP-B	très rare	-	-	++	+/-	+ /+++ ^b	XP, XP/CS, TTD
XP-C	élevée	-	+	+	+	-	XP
XP-D	intermédiaire	-	-	++	+/-	+ /+++ ^b	XP, XP/CS, TTD
XP-E	rare	-	?	+	+/-	-	XP
XP-F	rare	-	-	+	+/-	- /+ ^a	XP
XP-G	rare	-	-	++	+/-	+ /+++ ^b	XP, XP/CS
CS-A	intermédiaire	+	-	+	-	++ ^b	CS
CS-B	élevée	+	-	+	-	++ ^b	CS
TTD-A	très rare	-	-	+	-	+	TTD

Tableau 4: Groupes de complémentation des syndromes XP, CS et TTD

a: neurodégénérescence; b: démyélinisation

NER: Nucléotide Excision Repair; GGR: Global Genomic Repair; TCR: Transcription Coupled Repair; XP Xeroderma Pigmentosum; CS: Cockayne Syndrome; TTD: Trichothiodystrophie.

(d'après A. Keriél, 2002)

ans avant la population normale. De plus ces malades ont un facteur de risque 10 à 20 fois plus élevé de développer de nombreux types de cancers internes avant l'âge de 20 ans, de nombreux malades décèdent avant l'âge de 30 ans de néoplasie (Kraemer *et al.*, 1984 ; Kraemer *et al.*, 1987). Considérant l'implication du NER dans la réparation de nombreuses lésions induites par des agents chimiques, environnementaux mais aussi par les métabolites cellulaires, ces lésions jouent probablement un rôle dans ces néoplasmes internes. Une fraction de ces malades, environ 18%, présentent des atteintes neurologiques progressives, probablement liées à une dégénération neuronale et une perte de neurones. La conclusion la plus sévère de ces manifestations cliniques est le syndrome de DeSanctis-Cacchione qui conduit à une micro-céphalie, une détérioration mentale progressive, un nanisme et des atteintes du développement sexuel (de Boer et Hoeijmakers, 2000).

Comme mentionné précédemment, le syndrome XP se caractérise par une hétérogénéité génétique conduisant à une hétérogénéité dans la sévérité des défauts de la réparation, des symptômes de photo-sensibilité et d'atteintes neuronales (Tableaux 4 et 5). Il apparaît que les individus présentant un défaut partiel du NER, comme les patients XP-F et XP-C, ne développent pas de symptômes neurologiques, ou d'une manière plus tardive comparés aux patients présentant des défauts plus sévères du NER comme les patients XP-A. Il est probable qu'un défaut de réparation des lésions endogènes, dommages oxydatifs, par le NER dans les cellules nerveuses de ces patients soit à l'origine d'une mort neuronale (Reardon *et al.*, 1997). De nombreux individus XP-A, XP-B, XP-D et XP-G présentent une sévère déficience en NER, cependant les patients XP-D et XP-G présentent souvent une faible activité résiduelle faible du NER (de Boer et Hoeijmakers, 2000). Les patients XP-C présentent une susceptibilité modérée due à un mécanisme de TCR-NER fonctionnel, processus ne nécessitant pas la présence de XPC et permettant la réparation des dommages des brins transcrits des gènes actifs. Ainsi, les cellules dérivées de ces patients XP-C possèdent une activité résiduelle de réparation de 15 à 30% et sont moins sensibles aux radiations UV que les cellules dérivées de patients XP-A ou XP-D. Les patients XP-E sont les moins affectés (Berg *et al.*, 1998 ; de Boer et Hoeijmakers, 2000). Un 8^{ème} groupe de complémentation XP a été plus récemment décrit et regroupe 20 à 25% des patients XP présentant des signes cliniques plus tardifs (entre 15 et 40 ans) et une évolution des symptômes plus lente. Certains patients de ce groupe appelé XP-V pour XP-Variant présentent une inactivation de la polymérase ϵ qui est capable de dépasser les lésions CPDs sans introduire de mutations. Chez ces patients, son inactivation conduirait à son remplacement par d'autres polymérases moins fidèles, résultant en une accumulation de mutations durant la réplication de l'ADN

Symptômes	Syndromes			
	XP	XP/CS	CS	TTD
Cutanés				
photosensibilité	++	++	+	+/-
anomalies pigmentaires	++	+	-	-
cheveux/ongles cassants	-	-	-	+
ichtyose	-	-	-	+
prédisposition aux cancers cutanés	++	+	-	-
Développementaux				
retard de croissance	-	+	+	+
immaturité sexuelle	-	+	+	+
Neurologiques				
neurodégénérescence	+	+	+	-
neurodysmyélination	-	+	+	+
dégénération mentale	+/-	+	+	+
ataxie	+/-	+	+	+/-
microcéphalie	+/-	+	+	+/-
Cellulaires				
sensibilité aux UV	++	++	+	+/-

Tableau 5: Symtômes associés aux syndromes XP, CS et TTD

XP: Xeroderma Pigmentosum; CS: Syndrome de Cockayne; XP/CS syndrome sévère combinant les phénotypes du XP et du CS; TTD: Trichothiodystrophie. (d'après A. Keriél, 2002)

(Masutani *et al.*, 1999).

III.6.2 Le Syndrome de Cockayne (CS)

Le syndrome de Cockayne fut décrit pour la première fois en 1946 par Edward Alfred Cockayne, pédiatre anglais qui reconnut une maladie infantile qui portera son nom plus tard. Le CS est un syndrome pléiotropique se caractérisant par une sensibilité cutanée accrue aux radiations UV et autres agents de dommages, sensibilité due à un défaut du mécanisme de TCR-NER (Tableaux 4 et 5). Ces patients présentent de plus des retards physiques et mentaux mais ils ne sont pas prédisposés au développement d'un cancer cutané, le mécanisme de GGR-NER restant efficace. De façon générale ces individus souffrent de défauts du squelette et structuraux comme des défauts du visage (yeux creusés, nez crochu, traits tirés, mâchoire saillante), des caries dentaires, une cyphose de la colonne vertébrale et une ostéoporose chez le patient âgé. Parmi les nombreux autres symptômes cliniques possibles, on peut observer une dégénération neurologique progressive précoce, un développement psychomoteur retardé, une démarche instable et des retards mentaux. Une microcéphalie est rapportée chez la plupart des patients avant l'âge de deux ans et des biopsies nerveuses montrent des défauts de myélinisation. D'autres symptômes typiques incluent une perte de la perception auditive, des rétinopathies pigmentaires et un visage desséché. Les individus CS montrent des atteintes du développement sexuel et des défauts de croissance post-natale et, leur poids étant plus affecté que leur taille, on parle de nanisme cachectique. L'espérance de vie moyenne est de douze ans, leurs décès ayant pour cause principale des pneumonies et des infections respiratoires, probablement le résultat d'une condition générale très appauvrie (de Boer et Hoeijmakers, 2000).

Les patients CS sont habituellement classés en quatre types, selon leur sévérité décroissante: le COFS, le type II, le type I et le type III.

Le syndrome COFS (syndrome cérébro-oculo-facio-squelettal) entraîne une létalité embryonnaire ou très précoce. Les symptômes sont proches du CS avec en plus des anomalies au niveau viscéral et une absence totale d'activité transcriptionnelle. D'un point de vue cellulaire ce syndrome est souvent causé par des mutations sur les gènes CSB, XPD, XPG ou ERCC1.

Le type II est une forme très sévère avec de nombreux symptômes neurologiques, généralement létal à la naissance ou pendant l'enfance. Il résulte d'une combinaison du

syndrome XP et CS, mutations des gènes XPB, XPD et XPG. Les cellules sont complètement déficientes en NER, couplé à la transcription ou non.

Le type I constitue la forme classique et la plus fréquente du CS et résulte de déficiences des protéines CSA et CSB. Chez ces patients, la plupart des symptômes apparaissent au cours de la deuxième année de leur vie et leur espérance de vie est de 10 à 20 ans. Au niveau cellulaire, le mécanisme TCR de ces cellules est déficient tandis que le NER demeure actif (van Hoffen *et al.*, 1993).

Le type III est un intermédiaire de ces deux groupes, plus rare. Les symptômes de troubles du développement sont plus tardifs.

De nombreux symptômes cliniques du syndrome CS sont difficilement explicables par une seule déficience partielle de la voie TCR-NER, considérant de plus que les patients XP-A qui présentent un NER totalement déficient ne les présentent pas tous. L'implication des protéines CSA et CSB dans le complexe RNA Pol II suggère fortement une déficience de la transcription qui contribuerait à l'apparition de certaines de ces manifestations cliniques. De plus la présence de dommages endogènes (dommages oxydatifs) corrèle avec l'apparition de déficiences développementales. On peut noter ici que le KO CSB sur des souris n'engendre qu'une partie des symptômes CS alors que le double KO CSB/XPA induit de nombreux défauts de croissance et une mort prématurée. D'autre part comparées aux cellules sauvages, à l'inverse des cellules XP-A, les cellules dérivées de patients CS présentent une sensibilité accrue aux dommages oxydatifs induits par les radiations ionisantes. Certains patients XP-G présentent des formes combinées de XP et CS. On note chez ces patients la présence de dommages oxydatifs du à un TCR déficient, défaut absent chez les patients XP-G souffrant uniquement de XP. Ceci semble prouver le lien entre le syndrome CS et le défaut de réparation des dommages oxydatifs par le TCR (de Boer et Hoeijmakers, 2000).

III.6.3 La Trichothiodystrophie (TTD)

La trichothiodystrophie (TTD) est une maladie rare (1 naissance sur 1 million mais probablement plus car sous diagnostiquée) décrite pour la première fois par Pollitt en 1968 (Pollitt *et al.*, 1968). Ce syndrome se caractérise par une diminution des résidus soufrés dans la kératine, ce qui engendre chez les patients des ongles et des cheveux cassants. Ces individus peuvent en outre présenter une ichtyose, de l'eczéma, une lipodystrophie, un retard de croissance et des troubles neurologiques associés à une hypomyélinisation à l'origine de retards mentaux et de troubles moteurs (tremblements, ataxie) plus ou moins prononcés

(Tableaux 4 et 5) (Compe *et al.*, 2007). Une photosensibilité aux radiations UV est rapportée dans la moitié des cas mais aucune prédisposition aux cancers cutanés.

Il existe trois groupes de complémentation de TTD. Les deux premiers groupes ont pour origine une mutation sur les hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH (Stefanini *et al.*, 1986 ; Weeda *et al.*, 1997). L'implication du facteur TFIIH dans ces deux groupes fut démontrée par le "sauvetage" du syndrome de déficience de réparation par micro-injection de complexe purifié dans les cellules issues de patients TTD (van Vuuren *et al.*, 1994). Le troisième groupe de complémentation a été relié à la mutation sur la 10^{ème} sous unité du complexe TFIIH, la protéine TTD-A (Giglia-Mari *et al.*, 2004).

III.7 Régulation du NER par les UV

Chez la bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*), la description du système du NER a commencé à la fin des années 1950, par la découverte de souches mutantes plus sensibles aux radiations UV (Hill, 1958). Quelques années plus tard, des travaux montrèrent que les radiations UV conduisaient à la réparation de petites séquences d'ADN indiquant que ce n'était pas seulement la base endommagée, mais la séquence nucléotidique environnante qui était enlevée (Pettijohn et Hanawalt, 1964). Ces travaux furent suivis par la mise en évidence de trois loci, *uvrA*, *uvrB* et *uvrC* dont les mutations entraînaient une sensibilité accrue aux radiations UV (Howard-Flanders *et al.*, 1966). C'est au début des années 1970 que fut émise par M. Radman l'hypothèse de l'existence chez *E.coli* du système SOS, la cascade d'événements conduisant à la réparation de dommages UV-induits (Janion, 2008). Des études réalisées dans les années 1980 chez *E.coli* montrèrent que certains acteurs du système SOS étaient inductibles par la présence de dommages sur l'ADN. C'est le cas des produits des gènes *uvrA* et *uvrB* codant les protéines UvrA et UvrB qui forment un complexe responsable de la détection des lésions de l'ADN (Kenyon et Walker, 1981 ; van den Berg *et al.*, 1983). La présence d'un dommage entraîne la dissociation de ce complexe UvrA-UvrB, l'ouverture la double hélice par UvrB et la formation du complexe ADN-UvrB-UvrC permettant l'excision du brin portant la lésion. La régulation UV-induite de ce troisième membre *uvrC* est sujet à controverse (Van Houten, 1990 ; Van Houten *et al.*, 2005). Chez la levure *S. cerevisiae*, certains acteurs de ce mécanisme plus complexe semblent transcriptionnellement induits en réponse à la présence de dommages, comme les produits des gènes *RAD2*, *RAD7*, *RAD16* et *RAD23* (Robinson *et al.*, 1986 ; Madura et Prakash, 1990 ; Bang *et al.*, 1995 ; Scott et Waters, 1997).

Chez les mammifères, seuls les produits de deux gènes *DDB2* et *XPC* ont été montrés inductibles par la présence de dommages suite à une irradiation UV. Cette régulation est dans les deux cas liée à la présence de la protéine p53 et n'intervient que très tardivement, 16h après irradiation UV pour *XPC* et plus de 30h après pour *DDB2* (Hwang *et al.*, 1999 ; Nichols *et al.*, 2000 ; Adimoolam et Ford, 2002 ; Tan et Chu, 2002). Le délai d'activation de ces gènes étant tardif, ces inductions sont probablement liées à une conséquence de la réparation des lésions, plus qu'au mécanisme direct de réparation. Dans le cas de *DDB2*, parmi les hypothèses avancées, on peut lier cette surexpression à un mécanisme de prévention contre une induction ultérieure de dommages, une "touche finale" pour s'assurer que toutes les lésions présentes ont été reconnues et éliminées ou un remplacement de la protéine dégradée par la voie ubiquitine-protéasome après stimulation du complexe *XPC-HR23* (Ford, 2005 ; Nospikel, 2009).

Les avancées actuelles dans la compréhension du NER chez les mammifères suggèrent davantage une régulation du NER via des mécanismes de modifications post-traductionnelles notamment par l'ubiquitination et par des interactions protéine-protéine. Ainsi il a été montré que la poly-ubiquitination UV induite par le complexe *culin4-DDB-ubiquitine ligase* du facteur *XPC* résultait en un NER plus efficace. Cette poly-ubiquitination, ne semble pas entraîner la dégradation de la protéine *XPC* mais, au contraire, conduirait à une stabilisation du complexe de reconnaissance des lésions. Cette stabilisation semble liée à la fixation de l'un des 2 homologues *HR23A* ou *B* de la protéine *RAD23* chez la levure, ce qui protégerait la protéine *XPC* de la dégradation par la voie ubiquitine-protéasome (Ng *et al.*, 2003 ; Sugawara *et al.*, 2005 ; Sugawara, 2006). D'autre part l'analyse du complexe E3 *DDB-ubiquitine ligase* montre qu'à l'opposé, *DDB2/XPC* est aussi poly-ubiquitiné par ce même complexe mais que cette polyubiquitination bloque sa capacité de liaison à l'ADN et entraîne sa dégradation (Radic-Otrin *et al.*, 2002 ; Fitch *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2006). Ainsi les deux protéines *XPC* et *DDB2* sont poly-ubiquitinées en réponse à une irradiation UV, mais le devenir de ces deux facteurs diffère totalement, même si le même complexe E3 ubiquitine ligase est responsable des deux modifications.

De manière similaire, l'activité du complexe *TFIIH*, acteur principal du mécanisme, peut être modulée par l'interaction avec d'autres protéines du NER ou par modifications post-traductionnelles. En effet des données montrent que la phosphorylation de la sous unité *XPB* inhibe l'activité du NER en empêchant l'incision de l'extrémité 5' du brin endommagé par le complexe *ERCC1-XPB* (Coin *et al.*, 2004). De plus, des données assez récentes suggèrent la possibilité d'une ubiquitination d'une des sous unités du complexe *TFIIH*, sous unité non

identifiée mais qui ne serait ni XPB ni XPD. Cette modification semblerait nécessaire à son activité et serait déficiente dans certaines cellules différenciées entraînant ainsi, selon les auteurs un processus d'atténuation du NER dans lequel le GGR serait déficient sans que le TCR ne soit affecté (Nouspikel et Hanawalt, 2006 ; Nouspikel, 2009).

IV - L'ubiquitination dans la réponse aux radiations UV

L'ubiquitination par le système ubiquitine-protéasome est une modification post-traductionnelle qui régule la stabilité et la fonction des protéines. De même que le NER, ce système est bien conservé chez les eucaryotes, des levures aux mammifères. De nombreux mécanismes sont régulés par la protéolyse parmi lesquels on peut noter le cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse au stress, le développement et la régulation transcriptionnelle. Les défauts de la fonction protéasomale ont des effets pléiotropiques et sont impliqués dans le cancer du poumon, la perte musculaire, la maladie de parkinson et la réponse inflammatoire (Vu et Sakamoto, 2000). Cependant l'ubiquitination des protéines n'entraîne pas nécessairement leur destruction mais peut aussi modifier positivement leur activité (comme c'est le cas pour XPC par exemple) ou conduire à leur exportation (Hicke, 2001).

IV.1 Le système ubiquitine-protéasome

Les constituants essentiels du système ubiquitine-protéasome (UBS) ont été mis en évidence à la fin des années 1970 par un fractionnement biochimique d'un échantillon de lysat de réticulocytes. Une des fractions appelée APF-1 (ATP-dépendant Proteolysis Factor-1) contenait une protéine capable, en présence d'ATP, de lier de manière covalente un substrat conduisant à sa dégradation. Cette protéine de 76 acides aminés est l'ubiquitine, molécule précédemment décrite et dont le nom est probablement lié à son aspect ubiquitaire (Goldstein, 1974 ; Goldstein *et al.*, 1975). Plus tard, l'étude de la machinerie responsable de la dégradation conduisit à l'appellation de protéasome et fut le départ de son implication dans de nombreux processus biologiques, principalement la régulation du cycle cellulaire.

IV.2 L'ubiquitination des protéines

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés et de masse moléculaire d'environ 8500 Da. Elle est très conservée chez les eucaryotes, sa séquence protéique humaine partage 96% d'identité avec l'homologue chez la levure. Elle est codée dans le génome comme une protéine de fusion comprenant soit un monomère d'ubiquitine en fusion avec les sous unités

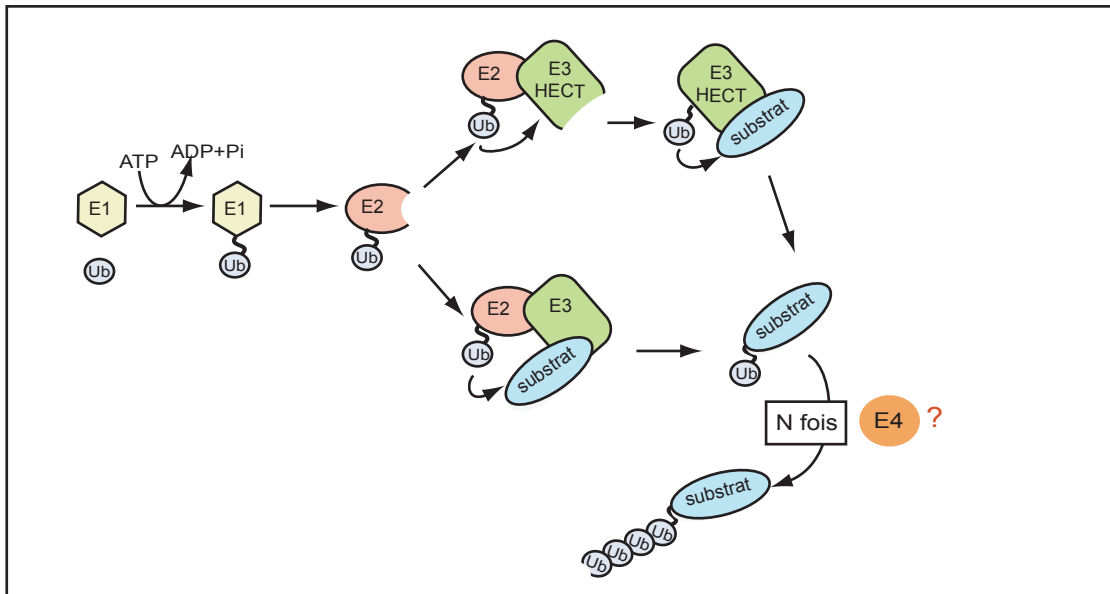


Figure 16: Le mécanisme d'ubiquitination

Au cours du processus d'ubiquitination, l'ubiquitine est activée par la formation d'une liaison thio-ester avec la cystéine d'une enzyme E1 (enzyme d'activation), transférée à une enzyme E2 (enzyme de conjugaison) et enfin greffée sur une lysine substrat par l'intermédiaire d'une enzyme E3 (ubiquitine ligase). On distingue les enzymes E3 de la famille HECT qui forment une liaison covalente avec l'ubiquitine avant de la transférer au substrat, et les autres E3 qui ne lient pas l'ubiquitine mais qui participent au rapprochement avec son substrat. Le processus répété plusieurs fois conduit à la formation d'une chaîne de polyubiquitine. La polyubiquitination peut nécessiter l'action d'une E4 qui facilite l'allongement de la chaîne d'ubiquitine. (d'après de Woelk *et al*, 2007)

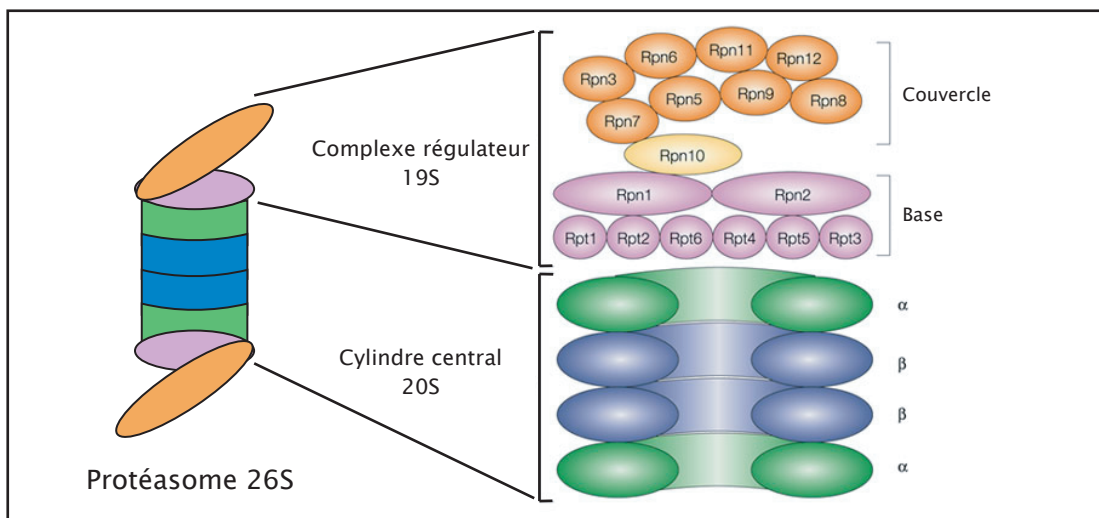


Figure 17: Structure et composition du protéasome 26S

Le protéasome 26S est un complexe multi-protéique composé d'un cylindre central 20S, centre catalytique, et de deux complexes régulateurs 19S. Le cylindre central 20S est constitué de quatre anneaux heptamériques composés de sept sous unités α (anneaux extérieurs) ou β (anneaux centraux). Le complexe régulateur est constitué de 17 sous unités formant deux structures: 9 sous unités forment la base qui se juxtapose sur l'anneau extérieur du cylindre 20S et 8 autres sous unités s'organisent en un couvercle situé sur la base. (d'après de Pickart et Cohen, 2004)

L40 ou S27 du ribosome soit plusieurs unités d'ubiquitine arrangées en tandem (Finley *et al.*, 1989). L'ubiquitine est ensuite libérée de la protéine de fusion par l'action d'isopeptidases appelées déubiquitinases (DUB) et acquiert ainsi la capacité de conjugaison avec son substrat. On note deux classes de DUB: les ubiquitin processing (UBP) et les ubiquitin carboxy-terminal hydrolases (UCH). Ces deux types peuvent être codés par de nombreux gènes distincts entraînant une variation de séquences et de domaines probablement spécifiques de substrats particuliers (Wing, 2003). D'autre part, en fin du processus d'exportation du substrat, une sous unité RPN11 du complexe 19S, régulateur du protéasome possède une activité déubiquitinase, probablement impliquée dans la déubiquitination des substrats amenés au protéasome. Ceci permettrait d'une part leur transfert dans la chambre catalytique 20S du protéasome et d'autre part un recyclage de l'ubiquitine dans la cellule (Yao et Cohen, 2002 ; Verma *et al.*, 2004). Les protéines ciblées vers la dégradation par le protéasome sont le plus souvent associées à une chaîne d'ubiquitines par une liaison covalente isopeptidique impliquant l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitine et le plus souvent une lysine du substrat ou parfois un groupement amino-terminal (Ciechanover et Ben-Saadon, 2004).

Au cours de ce processus d'ubiquitination (Figure 16), l'ubiquitine est d'abord activée en formant une liaison thio-ester avec une cystéine d'une enzyme E1, enzyme d'activation de l'ubiquitine. Elle est ensuite transférée à l'une des enzymes E2, enzymes de conjugaison de l'ubiquitine. Enfin l'ubiquitine est greffée sur son substrat par l'action d'une enzyme E3, ubiquitine ligase. Les E3 ligases sont divisées en deux groupes: on distingue les enzymes E3 de la super-famille des HECT qui forment une liaison covalente avec l'ubiquitine avant de la transférer sur le substrat et les autres enzymes E3 qui ne lient pas l'ubiquitine mais participent au rapprochement de l'E2 et de son substrat. Le résultat est la formation de la liaison isopeptidique évoquée ci-dessus. Une chaîne de polyubiquitine se forme par répétition de cette cascade enzymatique sur le même substrat, la nouvelle ubiquitine se liant le plus souvent au résidu 48Lys d'une ubiquitine précédemment fixée formant ainsi une chaîne de plusieurs ubiquitine. Cette chaîne d'ubiquitines liés par leurs résidus K48 est reconnue par le protéasome 26S et conduit à la dégradation du substrat. Une seule enzyme E1 était connue pour charger l'ubiquitine sur les E2, jusqu'à la récente mise en évidence d'une seconde E1 ayant sa propre spécificité de E2 (Jin *et al.*, 2007). Malgré cette récente avancée, il est admis que ce sont les enzymes E2 et E3 qui permettent la spécificité de dégradation d'un substrat. Il existe ainsi une cinquantaine d'E2 chez l'homme qui semblent agir sur un spectre limité et spécifique de substrats mais dans de nombreux cas, plusieurs E2 peuvent ubiquitiner le même substrat. Chez l'homme, on estime à plus de 500 le nombre de E3. Ces enzymes peuvent

s'associer à différentes E2 pour la réaction d'ubiquitination, donnant ainsi un grand nombre de combinaisons expliquant la grande spécificité de ce processus de dégradation. (Semple, 2003 ; Hicke *et al.*, 2005 ; Nandi *et al.*, 2006). Certains cas de polyubiquitination nécessitent l'action d'une E4 qui facilite l'allongement de la chaîne d'ubiquitine (Koegl *et al.*, 1999). L'implication des E4 n'est pas claire, des études montrant qu'une de ces E4, HR23A serait capable de fixer une ubiquitine de la chaîne, et que cette fixation inhiberait la formation de la chaîne complète empêchant la dégradation du substrat associé (Chen *et al.*, 2001 ; Raasi et Pickart, 2003 ; Hoppe, 2005).

L'ubiquitine possède sept résidus Lys (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui peuvent tous être utilisés pour la formation de la chaîne de polyubiquitine ce qui résulte en une grande variété de topologie. La polyubiquitination impliquant la lysine 48 constitue le marqueur majoritaire d'exportation d'un substrat au protéasome entraînant sa dégradation (Pickart, 2000). Dans une moindre mesure le résidu K29 semble aussi pouvoir participer à cette exportation. A l'inverse la mono ou la polyubiquitination impliquant le résidu K63 semble liée à d'autres fonctions biologiques que la dégradation par le protéasome, comme la régulation du processus de réparation, le contrôle de la traduction ou l'activation de protéines kinase (Pickart, 2001 ; Weissman, 2001). L'implication récente des autres lysines de l'ubiquitine dans la formation de la chaîne a été mise en évidence par des analyses protéomiques mais leur rôle n'est pas encore compris, de même que la découverte de l'existence de conjugaison entre les résidus K29 et K33 de l'ubiquitine formant une structure en "Y" (Peng *et al.*, 2003).

IV.3 Le protéasome 26S

Le protéasome 26S est un complexe multi-protéique composé d'un cylindre central 20S qui constitue la sous-unité catalytique et de deux complexes régulateurs 19S (Figure 17). Le cylindre central 20S est constitué de quatre anneaux heptamériques, composé de sous unités α et β différentes les unes des autres chez les eucaryotes:

- Les deux anneaux extérieurs sont composés de sept sous unités α qui forment une barrière entre la chambre catalytique et le cytoplasme. Elles peuvent interagir avec différentes particules régulatrices et contrôlent l'entrée et la sortie des substrats.
- Les deux anneaux intérieurs sont composés de sept sous unités β qui forment la chambre renfermant l'activité protéolytique. En effet, certaines de ces sous-unités

possèdent une activité catalytique due au groupement hydroxyle de leur résidu N-terminal qui attaque les liaisons peptidiques du substrat (Seemuller *et al.*, 1995). On distingue trois activités protéolytiques majeures distinctes attribuées aux sous unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$: une activité "trypsin-like" qui clive après les acides aminés basiques, une activité "chymotrypsin-like" clivant après les résidus hydrophobes et une activité "postglutamyl peptide hydrolytic-like" clivant après les acides aminés basiques (Groll *et al.*, 1999). Récemment deux autres activités ont été mises en évidence: le clivage après les acides aminés branchés (BrAAP) et le clivage après les petits acides aminés neutres (SNAAP) (Nandi *et al.*, 2006).

Les peptides générés par la dégradation par le protéasome varient entre 3 et 25 acides aminés, la catalyse se poursuivant jusqu'à ce que la taille des peptides générés leur permette de s'extraire de la chambre catalytique.

Le complexe régulateur 19S (ou PA700) est constitué de 17 sous unités formant deux structures différentes. Ce complexe est lié à chaque extrémité du cylindre 20S et dénature le substrat, selon un mécanisme ATP-dépendant, lui permettant de pénétrer dans la chambre protéolytique du 20S. Neuf sous unités forment la base qui se juxtapose sur l'anneau extérieur du corps 20S tandis que les huit autres sous unités sont organisées en un couvercle au dessus de la base. Toutes ces unités possèdent des fonctions distinctes comme la déubiquitination des substrats ou la fixation des chaînes de polyubiquitines (Pickart et Cohen, 2004). La base contient deux sites UBD (Ubiquitin Binding Domain) d'accrochage des chaînes de polyubiquitines. Ces deux sous unités Rpn10/S5a et Rpt/S6' peuvent fixer la chaîne de polyubiquitine de type K48, à condition que cette chaîne soit suffisamment longue, favorisant la dénaturation et la déubiquitination du substrat (Deveraux *et al.*, 1994 ; Thrower *et al.*, 2000 ; Welchman *et al.*, 2005). Les autres sous unités possèdent une activité ATPasique qui permet la dénaturation du substrat. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP semble aussi participer à l'ouverture de la chambre catalytique pour faciliter le passage du substrat et à l'assemblage de la base avec le protéasome 20S. Le couvercle est responsable de la reconnaissance du substrat, de la déubiquitination (via la sous unité Rpn11) et de l'interaction avec les protéines notamment certaines E3 et les protéines possédant un domaine UBL responsable de l'activité déubiquitinase, essentielle pour la formation et la structure du complexe 19S (Pickart et Cohen, 2004 ; Tanaka *et al.*, 2004).

Le complexe 26S est le complexe qui a été le plus étudié ces dernières années et semble responsable de la majorité de la dégradation des protéines polyubiquitinées mais on

peut noter qu'il existe d'autres formes de protéasomes associant le cylindre central 20S avec différents adaptateurs.

IV.4 L'adressage des protéines polyubiquitinées au protéasome

De nombreux mécanismes existent pour adresser les protéines ubiquitinées au protéasome. La diversité de cet adressage reflète la multitude des substrats et des conditions cellulaires. Il est probable qu'une fraction des protéines à dégrader soit reconnue directement par le protéasome (Farras *et al.*, 2005).

L'adressage de certains substrats au protéasome est facilité par une classe de protéines nouvellement décrites, les enzymes E4. Ces protéines possèdent des domaines particuliers de liaison à l'ubiquitine nommés UBA (UBiquitin Associated) et des motifs UBL (UBiquitin Like) dont la structure tridimensionnelle est proche de l'ubiquitine. Les domaines UBA interagissent avec les chaînes de polyubiquitines et les motifs UBL sont capables de lier la sous unité Rpn1/S2 du complexe régulateur 19S du protéasome 26S (Wilkinson *et al.*, 2001 ; Verma *et al.*, 2004). Parmi ces protéines on retrouve les acteurs du NER HR23A et HR23B ainsi que Dsk2, Ddi1, VPC ou Shp1. Il est intéressant de noter que la fixation de ces protéines n'entraîne pas obligatoirement l'exportation du substrat vers le protéasome mais semble aussi pouvoir stabiliser certains substrats comme la protéine p53 ou le facteur XPC pour les facteurs HR23A et HR23B (Glockzin *et al.*, 2003 ; Ng *et al.*, 2003 ; Brignone *et al.*, 2004).

Le transport peut aussi être assuré par la protéine Cdc48 qui prend en charge les protéines mal conformées au niveau du réticulum endoplasmique), par des complexes composés d'enzymes E2 et E3 associées à des protéines adaptatrices (ex HSP70-CHIP associée à Ubc4 comme E2) ou par une association directe de l'ubiquitine ligase avec le protéasome (ex: Parkin) (Braun *et al.*, 2002 ; Sakata *et al.*, 2003 ; Hartmann-Petersen et Gordon, 2004).

La localisation du protéasome dans la cellule pourrait aussi jouer un rôle important dans l'accessibilité des substrats polyubiquitinés et leur dégradation. Des études ont montré que le protéasome est localisé aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau et peut s'associer avec des structures cytoplasmiques. Il semble s'associer avec des structures cytoplasmiques comme certains éléments du cytosquelette, le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique (Wojcik et DeMartino, 2003). Il existerait cependant des "centres protéolytiques" organisant la dégradation protéique, comme le centrosome (Badano *et al.*, 2005).

IV.5 Le modèle de p53: ubiquitination et implication dans le NER

La protéine p53 a été décrite pour la première fois en 1979 et initialement classée parmi les oncogènes, de par sa présence dans des sarcomes induits et des cellules transformées par certains virus (DeLeo *et al.*, 1979 ; Lane et Crawford, 1979 ; Linzer et Levine, 1979). En 1989, 10 ans après sa découverte, les données fonctionnelles et génétiques montrant la présence de mutations de sa séquence dans les cellules cancéreuses, la fonction de suppresseur de tumeurs de p53 fut reconnue (Baker *et al.*, 1989 ; Finlay *et al.*, 1989). Cette prise de conscience engendra de très nombreuses publications centrées autour de p53 (plus de 20 000 à ce jour) et la mise en évidence de nombreuses tumeurs associées aux mutations de cette protéine. Ainsi en 1992, p53 fut surnommée "la gardienne du génome" (Lane, 1992).

p53 est un facteur de transcription nucléaire qui affecte de nombreuses fonctions cellulaires incluant la transcription, la synthèse et la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose (Murray-Zmijewski *et al.*, 2008). Le blocage du cycle cellulaire, suite à un stress comme la présence de dommages sur l'ADN, est une des fonctions majeures de p53. Ce blocage survient notamment par l'induction de l'expression du gène *p21^{WAF1/CIP1}*, inhibiteur des cdk (cyclin-dépendant kinases), ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire à la fois à la transition G1/S et G2/M. Ce blocage G2/M du cycle cellulaire est aussi maintenu par l'induction d'autres gènes cibles de p53 comme *14-3-3 σ* , *GADD45* ou *Reprimo* (Vogelstein *et al.*, 2000 ; Meek, 2004). La protéine p53 est aussi impliquée dans le processus apoptotique par différentes voies: par la régulation de nombreuses cibles (dont *Bax*, *NOVA*, *PUMA*, *APAF1*), dans la voie apoptotique via la mitochondrie, ou par l'expression de récepteurs de mort comme *KILLER/DR5*, *FAS* et *PIDD* (el-Deiry, 1998 ; Vousden et Lu, 2002). p53 est aussi une protéine importante dans la régulation d'acteurs de la réparation comme *XPB*, *XPD*, *RPA*, *XPC*, *DDB2*, le complexe TFIIH ou encore *RAD51* et *MSH2* (May et May, 1999 ; Balint et Vousden, 2001 ; Bertrand *et al.*, 2004).

Dans des conditions normales, lorsque la cellule est intacte, la protéine p53 est maintenue dans un état inactif et bas. La présence de dommages de l'ADN conduit à la stabilisation de p53 via la voie de signalisation de réponse aux dommages qui implique les kinases détectrices (sensor) comme ATM et ATR et les kinases effectrices comme Chk1 et Chk2. Cette stabilisation de p53 conduit à la régulation de ses nombreux gènes cibles impliqués notamment dans le cycle cellulaire et le processus apoptotique (Ljungman et Lane, 2004 ; Meek, 2004). Le système de régulation de p53 est finement contrôlé à de nombreux niveaux. Ce mécanisme, l'un des plus importants dans le processus tumoral, reflète le rôle

complexe de cette protéine suppresseur de tumeurs. D'une part cette régulation peut intervenir au niveau transcriptionnel. En effet le promoteur de p53 contient un motif boîte E, CACGTG, permettant la fixation et l'induction transcriptionnelle de gènes de la super famille des b-HLH-LZ. Des travaux ont ainsi montré que les facteurs de transcription c-myc et USF étaient capables d'activer la transcription de p53 (Ronen *et al.*, 1991 ; Reisman *et al.*, 1993 ; Reisman et Rotter, 1993). D'autre part, et surtout, les modifications post-traductionnelles jouent un rôle prépondérant dans la régulation de p53. La protéine est en effet sujette à une variété de modifications post-traductionnelles incluant phosphorylation, acétylation, méthylation, sumoylation et ubiquitination qui ont toutes un impact sur l'activité de p53 (activation, stabilisation, dégradation) (Kruse et Gu, 2008). Parmi ces modifications, l'ubiquitination de p53 apparaît comme un mécanisme fondamental de contrôle de son niveau protéique. p53 peut être modifiée par nombreuses enzymes E3 ubiquitines-ligases incluant Pirh2, COP1, ARF binding protein, E6AP et MDM2 (Yang *et al.*, 2004 ; Brooks et Gu, 2006).

La protéine oncogène MDM2 (Mouse double Minute 2) est un régulateur clé de l'activité p53 et la plus étudiée des enzyme E3 ligase de p53. MDM2 est un membre de la famille des E3 ligases à doigts de zinc qui permet la fixation d'enzymes E2 entraînant l'ubiquitination directe du substrat. Dans la région N-terminale de MDM2, un site d'interaction permet la fixation de p53 et, par son activité E3 ligase, MDM2 entraîne l'ubiquitination de p53. Cette ubiquitination réprime l'activité de p53, à la fois en entraînant sa dégradation mais aussi par blocage de son activité transcriptionnelle (Coutts *et al.*, 2009). L'interaction p53-MDM2 n'est possible que dans des états de phosphorylation particuliers des deux protéines (Ashcroft *et al.*, 2000). De plus, *MDM2* est aussi un gène cible du facteur de transcription p53 (Wu *et al.*, 1993). Cette boucle de rétro-contrôle de l'expression de l'un de ses répresseurs E3 ligase permet une régulation subtile du niveau de p53 selon le contexte cellulaire.

Comme les autres modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation,...), l'état d'ubiquitination de p53 est important pour son activité. Des études montrent que des niveaux faibles de MDM2 entraînent une mono-ubiquitination de p53. Cet état est stable et semble constituer un signal d'exportation nucléaire de p53 permettant probablement ses fonctions cytoplasmiques ou mitochondriales. A l'inverse, la poly-ubiquitination de p53 constitue un signal d'exportation et de dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Coutts *et al.*, 2009). Récemment des travaux ont impliqué les protéines HR23 dans la régulation de l'activité p53 via leur rôle d'enzymes E4 dans le processus de dégradation. Le mécanisme est encore mal compris mais il semble que le niveau

protéique des homologues HR23, en particulier HR23A, influe sur la formation du complexe p53-protéasome. En effet, selon les études réalisées, il semblerait que la surexpression de HR23 résulte en une accumulation de p53 ubiquitiné tandis que la déplétion des protéines HR23 entraîne soit l'accumulation soit une accélération de la dégradation de p53 (Glockzin *et al.*, 2003 ; Brignone *et al.*, 2004 ; Kaur *et al.*, 2007). Ces récents résultats sont quelque peu contradictoires, mais il ressort de ces travaux l'importance des variations stoechiométriques du niveau des protéines HR23 dans la maintenance du niveau protéique de p53 par le mécanisme d'ubiquitination-protéasome, parallèlement à la boucle de régulation Mdm2/p53. De plus, la mise en évidence de protéines capables du processus de déubiquitination de p53 peut suggérer l'existence d'une fraction de p53 ubiquitinée, protégée de la dégradation par la présence de HR23, qui constituerait un réservoir de protéine disponible.

Cet exemple du contrôle du niveau de la protéine p53 illustre la complexité de la régulation protéique par le système ubiquitine-protéasome.

IV.6 L'ubiquitination dans le NER

De nombreuses données suggèrent un rôle de l'ubiquitination et de la dégradation protéique ubiquitine-protéasome dépendante dans les mécanismes de réparation de l'ADN et leur régulation. Ainsi, parmi les acteurs du NER, les protéines HR23A et B, DDB1 et 2 et CSA et B sont impliquées dans ce mécanisme de régulation protéique.

L'ubiquitination de la protéine RAD4/XPC par les protéines RAD23/HR23 mise en évidence à la fois chez la levure et les mammifères suite à la présence de dommages sur l'ADN, stabilise le complexe de reconnaissance des lésions. Ces mêmes protéines HR23 ont récemment été impliquées dans la régulation fine dépendante de MDM2 du niveau protéique de p53. Ce facteur de transcription p53 régule certains acteurs des systèmes de réparation mais est surtout responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en présence de dommages de l'ADN. Ce blocage est nécessaire car il permet aux mécanismes de réparation de restaurer l'intégrité du génome.

Un autre lien entre l'ubiquitination et le NER a été mis en évidence. Possédant une forte affinité pour l'ADN, le complexe DDB est capable de fixer les dommages de l'ADN de type CPD, augmentant la distorsion de l'ADN ce qui permet leur reconnaissance par le complexe XPC. Il a été montré que ces facteurs DDB1 et DDB2 pouvaient faire partie d'un complexe E3 ligase composé de la cullin4A, ROC1 et le signalosome COP9. Ce complexe est responsable de l'ubiquitination de substrats comme XPC et DDB2. A l'inverse de l'effet

stabilisateur sur XPC, la poly-ubiquitination de DDB2 abolit complètement sa capacité de liaison à l'ADN. Ces données suggèrent que l'ubiquitination de ces deux acteurs DDB2 et XPC serait un mécanisme de transfert de la lésion UV-induite du complexe DDB au complexe XPC (Sugasawa *et al.*, 2005 ; Sugasawa, 2006 ; Sugasawa, 2009).

Enfin, une étude montre que la protéine CSA peut former un complexe E3 ligase similaire composé de DDB1, la culine 4, Rbx1 et le signalosome COP9 (Groisman *et al.*, 2003). Ce complexe est responsable de la poly-ubiquitination UV-induite du facteur CSB qui conduit à sa dégradation par la protéasome. Même si la fonction précise de ce complexe E3 ligase contenant CSA est encore méconnue dans le TCR, l'ubiquitination de CSB établit un lien fonctionnel entre les facteurs CSA et CSB dans le complexe ARN polymérase II-CSA-CSB responsable du recrutement du TFIIH suite à l'arrêt de la polymérase sur une lésion UV-induite dans le TCR-NER (Groisman *et al.*, 2006).

Résultats

I – Contexte des travaux

La peau, première barrière de défense de l'organisme contre les agressions extérieures, est constamment soumise aux radiations UV d'origine solaire. Ce stress permanent induit de nombreuses lésions sur l'ADN génomique, principalement des dimères de pyrimidine (CPD et (6-4) PPs) qui peuvent contribuer à l'apparition d'un phénotype cancéreux. L'élimination de ces dommages, primordiale pour le maintien de l'intégrité de l'organisme, est assurée par les voies de réparation, notamment le NER, principal mécanisme de réparation responsable de l'élimination des lésions induites par les UV.

La réparation par excision de nucléotides est un mécanisme versatile, séquentiel et complexe qui existe des bactéries aux mammifères supérieurs. Des eucaryotes simples telle la levure aux eucaryotes complexes comme les mammifères, il existe une bonne conservation des acteurs et des étapes clés qui montre l'importance de cette voie de réparation dans l'évolution (Costa et al., 2003 ; Nospikel, 2009). Dans ce mécanisme, l'étape initiale de reconnaissance des dommages est cruciale car elle nécessite un système efficace permettant de distinguer les quelques bases endommagées, des bases intactes présentes en large excès. Chez les eucaryotes, et notamment les mammifères auxquels nous nous intéressons, cette étape clé diffère selon la localisation de la lésion. Les dimères de pyrimidine apparaissant sur les brins actifs des gènes transcrits sont reconnus par la sous voie TCR-NER tandis que le reste des dimères induits est reconnu par la sous voie GGR-NER. Seule la reconnaissance diffère selon la localisation des dommages, les étapes suivantes du NER sont identiques. De nombreux travaux ont permis d'identifier les enzymes du NER et l'enchaînement général des étapes du mécanisme chez les mammifères, et ces avancées soulèvent désormais de nouvelles interrogations. Parmi les points restant encore à éclaircir, se pose la question de la régulation du NER en réponse aux UV, et plus particulièrement des deux sous voies de reconnaissance. A l'instar de l'observation chez la levure de gènes régulés de manière transcriptionnelle suite à l'apparition de lésions sur l'ADN, existe-t-il chez les mammifères une régulation transcriptionnelle UV-induite comparable des gènes codant les acteurs des étapes initiales du NER?

La fonction du NER d'élimination des lésions UV-induites est parallèle au processus de pigmentation UV-induite. En effet l'induction par les UV de la mélanogénèse, permet une augmentation de synthèse de la mélanine qui joue un rôle de photoprotection en absorbant une partie des radiations, réduisant ainsi la quantité d'UV atteignant les cellules de la peau. Le

facteur de transcription USF-1 joue un rôle central dans ce mécanisme de pigmentation UV induite. Après activation par phosphorylation par la MAP Kinase p38 au niveau de la thréonine 153, suite à une irradiation UV, ce facteur active la transcription de gènes impliqués dans la mélanogénèse (Galibert *et al.*, 2001 ; Corre *et al.*, 2004 ; Corre *et al.*, 2006). Outre son rôle majeur dans la pigmentation UV-induite, USF-1 est aussi un régulateur, protéine clé de la réponse au stress (Corre et Galibert, 2005 ; Corre *et al.*, 2009).

Mes travaux de thèse, centrés sur la réponse aux UV, ont consisté à la mise en évidence d'une régulation transcriptionnelle d'acteurs du NER, impliqués dans les deux sous voies GGR et TCR de reconnaissance des lésions. Nous avons ainsi pu montrer que les produits des gènes HR23A et CSA sont régulés, *in vivo*, de manière transcriptionnelle suite à l'accumulation de courtes irradiations UV selon un mécanisme dépendant du facteur de transcription USF-1 (Baron *et al.*, soumis ; Baron *et al.*, en préparation).

La recherche de nouvelles cibles de facteurs de transcription comme USF-1 nécessite des études *in vivo* des conditions conduisant à la fixation du facteur sur sa cible, et *in vitro* de localisation du site de fixation du facteur de transcription. Nous avons ainsi adapté les protocoles existants de ChIP et d'EMSA pour la recherche de nouveaux gènes cibles d'USF-1 en réponse aux irradiations UV (Galibert et Baron, 2009, annexe 1).

1^{er} Article :

**Le gène *HR23A* est spécifiquement
régulé *in vivo* en réponse aux UV par le
facteur de transcription USF-1**

II - Le gène *HR23A* est spécifiquement régulé *in vivo* en réponse aux UV par le facteur de transcription USF-1

II.1 Introduction

La sous voie GGR du mécanisme du NER est initiée par la reconnaissance des lésions UV-induites par le complexe XPC-HR23-centrine 2. Ce complexe reconnaît la distorsion de la double hélice qui révèle la présence d'un dimère de pyrimidine, CPD ou (6-4) PP. La protéine XPC qui possède une forte affinité pour l'ADN est responsable de la fixation du brin intact complémentaire du brin portant la lésion, tandis que la présence des protéines HR23A ou B et la centrine 2 permettent une stabilisation du complexe de reconnaissance. La fixation de la lésion par le complexe XPC permet le recrutement du complexe TFIIH et des facteurs associés (RPA, XPA) conduisant à la poursuite du mécanisme.

Chez les mammifères, deux membres homologues de la protéine RAD23 chez la levure composent la famille HR23: HR23A et HR23B. Chez l'homme, ces deux protéines de 40 kDa et 58 kDa sont codées par deux gènes distincts situés respectivement en 19p13.2 et 9q31.2. Elles présentent une grande homologie entre elles et avec la protéine RAD23 de levure, notamment au niveau de leurs quatre domaines d'activités, un domaine UBL, deux domaines UBA et un domaine XPC-bd. Cette grande homologie des deux membres HR23A et HR23B est en accord avec leur redondance fonctionnelle décrite (Dantuma *et al.*, 2009). Dans le NER, la majorité de la protéine XPC est retrouvée associée à la protéine HR23B bien que les deux membres HR23A et B soient interchangeable dans ce complexe et permettent la stabilisation de la protéine XPC (Sugasawa *et al.*, 1997 ; Okuda *et al.*, 2004). Par l'existence de leurs domaines UBA et UBL, les protéines HR23A et B sont aussi des protéines impliquées dans le processus d'ubiquitination. Grâce à leur domaine UBA de liaison à l'ubiquitine, elles peuvent fixer un substrat polyubiquitiné et faciliter son exportation vers le protéasome ou au contraire le protéger de la dégradation, comme c'est le cas pour les protéines XPC ou p53 (Glockzin *et al.*, 2003 ; Brignone *et al.*, 2004). Dans le cas de la protéine p53, ce mécanisme de protection et de stabilisation est sensible aux variations stoechiométriques des protéines HR23 ce qui montre l'importance de la régulation de leur niveau protéique. L'importance des protéines HR23 est illustrée par le phénotype létal des souris double KO HR23A/B (Ng *et al.*, 2003). Chez la levure, des travaux ont montré l'activation transcriptionnelle du gène RAD23 en réponse aux irradiations UV (Madura et

Prakash, 1990). L'étude chez la souris des gènes *HR23A* et *B* n'a pas permis de reproduire cette induction transcriptionnelle (van der Spek *et al.*, 1996). Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude des variations transcriptionnelles des deux membres *HR23A* et *B* dans des conditions d'irradiations différentes.

La quantification par RT-QPCR du niveau d'expression des gènes *HR23A* et *HR23B* en réponse à la succession de courtes irradiation d'UV répétées toutes les 15 minutes pendant 1 à 2h, a permis de mettre en évidence une rapide induction transcriptionnelle (dès 1h après le protocole d'irradiation), dose/temps et nombre d'expositions dépendants, du gène *HR23A* dans des cultures cellulaires de kératinocytes humains et murins. Cette induction transcriptionnelle liée à la succession d'exposition aux UV est suivie d'une augmentation d'un facteur quatre du niveau protéique de *HR23A*, mise en évidence par Western Blot. Le lien entre l'augmentation protéique et l'activation transcriptionnelle est confirmée par l'utilisation d' α -amanitin, inhibiteur de la transcription. Parallèlement à l'activation transcriptionnelle de *HR23A*, le transcrite de l'homologue *HR23B* n'est pas induit et son niveau protéique diminue progressivement.

L'étude *in silico* du promoteur du gène *HR23A* révèle la présence de deux éléments régulateurs E boxes conservés et absents dans le promoteur du gène *HR23B*. Par des expériences *in vivo* de CHIP, nous mettons en évidence la fixation basale et son augmentation UV-induite des facteurs de transcription USF-1 et 2 sur le promoteur du gène *HR23A*. La fixation des protéines USF sur les motifs boîtes E du promoteur proximal du gène *HR23A* est confirmée *in vitro* par EMSA. La régulation transcriptionnelle UV-induite et USF-1 dépendante est vérifiée par transfection transitoire de constructions plasmidiques comportant les motifs boîtes E sauvages ou mutés en condition d'irradiation UV ou de surexpression du facteur USF-1.

La présence d'un motif boîte GC conservé entre les deux séquences promotrices des gènes *HR23* nous a conduit à examiner le rôle des facteurs de transcription SP1 et SP3 dans la régulation transcriptionnelle des gènes *HR23A* et *B*. Par des expériences de CHIP et d'EMSA, nous montrons que les facteurs SP1 et SP3 sont capables de fixer les promoteurs des gènes *HR23A* et *B* au niveau de cet élément régulateur mais les expériences de dosage luciférase montrent que la présence de ce motif n'est pas responsable de l'induction transcriptionnelle du gène *HR23A* en réponse aux UV.

Enfin l'utilisation de lignées de souris KO pour le gène USF-1 confirme l'implication directe du facteur de transcription USF-1 dans la régulation UV-induite du gène *HR23A* et l'absence d'induction de l'homologue *HR23B*.

L'ensemble des résultats obtenus décrit une régulation différentielle des deux membres HR23A et B dont les fonctions sont hautement redondantes et la présence interchangeable dans les processus du NER ou de la régulation protéique par le système ubiquitine-protéasome. Cette régulation précoce de HR23A est indépendante de la présence de p53 et est le premier cas d'induction dépendante des UV d'un acteur du NER dans une fenêtre temporelle compatible avec sa fonction dans la stabilisation du complexe de reconnaissance des lésions, et cette induction pourrait pallier la perte de la protéine homologue HR23B. Malgré les redondances des fonctions des protéines HR23, cette régulation différentielle suppose une spécificité d'action selon le contexte cellulaire. Enfin cette régulation transcriptionnelle est dépendante d'USF-1, impliquant ce facteur clé de la réponse au stress dans la régulation du mécanisme du NER.

II.2 Résultats

THE *HR23A*, BUT NOT THE *HR23B*, DNA-REPAIR GENE IS SPECIFICALLY REGULATED *IN VIVO* IN RESPONSE TO UV IN A USF-1-DEPENDENT MANNER

Yorann Baron¹, Sébastien Corre¹, Nicolas Mouchet^{1,2}, Sophie Vaulont^{3,4}, Sharon Prince⁵, and Marie-Dominique Galibert^{1*}

From The CNRS-UMR6061 Genetic and Development Institute of Rennes, RTO Team¹, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS, Rennes France, The Proclaim Company², 35760 Saint-Gregoire France, Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France³, Inserm, U567, Paris, France⁴, The Department of Human Biology⁵, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, South Africa.

Running head: *HR23A* UV-induced expression regulation

* To whom correspondence should be addressed: Marie-Dominique GALIBERT, PD Ph.D, CNRS-UMR6061 Institut de Génétique et Développement de Rennes, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS, 2 av du P^r Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France.
Fax : 0033 223 234 607; E-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Maintenance of genome integrity is required to avoid oncogenic transformation in response to genotoxic stress. Distinct DNA-repair processes are responsible for the elimination of specific DNA damage. They include Nucleotide Excision Repair (NER), the process mostly involved in the recognition and removal of UV-mediated DNA-damages with the XPC-HR23 complex dedicated to the critical recognition step. In mammals, the *HR23* family consists of two related members, *HR23A* and *HR23B*, while in yeast only one (*RAD23*) is present. *HR23* proteins stabilize XPC and are engaged in proteasome-mediated protein degradation. The *HR23* ubiquitination process appears to be very sensitive to cell stress conditions and to stoichiometric protein variations associated with DNA repair. Thus, because the regulation of *HR23A* and *B* expression is poorly understood, we explored their regulation in response to repetitive UV-DNA-damage stimulations. Using a combination of *in vivo* assays and a genetic approach involving USF-1 knock-out mice, we show for the first time that *HR23A* and *B* are differentially regulated in response to

cumulative UV-irradiation. *HR23A*, but not *HR23B*, gene expression, which is up-regulated in response to UV, is dependent on the presence of conserved *cis*-regulatory elements (E-box motifs) and the USF-1 transcription factor.

INTRODUCTION

The skin is the first body barrier that is exposed to various physical, chemical and biological hazards that can alter DNA structure. To maintain the integrity of the genome, cells are equipped with specific defense machinery, which targets different types of alteration of the DNA. Solar irradiation, including ultraviolet-B (UV-B) low wavelength rays that reach the epidermal cell layers, is responsible for the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in DNA (1). These sunlight-induced DNA damages are believed to be specifically and constantly repaired by the Nucleotide Excision Repair (NER) machinery, thereby preventing mutagenesis and genomic instability (2). Consequently, alteration of the DNA-repair machinery is associated with

cancer initiation and progression. The Xeroderma Pigmentosum (XP) inheritance syndrome is caused by mutations in genes encoding proteins involved in the NER defense machinery and is characterized by extreme cutaneous photosensitivity and increased frequency of skin cancer (3,4).

NER is one of the most versatile DNA repair systems and can eliminate a wide variety of DNA lesions, including photo-lesions, by detecting the structural distortions caused in DNA. NER can be divided into at least two sub-pathways depending on the localization of the distorted DNA: Global Genome Repair (GGR) and Transcription Coupled Repair (TCR). GGR can operate at any location in the genome, removing DNA lesions present in the non-coding part of the genome, silent genes and the non-transcribed strand of active genes. TCR is dedicated to removing DNA lesions that block RNA polymerase on the transcribed strand of active genes during transcription. The sequence of events implicated in both GGR and TCR DNA repair processes involves: DNA-recognition, DNA-unwinding, excision and repair synthesis. While GGR and TCR processes differ in the recognition of the DNA lesions, they share common processes and protein machinery for the rest of the steps (5).

The recognition of DNA lesions by the GGR machinery is dependent on two phenomena: distortion of the double helix structure and chemical modification of the DNA (6). The XPC-HR23 complex is responsible for this crucial damage-sensing step. XPC is a DNA-binding protein with strong affinity for damaged DNA (7-9); its interaction with HR23 proteins increases its physical stability and thereby its damage recognition activity. Preferential binding of XPC-HR23 complexes to specific lesions (6-4 photoproducts versus cyclobutane pyrimidine dimer) has thus been described (10).

In mammals, the HR23 family is composed of two members, HR23A and HR23B both orthologs of RAD23 in *Sacharomyces cerevisiae*. HR23A and B share 60% identity overall and 75 to 97 % identity in the functional domains; the identity with RAD23 functional domains is 47% (11). HR23A and HR23B proteins can both interact with XPC, at least *in*

vitro; *in vivo*, however, the GGR DNA-recognition complex is composed almost entirely of XPC tightly linked to HR23B. Studies with *HR23A/B* knock-out mice show also that cells lacking either mHR23A or mHR23B are still NER proficient and thus implicate both proteins in DNA repair (12,13). While the domain highly conserved between HR23A and B results in redundant functions in the GGR process by interacting and stabilizing XPC within the pre-incision complex; the two proteins presumably differ by other and specific cellular functions (14-16).

Other structural domains in the mammalian HR23-proteins imply a link to the ubiquitin-proteasome pathway and free HR23A and B proteins can be separated from the XPC-HR23B complex by chromatography, (17,18). Thus, like other proteins involved in DNA repair processes, the roles of HR23 proteins are not restricted to the damage sensing step. HR23A and B, like RAD23 contain one N-terminal conserved ubiquitin-like domain (Ubl), allowing interaction with the proteasome, and two conserved ubiquitin-associated (UBA) domains that bind to polyubiquitin-chains (19-21) Ubl/UBA-containing proteins can act as bridging proteins between polyubiquitinated proteins and the 26S proteasome (22). The UBA domain can also interfere with the ubiquitinylation of proteins, inhibiting chain assembly (23,24). HR23A and B proteins participate in regulating the abundance and stability of proteins involved in NER (XPC), as well as of the tumor suppressor gene p53 (25,26). The HR23 ubiquitination process appears to be very sensitive to cell stress conditions and to stoichiometric protein variations associated with DNA repair; this underlines the importance of protein level regulation (27).

In this context, we have investigated the regulation of *HR23A* and *B* gene expression in response to repetitive UV-DNA-damage. We report, for the first time, distinct gene expression profiles for *HR23A* and *HR23B*. Furthermore, our data show that *HR23A* is transcribed *in vivo* in a UV-dependent manner and we reveal the precise mechanism using a genetic approach.

MATERIALS AND METHODS

Cell and skin biopsies culture

HaCaT (human keratinocytes) and XB2 (mouse keratinocytes) cell lines were maintained in DMEM (Cat N°41966-029, Gibco BRL, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Sigma) and 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Invitrogen) at 37°C in 5% and 10% CO₂ atmospheres, respectively.

Skin biopsies were recovered from WT and USF-1 knockout mice (28) backs (0.8 cm Ø) and maintained in culture for up to 24 hours in RPMI (Cat N° 21875-034, Gibco BRL, Invitrogen) supplemented with 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

UV irradiation

DNA damage was generated with specific ultraviolet bulbs (UVC 254nm), which cause 6-4PP at high frequency (1), with the Stratelinker apparatus (Stratagene) as previously describes (29). The day before induction, cells were plated at 50-70% confluence, depending on their doubling time, in 10 cm Petri dishes. Twelve to twenty-four hours later, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 2% FBS and 1% antibiotics. The following day, cells were UVC irradiated every 15 min for 1 or 2 hours (4x or 8x 10J/m² of UVC). UVC pulse set at 10J/m² lasted 3 seconds. The medium was completely removed immediately before and replaced immediately after irradiation. At the time point indicated, cells were washed twice in cold PBS, harvested by scraping, centrifuged and resuspended in appropriate buffer. For transcription inhibition experiments, cells were pre-treated with α -amanitin (5 μ g/ml; Sigma) 30 min prior to UV irradiation.

Mouse skin biopsies were irradiated with four successive pulses of 20 or 50 J/m² UVC, recovered at the indicated time points by placing directly the skin biopsy in RNA later buffer (Qiagen) and stored at -20°C for subsequent RNA extraction.

Gene expression analysis

Harvested cells were lysed in RA1 buffer and total RNA was extracted using a Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was quantified using the Nanodrop device (Nanodrop Technology). For skin biopsies, a Trizol/chloroform purification step was added to the protocol to eliminate a large amount of protein before the use of the Nucleospin RNA II kit. cDNA was obtained from 1 μ g of total RNA by reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions. Gene expression was analyzed by RT-qPCR in sealed 384-well microtiter plates using the SYBR Green TM PCR Master Mix (Applied Biosystem) with the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The relative amounts of transcripts were determined using the delta Ct method. The mRNA amounts at each time point following stimulation are expressed as fold increases relative to non-irradiated cells and normalized to house-keeping genes (human *GAPDH* and mouse *HPRT*). Each experiment was carried out at least twice and each time point in triplicate.

Forward (F) and Reverse (R) primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) or primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) and have previously been tested for their efficacy (data not shown):

mHPRT-F, 5'-tctcctcagaccgctttt-3';
mHPRT-R, 5'-aacctggtcatcatcgctaa-3';
mHR23A-F, 5'-gaagacgcagctccacatta-3';
mHR23A-R, 5'-tggacatgatctcagtcagca-3';
mHR23B-F, 5'-atgcaggtcacctgaaga-3';
mHR23B-R, 5'-tctcttcaatgccttaccg-3';
mIL6-F, 5'-tgaggaggcttaattacacatgttct-3';
mIL6-R, 5'-gcatcatcgttggtcacaatca-3';
hGAPDH-F, 5'-accactcctccaccttga-3';
hGAPDH-R, 5'-cataccaggaatgagcttgacaa-3';
hHR23A-F, 5'-ccaggagaacctcagcttt-3';
hHR23A-R, 5'-ggctcgttcagcatctgg-3';
hHR23B-F, 5'-ccagttcaacaacctgaca-3';
hHR23B-R, 5'-cagcctgactttctctatcca-3'

Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

Gel electrophoresis DNA-binding assays with crude nuclear extracts from HaCaT and 501-MEL cells were performed as previously described (30,31). Briefly, double-stranded oligonucleotides were labeled with T4 polynucleotides kinase in the presence of P³²- γ ATP (3000 Ci/mmol) and purified in columns (Mini Quick Spin Oligo Columns, Roche Diagnostic) according to the manufacturer's instructions. EMSA reactions were performed at 4°C with 2-4 μ g of nuclear protein extracts and 0.03 pmol of P³²-end-labeled probe in binding buffer (25mM Hepes, 150mM KCl, 10% Glycerol, 10mM DTT, 1 μ g of poly(dIdC), 1 μ g salmon sperm DNA). After 20 min of incubation, samples were loaded onto a low ionic strength 6% polyacrylamide gel (29:1 cross-linking ratio) containing Tris Borate Na₂ EDTA buffer pH 8.3.

Supershift and competition assays were performed by adding antibodies (0.2 μ g) or cold competitor probes (concentration range: 1X to 100X), prior to incubation with P³²-labeled probe. Radioactive bands were quantified with a STORM 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics). (The sequences of probes used for screening the HR23A promoter are available on request).

Chromatin Immunoprecipitation Assay (ChIP)

ChIP assays, using 15-20.10⁶ HaCaT or 501-MEL human cells, were performed as previously described (32,33), with specific adaptations. Briefly, cells were grown to 70-80% confluence in medium supplemented with 5% FCS and UV irradiated (4x 10J/m², each for 15 min) or not for baseline controls. The cells were cross-linked (1.5% formaldehyde for 15 min at RT and quenched with 0.125M glycine for 15 min at RT), washed twice and collected in 1ml of cold PBS. Cells were lysed by sequential pipetting and centrifugation for 5 min at 2,000g at 4 °C in PBS, 1 ml Buffer A (10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6.5) and 0.25% Triton X-100) and 1 ml Buffer B (1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6.5) and 200 mM NaCl); the samples were then sonicated three times for 15

seconds at power 3 and 50% output (Sonifier Cell Disruptor, Branson) in 1ml of lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB (Sigma)). The samples were centrifuged and a 100 μ l aliquot of each supernatant was used as inputs; the remainder of the sample was diluted 2.5-fold in IP buffer (2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) and 0.5% Triton X-100). This fraction was pre-cleared by incubation for 3 h at 4 °C with 2 μ g sheared salmon sperm DNA, and 100 μ l of a 50% protein A-Sepharose bead (Sigma) slurry, then subjected to immunoprecipitation overnight with 3 μ g of the appropriate antibody. These samples were again incubated for 3 h at 4 °C with 2 μ g of sheared salmon sperm DNA and 50 μ l of protein A-Sepharose bead slurry and the precipitates recovered. The precipitates were washed several times, and the complexes were removed from the beads, cross-linking reversed and the DNA purified using a Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel).

The primers used for PCR and qPCR analyses spanned *HR23A* and *HR23B* proximal promoter regions and the *HR23A* distal region (3Kb from the Ebox target site) as a non-specific region. End-point PCR was performed in semi-quantitative conditions for ChIP (30 amplification cycles). For qPCR analysis, fold enrichment was determined by the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method: Fold enrichment = 2^{-(Δ Ct1 - Δ Ct2)}, where Δ Ct = (Ct target sequence - Ct non specific region), Δ Ct1 is the specific ChIP and Δ Ct2 the control ChIP.

Primers used:

HR23A-prom-F 5'-aaaggccaaggaggaggagt-3'
HR23A-prom-R 5'-cgggatcctcacacaacat-3'
HR23B-prom-F 5'-agagtaaggcgactcggaga-3'
HR23B-prom-R 5'-acacctcgggtagaactgt-3'
HR23A-Distal-F 5'-tgggtgatagcgagactctg-3'
HR23A-Distal-R 5'-gaactgtcttgggcacagaa-3'

Plasmid constructs

The -744/+73 *HR23A* promoter region was obtained by PCR and inserted into the luciferase reporter plasmid pGL3-basic (Promega). A shorter construct (-185/+73) was generated from this longer one by digestion. Eboxes (CACGTG => GAATTC) and the GC box (CCCCGCC => CCCAGAAC) were mutated using a QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

(Stratagene) according to the manufacturer's instructions with specific oligonucleotides (all plasmids were sequenced, and the sequences are available on request).

Luciferase reporter analysis

We used the same protocol to study *HR23A* promoter regulation in HEK and XB2 cells. Cells were plated in 12-wells plates in medium supplemented with 10% SVF without antibiotics at 60-70% confluence and maintained for 12h. The cells were co-transfected with pGL3b-*HR23A* reporter vector and pCMV (empty, USF1 or USF2) as previously described (29). Transfection mixes including up to 1 μ g of plasmid DNA were prepared in Optimum medium (Invitrogen) and incubated with cells for 3h with Lipofectamin 2000 (Invitrogen) for transfection according to the manufacturer's instructions. The medium was then replaced with fresh medium supplemented with 10% SVF and 1% antibiotics, and the cells were maintained in culture. UVC irradiation as appropriate was performed as previously described. Up to 48h post-transfection and 6h after UV treatment, harvested cells were lysed passively and Luciferase activity was quantified in a Centro LB 960 Microplate Luminometer (Berthold) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Western blot analysis

Harvested cells were immediately lysed by incubation for 30 min in ice-cold RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA, protease and phosphatase inhibitors), and centrifuged (13000 g - 4°C) for 15 min. Equal amounts of protein lysates were denatured in Laemmli buffer for 5 min at 95°C and resolved by 15% SDS-PAGE. Membranes were probed with appropriate antibodies and signals detected using the Odyssey Infrared Imaging System were quantified (LI-COR Bioscience).

Antibodies

Anti USF1 (C:20), USF2 (N-18), Sp1 (PEP 2), Sp3 (D-20), TBX-2 (C-17), *HR23B* (P-18), HSC70 (B-6) were purchased from Santa Cruz.

Anti *HR23A* (ARP42211) was purchased from Aviva.

RESULTS

HR23A transcription is induced by UV in human and mouse keratinocytes

To elucidate the roles of *HR23A* and *B*, we explored the effects of UV-rays on the expression of the *HR23A* and *B* genes. To this end we irradiated cultured keratinocyte (HaCaT) and melanoma cells (501-MEL) with short wavelength UVC light (254 nm), known to generate direct DNA damages that are preferentially recognized by the XPC-*HR23* complex (1,34). Also, rather than irradiating cultured cells with a single pulse, repeated low UVC doses were delivered with respect to cell viability, in the analyzed time. Briefly, HaCaT were irradiated with 10 J/m² between two and eight times at 15-minute intervals and collected 15 minutes after the last UVC pulse (Fig. 1A). Each UVC pulse lasted 3 seconds. This treatment did not affect the abundance of the *HR23B* transcript. By contrast, it caused a significant increase (validated by statistical analysis on at least three independent experiments) of the *HR23A* mRNA (1.5-fold after eight 10 J/m² UVC pulses; Fig. 1B). Comparable results were obtained with UVC doses of 5 and 20 J/m² in a dose dependent manner and also with 501-MEL cells (data not shown). Next, we investigated the time course of production of these two transcripts by harvesting cells at indicated times, over 8 hours, after eight 10J/m² UVC pulses at 15 min intervals (Fig. 1C). *HR23B* mRNA levels remained unchanged and *HR23A* mRNA increased significantly by 1.5-fold after 4h (Fig. 1D). These results were reproducible (at least three independent experiments) and comparable results were obtained with the UVC doses of 20 J/m², and when both HaCaT and 501-MEL cell lines were used (data not shown). Similar results were obtained with the mouse keratinocyte-derived cell line XB2: mouse *HR23A* mRNA peaked with a 2-fold increase 7 hours after eight UVC hits (Fig. 1E). To determine if this increase in *HR23A* mRNA levels led to an

increase in HR23A protein, western blot analysis using antibodies directed specifically towards HR23A or HR23B proteins were performed. Protein preparations were from the same experiments in which RNA was analysed and therefore HR23A and B protein levels could be directly compared to the corresponding mRNA profiles (Fig. 1E-F). The HR23A protein level increased progressively reaching a plateau of 4-fold increase 6 hours after the eight UVC pulses (Fig. 1G), which corresponds well with increased levels of the mRNA. This increase in HR23A protein levels was validated by statistical analysis on four independent experiments and was abolished when cells were pre-treated with α -amanitin an agent that disrupts transcription, confirming that the increase in HR23A mRNA was responsible for the increase in HR23A protein levels. Finally, the HR23B protein levels decreased over time, although no change was detected for the mRNA (Fig. 1E-F). The reason for this is at this stage unclear.

USF family members bind the HR23A proximal promoter *in vivo* and *in vitro*

UV-induced transcription is a tightly regulated process that involves both *cis* and *trans* UV-responsive elements. To identify such regulators we performed *in silico* analysis of the human HR23A proximal promoter. This study revealed that the human HR23A promoter contains two E-box motifs upstream from the Transcription Start Site (TSS) at -154 and -37, which are conserved in human, mouse and dog, whereas there was no E-box in the HR23B promoter (Fig. 2A). The Upstream Stimulating Factor-1 (USF-1) transcription factor has been shown to be a key mediator of UV-regulated gene expression by interacting with its cognate E-box *cis*-regulatory element (CACGTG) (35), which raised the interesting possibility that HR23A may be a USF-1 target gene. To test this hypothesis, we performed *in vivo* binding assays to determine if USF transcription factors could interact with the HR23A proximal promoter. It is important to note that USF-1 binds to E-box motifs as homodimers or heterodimers with its related partner USF-2. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were therefore performed using antibodies specific

for either USF-1 or USF-2. DNA recovered from the HaCaT cell line was amplified by PCR using primers spanning either the proximal promoters or the distal control regions (-3Kb upstream from the TSS) of the HR23A and HR23B genes (Fig. 2B). Results show specific amplification products corresponding to the binding of USF-1 and USF-2 factors to only the HR23A proximal promoter (Fig. 2B). No PCR product was observed for the distal region of the HR23A or the proximal HR23B promoter, or with the non-specific IgG antibody. Similar results were obtained with the 501-MEL cell line (data not shown).

We next investigated whether USF-1 and USF-2 also interact with the HR23A proximal promoter *in vivo* following UV-irradiation ($8 \times 10 \text{ J/m}^2$). ChIP assays were performed with UV-irradiated and non-irradiated HaCaT cells over a four-hour time course (Fig. 2C). Specific amplification products corresponding to the binding of USF-1 to the HR23A proximal promoters were detected, with a 3-fold enrichment compared to non-irradiated cells, 30min after the last UV-pulse. Results show that binding of USF-1 to HR23A was maximal after 1 hour and decreased progressively returning to basal level 4 hours after UV-irradiation. The results for USF-2 were similar although the fold enrichment was only 2.5, 30 min after UV-irradiation, with an immediate decrease. Again, comparable results were obtained with 501-MEL cell line (data not shown).

To characterize the binding motifs and requirements for USF binding to the HR23A proximal promoter, we used *in vitro* assays focusing on conserved E-box motifs also present in the ChIP amplified products. Two probes were designed spanning each E-box, located at -154 and -37 upstream from the TSS. Using HaCaT crude nuclear extract, *in vitro* binding assays revealed specific DNA-protein complexes for both probes (Fig. 2D). These complexes were competed efficiently by homologous wild type probe (cold probe) and super-shifted by antibodies against either USF-1 or USF-2 but not by non-specific antibody (IgG) (Fig. 3D). Addition of USF-1 and USF-2 antibodies together totally super-shifted the DNA-protein complex. No DNA-protein

complex was formed with probes carrying mutated E-box sequences. Competition assays between the two E-box probes did not reveal any preferential binding site for the USF factors (data not shown). Taken together these results suggest that USF-1 and USF-2 form protein complexes at both E-boxes in the *HR23A* proximal promoter and that *HR23A* is a possible USF target.

SP3 binds the GC consensus box in the *HR23A* proximal promoter

To identify additional UV-induced regulatory elements possibly involved in the *HR23A* UV-response, we performed further *in silico* analysis of the *HR23A* proximal promoter. The architecture of the *HR23A* promoter conforms to that of the TATA-less promoter family and contains, in addition to the previously identified E-box sites, two conserved GC-rich regions at positions -131 and -18 from the TSS (Fig. 2A). In TATA-less promoters, the pre-initiation complex loads onto a pyrimidine-rich initiator (Inr) element (consensus YYA11NT/AYY) near the start site to drive transcription (36). USF-1 can interact with such elements so we performed an *in vitro* screen to identify additional protein-DNA complexes. We designed eight overlapping probes of 30 to 50 bp in length covering the upstream region and the TSS of the human *HR23A* promoter (-175 / +70) (Fig. 3A). EMSA experiments using HaCaT crude nuclear extracts revealed that only the probe containing the -131 GC-box (probe N°3, CCCC GCCC) formed protein-DNA complexes and indeed was able to form two complexes. As expected, no shift was observed with the E-box mutated probes (N°2 and 5 used previously) (Fig. 3D). Additional EMSA were performed to characterize the two complexes obtained with the probe spanning the -131 GC-box. It was possible that they could be due to binding of SP proteins (37). Competition assays, using increased dose of cold homologous probe competed efficiently for binding as both complexes decreased in a dose dependent manner (Fig. 3B). Furthermore, no binding was observed when the -131 GC-box core sequence was mutated (CCCC GCCC to CCCAGAAC). Finally, the two specific DNA-protein complexes were totally absent in the

presence of a combination of anti-SP1 and SP3 antibodies. On its own, the SP1 antibody had very little effect and the SP3 antibody inhibited the formation of the faster migrating specific complex more strongly. The control antibodies (anti-USF-1 and anti-Tbx2) did not affect the SP-DNA complexes (Fig. 3B).

To investigate binding of SP1 and SP3 to the *HR23A* promoter *in vivo*, we performed ChIP experiments using UV-treated and untreated human HaCaT cells. Using untreated HaCaT cells and under the experimental Chip assay conditions used, only SP3 was able to bind the *HR23A* proximal promoter *in vivo* (Fig. 3C) and no binding was observed for SP1 (data not shown). Also, investigating the binding of SP3, after UV treatment revealed that the level of loading of SP3 on the *HR23A* promoter *in vivo* was not modified following UV-irradiation (Fig. 3D). Interestingly, the SP3 binding profile obtained for *HR23A* was also observed for the *HR23B* proximal promoter that shares a homologous -131 GC box (Fig. 3C-D).

***In vitro* transcriptional regulation of *HR23A* gene by USF factors in response to UV**

To determine whether the E-box motifs in the *HR23A* promoters is relevant for regulation of this gene in response to UV irradiation, transient transfection experiments were performed in the mouse XB2 keratinocyte cells because they were more efficiently transfected than the human HaCaT keratinocyte cells. Comparison of the basal activity of two *HR23A* promoter constructs (Long: -544/+73; short: -186/+73) cloned upstream of the luciferase reporter in pGL3 plasmids revealed the minimum region required for basal transcription (Fig. 4A). The short and long versions of the *HR23A* promoter had comparable basal luciferase activity and both were equally activated in the presence of recombinant USF-1 or USF-2 proteins (Fig. 4B). Therefore, we used the short version for the following *in vitro* transcriptional assays. Increasing the amounts of USF-1 or USF-2 expression vectors led to significant and dose-dependent increases of *HR23A*-luciferase activity (Fig. 4C). Comparable results were obtained for both *HR23A* constructs when the HEK-293 cell line was used (data not shown).

To determine whether the -186/+73

HR23A promoter is UV responsive and whether this responsiveness is mediated by USF-1, cells were transfected with WT or E-box-mutated *HR23A* promoter reporters and exposed to UV irradiation. The results (Fig. 4D-E) showed that *HR23A* promoter activity only increased slightly following UV-irradiation but was significantly enhanced when cotransfected with the USF-1 expressing vector. Interestingly, when the two E-box motifs were mutated it had a drastic impact, with a 4-fold reduction, on the basal *HR23A*-luciferase activity. Importantly, mutation of the *HR23A* E-box motifs abrogated the USF-1 mediated UV-response. Furthermore, mutation of the -131 GC-rich motif did not affect *HR23A* basal activity and was UV inducible in the presence of recombinant USF-1 protein (Fig. 4E). The above results show that the -186/+73 *HR23A* promoter is UV-inducible in a USF-1 and E-box-dependent fashion.

UV-induced *HR23A* mRNA is abolished in USF-1 knock out mice

To investigate the relevance of the regulation of *HR23A* by USF in response to UV *in vivo* we used a genetic approach with USF-1 knock out (KO) mice and their wild-type (WT) littermate (38). Skin punch biopsies prepared from WT and USF-1 KO mice were cultured for 12 hours and subjected to successive UVC doses ($4 \times 20 \text{ J/m}^2$ or $4 \times 50 \text{ J/m}^2$). The *HR23B* mRNA level remained unchanged in WT skin biopsies whereas the *HR23A* mRNA level increased 3h after the irradiation program. Furthermore, *HR23A* levels increased in a dose-dependent manner with a 1.5 and 2.5 fold increases for 20 J/m^2 and 50 J/m^2 respectively (Fig. 5A). These results were consistent with the ones obtained with cultured cells (Fig. 1). Because the 50 J/m^2 gave the most significant increase, this dose was used for the USF-1 KO cultured skin biopsies and the results obtained show that *HR23A* gene expression was not induced by UVC in cultured USF-1 KO skin explants. As a control we included a UV-regulated gene (*IL6*), which is independent of USF-1 and that was indeed induced under our conditions (Fig. 5B). Interestingly, *HR23A* and *B* mRNA basal levels were similar in WT and USF-1 KO mice. Taken together these results suggest that although USF-1 is responsible for *HR23A* UV-induced

expression, USF-1 is not involved in the basal transcription of *HR23A* or that its related partner, USF-2, may substitute for USF-1 in its absence.

DISCUSSION

Genome evolution and maintenance are defined processes that occur in response to environmental cues and cell requirements. Gene duplication is believed to allow cells to adapt to particular needs and although duplicated genes share common functions, in many cases they are believed to have evolved for differing roles. The functions of yeast *Rad23* are fulfilled in mammals by two related genes *HR23A* and *HR23B* which share crucial functions in the damage-sensing step of GG-NER and in proteasome substrate recognition. Very little is however known about their specific transcriptional regulation. We therefore investigated the transcription of *HR23A* and *B* genes in response to UV-irradiation. Using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays and a genetic approach with USF-1 knock-out mice, we showed that *HR23A* mRNA abundance is regulated following UV-irradiation, and that this is dependent on USF-1. Furthermore we show that under the same experimental conditions, *HR23B* mRNA levels were unaffected.

Consistent with results reported for yeast *RAD23* (39), we show that the level of *HR23A* mRNA is tightly regulated in a time- and dose-dependent manner, increasing gradually following the UV treatment. Our protocol of repeated UV-pulses of 3 seconds each separated by short resting periods (15 min) was effective, leading to significant and reproducible increases of the *HR23A* mRNA level. No effect was observed with a single high dose, as previously shown (11), suggesting that cumulative low doses, mimicking physiological irradiation flux, are required to induce a cell response. Experimental UV-programs and kinetic inductions are slightly different for *RAD23* and *HR23A* responses, revealing differences in the UV-regulatory pathways between yeast and mammals. Our results would however, suggest that UV-induced functions

have been conserved through evolution and are restricted to one member of the *HR23* family.

The current study shows that UV-induced *HR23A* expression is directly linked to transcriptional regulation, which is dependent on the stress-responsive USF-1 (Upstream Stimulating Factor 1) transcription factor. USF-1 is a member of the evolutionarily conserved eukaryotic basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper transcription factor family. It operates as a transcriptional sensor for the stress response, mediated by the p38 stress-dependent kinase (29,35). USF-1 activates transcription by binding to defined E-box *cis*-regulatory elements and two conserved E-box motifs were identified in the mammalian *HR23A* gene promoter. USF members were found to interact with both these E-boxes *in vivo* and *in vitro*, although UV-treatment only induced the recruitment of USF-1. Importantly, UV-induced expression of *HR23A* is abrogated in *USF-1* knock-out mice, and the UV-response *in vitro* requires the presence of intact E-box motifs and recombinant USF-1. Consistent with the absence of conserved E-box motifs in the *HR23B* promoter, *HR23B* gene expression was not UV-inducible in our model. Also, the HR23 partner *XP-C* is not UV-inducible (data not shown) indicating the specificity of the effects of UV irradiation on the regulation of *HR23A* gene expression.

Our analysis of UV-induced *HR23A* gene expression led to the identification of additional conserved *cis*-regulatory elements and their partners required for constitutive expression. Again, conserved E-box motifs proved to be essential for constitutive *HR23A* expression, potentially with USF-1 and -2 activators that might cooperate as heterodimers and/or share redundant activation functions as homodimers under basal conditions. Indeed, the *HR23A* mRNA level was comparable in WT and USF-1 KO mice. The *HR23A* promoter also possesses GC-rich sequences that are conserved between species and with the *HR23B* promoter. Here we show that one motif is recognized specifically *in vivo* and *in vitro* by the transcription factor SP3. Although *in vitro* transcription assays provided no evidence of involvement of the GC motif, transcriptional cooperation between SP3 and USFs *in vivo*

might be significant, as observed in TATA-less promoters, to drive and precisely coordinate gene expression (36,40).

Gene expression processes are precisely regulated to maintain cellular protein levels as required. Interestingly, under the same UV conditions shown to lead to an increase in *HR23A* protein and mRNA levels, the amount of *HR23B* protein decreases while the *HR23B* mRNA levels remain stable. These results would suggest that in response to UV stress, posttranslational modification(s) of the *HR23B* protein leads to a decrease in its stability. This is the first study to report conditions under which the loss of *HR23B* is associated with a concomitant increase in the level of *HR23A*, which begs the question as to its significance and the need of an appropriate balance in both proteins. *HR23A* and *B* proteins share common domains, and are both able to form a complex with XPC (15,16). Interestingly, XPC-*HR23B* complexes have previously been reported to be more abundant than XPC-*HR23A* complexes (41). It is therefore tempting to speculate that following specific UV-dose treatment, *HR23A* up-regulation, and decreased *HR23B* protein levels, favors XPC-*HR23A* complex formation and that differential regulation of these two *HR23* homologues may ensure maintenance of their shared function. XPC-stabilization through its binding to *HR23A*-protein would thus be sustained for appropriate recognition of DNA lesions in a precise timing following specific UV-radiation doses (41,42).

In addition it has been shown that the free fraction of *HR23*, not engaged in XPC-complexes, binds to ubiquitylated proteins and promotes their degradation by the proteasome (17). In yeast, *RAD23* facilitates degradation of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in response to stress, thereby helping cells cope with ER stress (43). The response of *HR23A* to UV is thus sound with it fulfilling this role. *HR23* levels are also important for p53 stabilization. This is consistent with the expression of both the *HR23A* and *p53* genes being mediated by the stress-dependent transcription factor USF-1, allowing a tight and coordinate regulation, as it has been observed for the UV-induced

pigmentation network (29,30,44). USF-1 may thus mediate skin protection against UV by controlling two independent and complementary pathways: UV-induced pigmentation and DNA-repair processes, extending the repertoire of USF-1 target genes.

FUNDING

This work was supported by the “Ligue National contre le Cancer – Comités Départementaux du Grand Ouest” and the “Association pour la Recherche contre le Cancer - ARC” foundations. Yorann Baron has been successively supported by the Conseil Général Région Bretagne (ARED) and the ARC PhD fellowship programs. Sebastien Corre was supported by the CHU-research program. We would also like to acknowledge the Rennes University, the CNRS and the IFR-140 for their support and facilities. The authors would like to thank Guillemette Ramey and Jean-Christophe Deschemin for animal care and genotyping.

REFERENCES

1. Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E. and Sage, E. (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*, **275**, 26732-26742.
2. Friedberg, E.C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
3. Cleaver, J.E. (1968) Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*, **218**, 652-656.
4. Lehmann, A.R. (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, **85**, 1101-1111.
5. Nospikel, T. (2009) DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 994-1009.
6. Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev*, **15**, 507-521.
7. Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, **2**, 223-232.
8. Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H. (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, **8**, 213-224.
9. Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugasawa, K., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2000) The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIIH to damaged DNA. *J Biol Chem*, **275**, 9870-9875.
10. Kusumoto, R., Masutani, C., Sugasawa, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T. and Hanaoka, F. (2001) Diversity of the damage recognition step in the

- global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat Res*, **485**, 219-227.
11. van der Spek, P.J., Visser, C.E., Hanaoka, F., Smit, B., Hagemeyer, A., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1996) Cloning, comparative mapping, and RNA expression of the mouse homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleotide excision repair gene RAD23. *Genomics*, **31**, 20-27.
 12. Ng, J.M., Vrieling, H., Sugasawa, K., Ooms, M.P., Grootegoed, J.A., Vreeburg, J.T., Visser, P., Beems, R.B., Gorgels, T.G., Hanaoka, F. *et al.* (2002) Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B. *Mol Cell Biol*, **22**, 1233-1245.
 13. Ng, J.M., Vermeulen, W., van der Horst, G.T., Bergink, S., Sugasawa, K., Vrieling, H. and Hoeijmakers, J.H. (2003) A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes Dev*, **17**, 1630-1645.
 14. Chen, L. and Madura, K. (2006) Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. *FEBS Lett*, **580**, 3401-3408.
 15. Li, L., Lu, X., Peterson, C. and Legerski, R. (1997) XPC interacts with both HHR23B and HHR23A in vivo. *Mutat Res*, **383**, 197-203.
 16. Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Maekawa, T., Uchida, A., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Rademakers, S., Visser, C., Aboussekhra, A. *et al.* (1997) Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity. *Mol Cell Biol*, **17**, 6924-6931.
 17. van der Spek, P.J., Eker, A., Rademakers, S., Visser, C., Sugasawa, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1996) XPC and human homologs of RAD23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2551-2559.
 18. Schaubert, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. and Madura, K. (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature*, **391**, 715-718.
 19. Mueller, T.D. and Feigon, J. (2003) Structural determinants for the binding of ubiquitin-like domains to the proteasome. *Embo J*, **22**, 4634-4645.
 20. Wang, Q., Goh, A.M., Howley, P.M. and Walters, K.J. (2003) Ubiquitin recognition by the DNA repair protein hHR23a. *Biochemistry*, **42**, 13529-13535.
 21. Ortolan, T.G., Chen, L., Tongaonkar, P. and Madura, K. (2004) Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway. *Nucleic Acids Res*, **32**, 6490-6500.
 22. Chen, L. and Madura, K. (2002) Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*, **22**, 4902-4913.
 23. Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G. and Madura, K. (2001) Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep*, **2**, 933-938.
 24. Verma, R., Oania, R., Graumann, J. and Deshaies, R.J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell*, **118**, 99-110.
 25. Brignone, C., Bradley, K.E., Kisselev, A.F. and Grossman, S.R. (2004) A post-ubiquitination role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway. *Oncogene*, **23**, 4121-4129.
 26. Glockzin, S., Ogi, F.X., Hengstermann, A., Scheffner, M. and Blattner, C. (2003) Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation. *Mol Cell Biol*, **23**,

- 8960-8969.
27. Kaur, M., Pop, M., Shi, D., Brignone, C. and Grossman, S.R. (2007) hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis. *Oncogene*, **26**, 1231-1237.
 28. Vallet, V.S., Henrion, A.A., Bucchini, D., Casado, M., Raymondjean, M., Kahn, A. and Vaulont, S. (1997) Glucose-dependent liver gene expression in upstream stimulatory factor 2 ^{-/-} mice. *J Biol Chem*, **272**, 21944-21949.
 29. Galibert, M.D., Carreira, S. and Goding, C.R. (2001) The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *Embo J*, **20**, 5022-5031.
 30. Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D.C., Vaulont, S., Goding, C.R. and Galibert, M.D. (2004) UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem*, **279**, 51226-51233.
 31. Galibert, M.D., Miyagoe, Y. and Meo, T. (1993) E-box activator of the C4 promoter is related to but distinct from the transcription factor upstream stimulating factor. *J Immunol*, **151**, 6099-6109.
 32. Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G. *et al.* (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, **452**, 45-50.
 33. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, **115**, 751-763.
 34. Pfeifer, G.P., You, Y.H. and Besaratinia, A. (2005) Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*, **571**, 19-31.
 35. Corre, S. and Galibert, M.D. (2005) Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res*, **18**, 337-348.
 36. Roy, A.L., Du, H., Gregor, P.D., Novina, C.D., Martinez, E. and Roeder, R.G. (1997) Cloning of an inr- and E-box-binding protein, TFII-I, that interacts physically and functionally with USF1. *Embo J*, **16**, 7091-7104.
 37. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*, **238**, 291-300.
 38. Vallet, V.S., Casado, M., Henrion, A.A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A. and Vaulont, S. (1998) Differential roles of upstream stimulatory factors 1 and 2 in the transcriptional response of liver genes to glucose. *J Biol Chem*, **273**, 20175-20179.
 39. Madura, K. and Prakash, S. (1990) Transcript levels of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 increase in response to UV light and in meiosis but remain constant in the mitotic cell cycle. *Nucleic Acids Res*, **18**, 4737-4742.
 40. Ge, Y., Jensen, T.L., Matherly, L.H. and Taub, J.W. (2003) Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem*, **278**, 49901-49910.
 41. Okuda, Y., Nishi, R., Ng, J.M., Vermeulen, W., van der Horst, G.T., Mori, T., Hoeijmakers, J.H., Hanaoka, F. and Sugawara, K. (2004) Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1285-1295.
 42. Hsieh, H.C., Hsieh, Y.H., Huang, Y.H., Shen, F.C., Tsai, H.N., Tsai, J.H., Lai, Y.T., Wang, Y.T., Chuang, W.J. and Huang, W. (2005) HHR23A, a human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Rad23, regulates xeroderma pigmentosum C protein and is

- required for nucleotide excision repair. *Biochem Biophys Res Commun*, **335**, 181-187.
43. Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A. and Wolf, D.H. (2004) A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep*, **5**, 692-697.
 44. Reisman, D. and Rotter, V. (1993) The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res*, **21**, 345-350.

Fig. 1. *HR23A* transcription in human and mouse keratinocytes is induced by UV

(A) Scheme of the UVC treatment time course. Cells were irradiated every 15 minutes with $10\text{J}/\text{m}^2$ UV and harvested 15 min after 2, 4, 6 and 8 successive UV pulses. **(B)** HaCaT cells were irradiated as illustrated in panel A. Human *hHR23A* and *hHR23B* transcripts were quantified by RT-qPCR. Results for UV treatment are expressed relative to control (no UV treatment) and the *GAPDH* transcript is used as a calibrator. **(C)** Scheme of the UVC treatment time course. Cells were irradiated with eight successive $10\text{J}/\text{m}^2$ UV pulses that last 3 sec each at 15 min intervals and harvested at indicated time after last UV pulse. **(D,E)** HaCaT cells (D) and XB2 cells (E) were irradiated as illustrated in panel 1C. *hHR23A* and *hHR23B* transcripts were quantified by RT-qPCR. Results after UV treatment are expressed relative to controls (no induction) and the *GAPDH* transcript (panel D, HaCaT analysis) or HPRT transcript (panel E, XB2 analysis) are used as calibrators. **(F)**, Western blot analysis of XB2 cells irradiated as illustrated in panel 1C, in presence and absence of transcription inhibitor (α -amanitin). **(G)** HR23A protein quantification of four independent experiments.

Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-tailed Student's t-test) between control and irradiated samples * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0,001$.

Figure 1

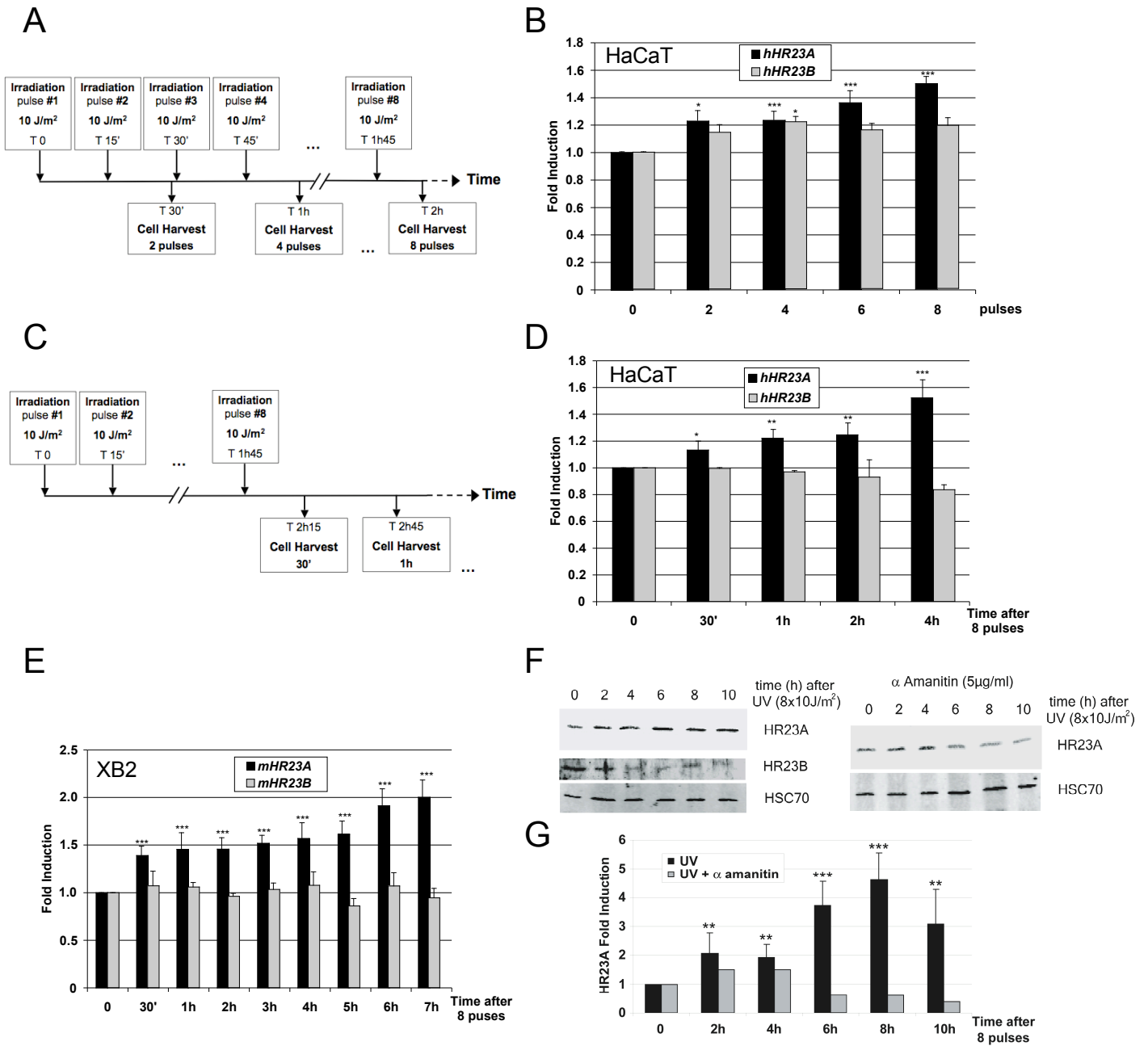


Fig. 2. USF family members interact with the *HR23A* proximal promoter *in vitro* and *in vivo*

(A) Graphic representation of human, mouse and dog *HR23A* and human *HR23B* proximal promoters. GC-rich regions are represented in striped gray and Eboxes conserved in mammals in solid gray. Positions of the boxes relative to the TSS (+1) are given above and their sequences are given below. **(B,C)** *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) with HaCaT cells using anti-USF1, USF2 or nonspecific antibody. **(B)** DNA recovered in basal conditions was subjected to PCR using primers specific for the proximal *HR23A* or *HR23B* promoter and for the distal region of *HR23A* as a negative control. **(C)** HaCaT cells were irradiated with eight successive UV pulses and harvested at the indicated time after irradiation (as illustrated in figure 1C). Recovered DNA was subjected to quantitative PCR using primers specific for the proximal *HR23A* promoter or distal region. Fold enrichment was determined by comparison between proximal and distal *HR23A* promoter regions in specific and non specific ChIP. Errors bars represent standard deviation. **(D)** *In vitro* Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) experiments were performed using HaCaT nuclear extract and radiolabeled probes targeting each of the two Eboxes of the *HR23A* proximal promoter. WT and mutated probe sequences are shown below the gels. DNA binding reactions were performed with anti-USF1, anti-USF2 or non specific antibodies as indicated. Cold WT probe was used for competition at the indicated concentrations. Arrows indicate shifted (→) and supershifted (=>) complexes.

Figure 2

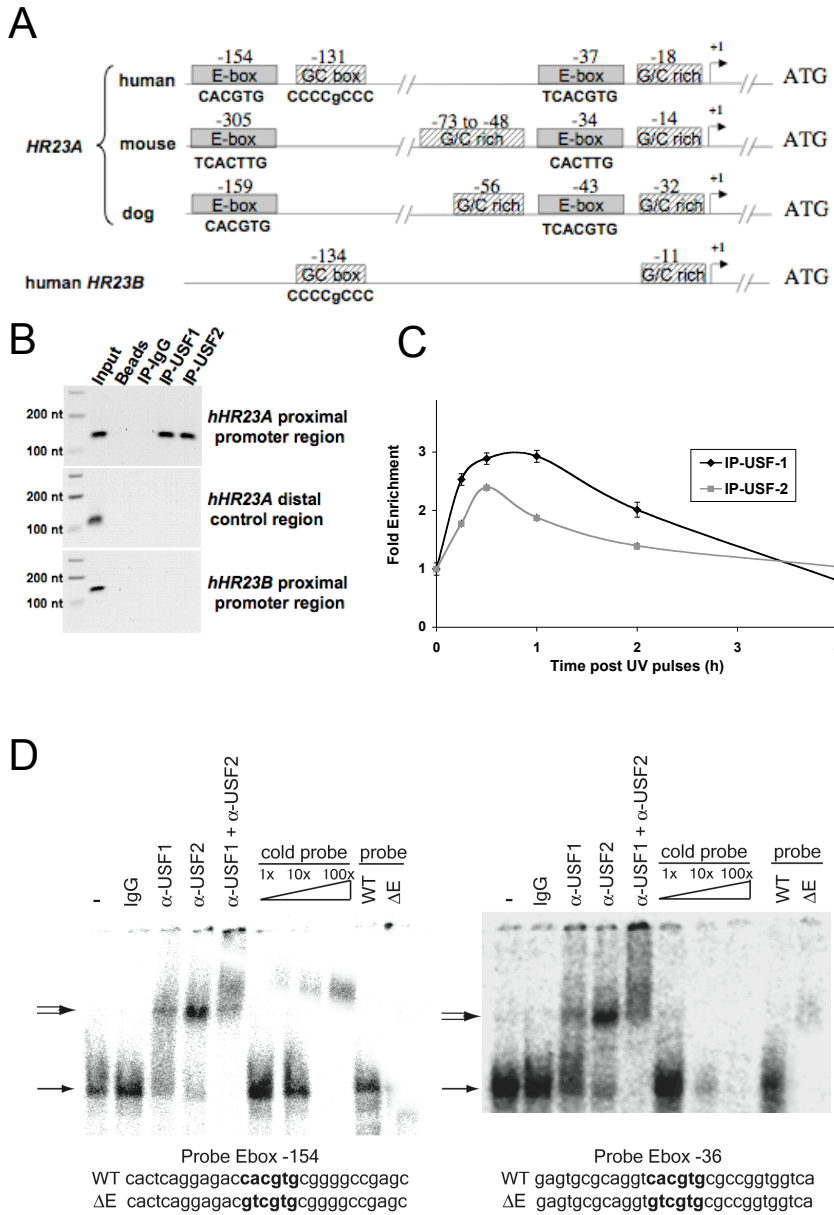


Fig. 3. SP3 interacts with the *HR23A* proximal promoter

(A) EMSA experiments with HaCaT nuclear extract (NE) and eight probes covering the promoter as shown above the gel. Shifted complexes (probe #3) are indicated with black arrows (→). **(B)** SP1 and SP3 bind the GC box site in the human *HR23A* promoter *in vitro*. *In vitro* EMSA with HaCaT nuclear extract and radiolabeled probe targeting the GC box of the *HR23A* proximal promoter. WT and mutated probe sequences are represented at the bottom. DNA binding reactions were incubated with anti-USF1, anti-SP1, anti-SP3 or anti-TBX2 as non-specific control as indicated. Cold WT probe was used for competition at the concentration indicated. Arrows point to the two different shifted complexes, specific for SP binding. **(C-D)** *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) with HaCaT cells using anti-SP3. **(C)** DNA recovered in basal conditions was subjected to PCR using primers specific for the proximal *HR23A* or *HR23B* promoter and distal region of *HR23A* as a negative control. **(D)** HaCaT cells were irradiated with eight successive UV pulses and harvested at the indicated time after irradiation (as illustrated in Fig. 1C). Recovered DNA was subjected to quantitative PCR using primers specific for the proximal *HR23A* or *HR23B* promoter or *HR23A* distal region. Fold enrichment was assessed by comparison between the *HR23A* or *HR23B* proximal region and distal *HR23A* promoter region, in specific and non-specific ChIP.

Figure 3

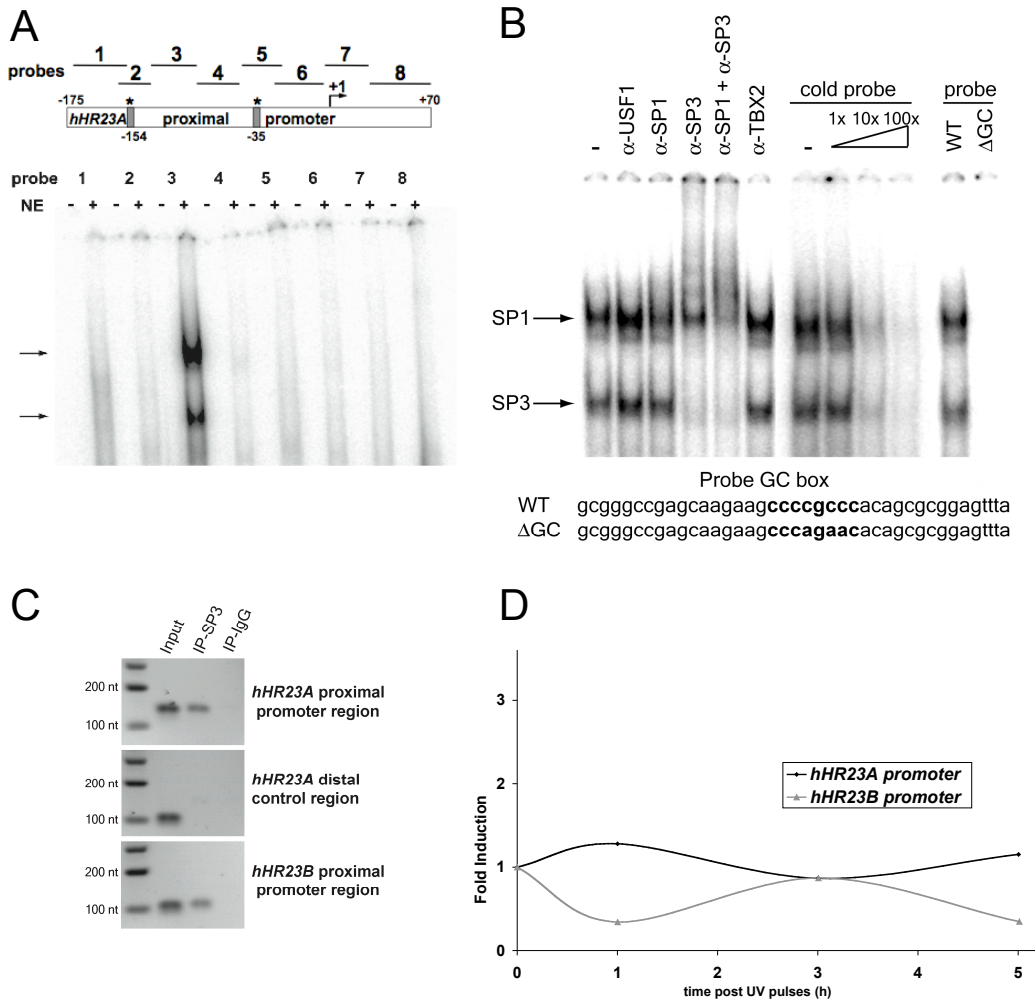


Fig. 4. *In vitro* transcriptional regulation of human *HR23A*

(A) Schematic representation of the *HR23A* promoter luciferase constructs. The long construct contains the sequence from -544 to +73 of *HR23A* promoter and short construct that from -186 to +73. Eboxes are represented in dark gray, GC box in light gray, and positions are indicated on top. Crosses show mutated boxes. (B) Long and short WT constructs were transiently co-transfected into XB2 keratinocytes with pCMV-USF1 or pCMV-USF2 expression vectors or empty vector as a control. Fold induction of luciferase was assessed by comparison with the basal activity of the short WT construct. (C) The short WT construct was transiently co-transfected into XB2 keratinocytes with a series of amounts of pCMV-USF1 or pCMV-USF2 expression vector or empty vector as indicated below. Fold induction of luciferase was obtained by comparison with the basal activity of the short WT construct. (D-E) Eboxes motifs are necessary for basal and induced activity of the *HR23A* promoter. Plasmids carrying short WT or mutated sequences for both Eboxes or mutated GC box were transiently transfected into XB2 cells. (D) Transfected cells were irradiated with UV pulses (dark bars) or not as controls (gray bars) and harvested 12h later. Fold induction of luciferase was assessed by comparison with the basal activity of the short WT construct. (E) Cells were co-transfected with various *HR23A* promoter constructs and pCMV-USF1 expression vector, and irradiated with UV pulses (black bars) or not as control (gray bars). Fold induction of luciferase was assessed by comparison with the activity of the short WT construct, co-transfected with pCM-USF1 without irradiation. Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-tailed Student's t-test) compared to the indicated control condition: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 4

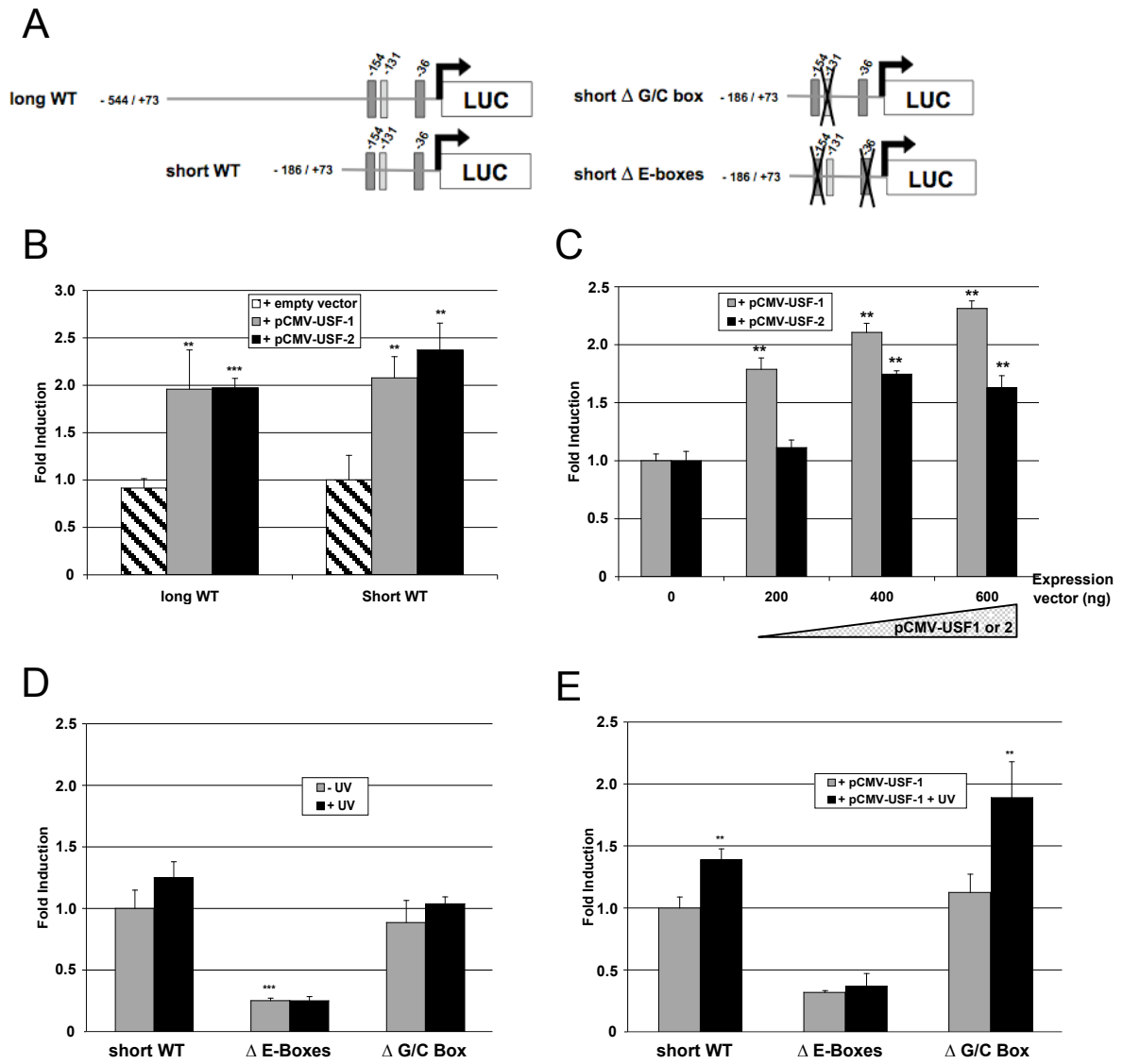
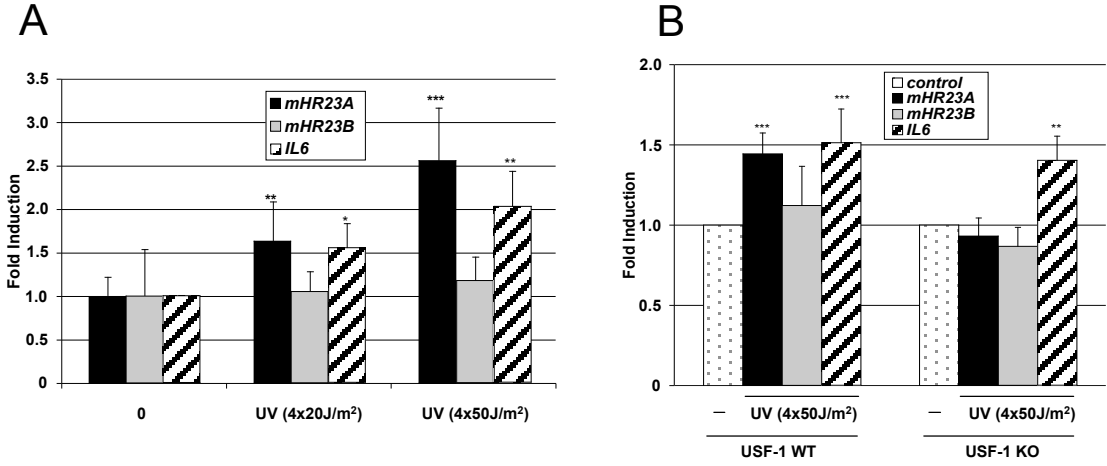


Fig. 5. UV-induced *HR23A* mRNA level is dependent on USF1

Cultured punch biopsies from WT mice (**A**) and WT or USF1-KO mice (**B**) were irradiated with four successive pulses of 20 or 50J/m² as indicated. Biopsies were lysed 3h after the last UV pulse, total RNA was extracted and Mouse *mHR23A*, *mHR23B* and *IL6* transcripts were quantified by RT-qPCR. Results for UV-treated samples are expressed relative to controls (no irradiation) and the *HPRT* transcript is used as calibrator. Values reported are means of at least three independent experiments.

Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-sided Student's t-test) between control and irradiated conditions * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

Figure 5



2ème Article :

**Implication du facteur de transcription
USF-1 dans le TCR par la régulation
UV-induite du gène *CSA***

III – Implication du facteur de transcription USF-1 dans le TCR par la régulation UV-induite du gène *CSA*

III.1 Introduction

Le TCR est la seconde sous voie du NER responsable de la reconnaissance des lésions d'ADN apparaissant sur les brins actifs des gènes transcrits. Après irradiation UV, le blocage de l'ARNPII sur une lésion conduit à la formation d'un complexe ARNPII-CSB-CSA qui entraîne le remodelage de la chromatine et permet le recrutement du TFIIH, acteur central des étapes suivantes du NER. A l'inverse des protéines HR23A et B, les protéines CSA et CSB ne sont pas homologues et possèdent des fonctions distinctes. Le gène *CSB* code pour une protéine de la famille des SWI/SNF, facteur de remodelage de la chromatine et associée à l'ARNPII indépendamment de la présence de lésions sur l'ADN. Suite à une irradiation UV, la protéine CSA est recrutée pour former le complexe ARNPII-CSB-CSA. La protéine CSA est un membre de la famille « WD-40 repeat protein » dont les domaines répétés sont impliqués dans les interactions protéines-protéines. D'autre part CSA fait partie d'un complexe E3 ligase composé de la culline4A, DDB1, ROC1/Rbx1 et CSN responsable de l'ubiquitination de la protéine CSB qui conduit à sa dégradation (Groisman *et al.*, 2006). De plus il a été montré l'implication des protéines CSA et/ou CSB dans l'ubiquitination UV-induite de l'ARNPII nécessaire pour la poursuite du mécanisme du NER (Bregman *et al.*, 1996).

La fonction des protéines CSA et CSB dans le mécanisme du TCR-NER est complexe. Dans le même temps, aucune donnée n'existe concernant la régulation du niveau de ces protéines en réponse aux irradiations UV. Dans cette étude nous avons étudié les effets d'une répétition de courtes irradiations UV sur la régulation transcriptionnelle des gènes *CSA* et *CSB*. D'une manière comparable à l'étude de la régulation des gènes *HR23A* et *B* nous montrons que le gène *CSA* est activé en réponse à une irradiation UV selon un mécanisme dépendant du facteur de transcription USF-1.

Après répétition de courtes irradiations d'UV-C, selon un protocole expérimental analogue à celui utilisé lors de l'étude des transcrits *HR23*, la quantification par RT-QPCR des ARNm des gènes *CSA* et *CSB* montrent une induction très rapide (30' après la fin des expositions) du gène *CSA* alors que le gène *CSB* n'est pas activé. Les expériences d'immunolocalisation de la protéine CSA, montrent une augmentation de son niveau protéique après

irradiation UV, avec une localisation essentiellement peri-nucléaire. Ces résultats concordent avec la quantification protéique par Western-Blot.

L'étude du promoteur du gène *CSA* met en évidence la présence d'un motif de régulation boîte E, motif très conservé chez les mammifères, de la souris à l'homme. Par ChIP, nous montrons que les facteurs USF-1 et 2 fixent la région promotrice du gène *CSA*. De plus l'efficacité de fixation de la protéine USF-1 est augmentée en réponse à une irradiation UV, alors que ce n'est pas le cas du facteur USF-2. Cette fixation spécifique des facteurs USF au niveau du motif boîte E du promoteur de *CSA* est confirmée par des expériences de retard sur gel (EMSA).

La transfection transitoire de construction plasmidique (luciférase assay) associant le promoteur du gène *CSA*, sauvage ou muté pour la boîte E, à un gène rapporteur montre que l'induction du gène est dépendante du motif boîte E. L'irradiation UV ou la surexpression des facteurs USF-1 ou USF-2 entraîne une activation transcriptionnelle de la construction plasmidique contenant le promoteur sauvage, vérifiant les observations de quantification du transcrit par RT-QPCR.

Enfin l'utilisation de lignées de souris KO pour la protéine USF-1 confirme l'implication directe du facteur de transcription USF-1 dans la régulation UV-induite du gène *CSA* et l'absence de régulation UV-induite du gène *CSB*.

Ces résultats montrent que le gène *CSA* est inductible suite à l'exposition aux radiations UV alors que le gène codant la protéine CSB, son partenaire dans le TCR n'est pas inductible dans ces conditions. Cette induction intervient très rapidement après irradiation corrélant avec la dynamique de réparation par la voie du TCR-NER. Le facteur de transcription USF-1 est directement responsable de l'activation transcriptionnelle du gène *CSA*, par fixation d'un motif de régulation dans le promoteur proximal. Ces données impliquent le facteur de transcription USF-1 dans la régulation de l'étape de reconnaissance du TCR-NER.

III.2 Résultats

IMPLICATION OF USF IN DNA REPAIR, SPECIFIC UV-INDUCED REGULATION OF CSA EXPRESSION

Yorann Baron^{1,*}, Sébastien Corre^{1,*}, Mouchet Nicolas¹, Sophie Vaultont^{2,3}, and Marie-Dominique Galibert^{1,#}

¹ CNRS UMR 6061 Genetic and Development Institute of Rennes, RTO Team, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS, 2 av du P^f Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

² Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France

³ Inserm, U567, Paris, France

* co-author

corresponding author:

CNRS UMR 6061 Institut de Génétique et Développement de Rennes, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS

2 av du P^f Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France

0033 223 234 705 / Fax : 0033 223 234 607

e-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr

Running head: CSA UV-induced expression regulation
Keywords: TCR, CSA, CSB, USF1, gene expression, UV.

In response to genotoxic stress, cells carry out several DNA-repair processes eliminating DNA damage and thus avoiding harmful consequences. Nucleotide Excision Repair (NER) is specifically involved in the recognition and removal of UV-mediated DNA lesions. NER operates through two different pathways: the Global Genome Repair (GGR), the predominant pathway, and the Transcription Coupled Repair (TCR). During TCR, bulky DNA lesions in the transcribed strands of active genes are more rapidly removed than those in the non-transcribed genomic DNA. Lesion recognition occurs through arrest of the elongating RNA Polymerase II (RNAPII) when it encounters the damage. This essential step initiates the subsequent recruitment of repair factors, leading to removal of the photolesion. CS proteins (CSA and CSB) are important in these initiation steps in TCR, for both the recognition of UV-induced DNA lesions and the recruitment of DNA repair factors. In our study, we showed for the first time that, in response to UVC, the expression of the *CSA* gene is specifically and rapidly increased in the skin. We also demonstrated the role of the ubiquitous transcription factors USF in the mechanisms underlying this gene expression regulation. Indeed, USF1 and -2 activate *CSA*

expression after binding the consensus Ebox element present on the *CSA* promoter.

Elucidation of the mechanisms regulating CS levels during UV-induced TCR is essential for the improved understanding of this pathway, through which cells can efficiently and rapidly repair DNA damage and resume transcription.

INTRODUCTION

Cellular DNA is continuously exposed to damage caused by endogenous metabolism and environmental sources. This damage may have mutagenic and cytotoxic effects, threatening genomic integrity and proper cell function. The importance of efficient repair processes for maintenance of the genome is clearly demonstrated by the existence of several genetic disorders characterized by defects in DNA repair processes, including xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS), Fanconi anemia, Ataxia Telangiectasia, and others (1).

Several DNA repair pathways operate in the cell to maintain genome integrity. The most versatile repair mechanism is Nucleotide Excision Repair (NER), a ubiquitous repair pathway that recognizes and removes a wide variety of structurally unrelated lesions from DNA, including ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6–4 pyrimidine

pyrimidone photoproducts (6–4)PPs. NER is composed of two different pathways: the Global Genome Repair (GGR), the predominant pathway, and the Transcription Coupled Repair (TCR). TCR is able to remove specifically bulky DNA lesions from the transcribed strands of active genes more rapidly than from the non-transcribed genomic DNA (2,3). In TCR, lesion recognition occurs through arrest of the elongating RNA Pol II (RNAPII) when it encounters the damage. This essential step initiates the subsequent recruitment of repair factors, leading to removal of the lesion (4). Cockayne syndrome (CS) is caused by defects in the proteins required for efficient TCR. It is a rare, autosomal, recessive disease characterized by postnatal physical and mental retardation, developmental abnormalities, UV sensitivity and brain degeneration, but does not predispose to cancer caused by UV exposure (5,6).

CS is caused by mutations in one of five different genes: *CSB*, *CSA*, *XPG*, *XPB* and *XPB*. The *CSB* gene encodes a 168-kDa protein related to the SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelling factors (7-9). SWI/SNF family members such as SWI2/SNF2 are DNA helicases. The CSB protein, like most members of this family, displays DNA-dependent ATPase and DNA binding activity, but not helicase activity. The binding of CSB to DNA alters the DNA double-helix conformation. CSB also causes remodelling of the chromatin structure through ATP hydrolysis (8). The *CSA* gene product, which is also required for TCR, is a member of the WD-40 repeat protein family. CSA is part of an E3-ubiquitin ligase complex consisting of DDB1, Cullin4A, ROC1/Rbx1 and the COP9 signalosome (CSN) (10). Upon UV irradiation, CSB and CSA display increased interaction with the chromatin-bound elongating RNAPII. The recruitment of CSA requires the presence of functional CSB. These two CS proteins play different roles in recruiting TCR-specific factors, leading to the assembly of a TCR complex without disruption of the UV-stalled RNA polymerase II (RNAPII). CSB plays a key role as a coupling factor in the recruitment of histone acetyltransferase p300 and nucleotide excision repair (NER) proteins, and in the formation of the CSA-DDB1 E3-ubiquitin ligase complex containing the COP9 signalosome. CSA is not essential for the recruitment of NER proteins to lesion-stalled RNAPII, but, in cooperation with CSB, is required to recruit XAB2, the nucleosomal binding protein HMG1 and TFIIIS (11). The recruitment of both these proteins following UV-induced DNA damage is thus

crucial in maintaining genome stability and cell integrity.

Furthermore, the ubiquitination and degradation of UV-induced RNA polymerase II (RNAPII) are important DNA damage responses, conserved from yeast to humans. Ultraviolet (UV) radiation induces the ubiquitination of the large subunit of RNA polymerase II (RNAP II-LS) and its proteasomal degradation (12). This covalent modification of Pol II LS occurs within 15 min of exposing cells to UV-radiation and persists for about 8 to 12 hours. UV-induced ubiquitination of Pol II LS is deficient in fibroblasts from individuals with one of two forms of Cockayne syndrome (CS-A or CS-B), in which TCR is disrupted. UV-induced ubiquitination of Pol II LS can be restored in these cells by introducing CSA or CSB cDNA (13). Nevertheless, CS proteins are not required for damage-induced RNAPII ubiquitination and RNAP II-LS UV-induced degradation rates do not differ significantly between *CSA* or *CSB* fibroblasts and repair-competent control cells (12). Transcription is thus arrested through an indirect mechanism involving Nedd4, an E3 protein that associates with and ubiquitinates RNAPII in response to UV-induced DNA damage in human cells (14).

The changes in chromatin at the RNA polymerase II stall site are dependent, at least in part, on CSB and TFIIH. These changes are necessary for the UV-induced translocation of cytoplasmic CSA to the nuclear matrix, but not of XPC, which acts as a damage sensor in GGR reactions. Other DNA-damaging agents such as cisplatin or hydrogen peroxide, which lead to removal of intrastrand crosslinks during TCR, also induce the translocation of CSA to the nuclear matrix (15,16). CSB is degraded at a late stage of the UV damage-induced repair process in a proteasome- and CSA-dependent manner. CSB degradation is essential for post-TCR recovery of transcription and is prevented in the Cockayne syndrome (17).

The mechanisms underlying the regulation of CS proteins during TCR DNA repair are complex and require a large number of molecular pathways to control the response to DNA damage. However, the pathways involved in regulating the levels of these proteins specifically in response to UV have not been established yet. Here, we studied the effect of irradiating the skin with low wavelength UV (UVC), which efficiently induces DNA lesions in chromatin and triggers NER. In particular, we determined the effects of this type of environmental stress on the regulation of *CSA* and *CSB* gene expression in the skin.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Tissue Culture

HaCaT (human keratinocytes), XB2 (mouse keratinocytes) and 293 HEK cell lines were maintained in D-MEM (Cat N°41966-029, Gibco BRL, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Sigma) and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Gibco BRL, Invitrogen) at 37°C in a 5% and 10% CO₂ atmosphere.

Skin explants

Skin explants (0.8 cm Ø) were recovered from the backs of wild type or USF1 KO mice (kindly provided by Sophie Vaultont) and maintained in culture for up to 24 hours in RPMI (Cat N°21875-034, Gibco BRL, Invitrogen) supplemented with 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Gibco BRL, Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

UV Irradiation

DNA damage was generated with specific ultraviolet bulbs (UVC 254nm), using the Stratalinker apparatus (Stratagene) as previously described (18,19). These UV bulbs give rise to 6-4 photoproducts (PP) at high frequency (Pendiz 2000). The day before UV exposure, cells were plated at 50-70% confluence, depending on their doubling time, in 10 cm Petri dishes. The medium was replaced with fresh medium supplemented with 2% FBS and 1% antibiotics after 12 to 24 hours. The following day, cells were irradiated with UVC every 15 min for 1 or 2 hours (6 x 1 mJ/cm² of UVC). The medium was completely removed before and replaced immediately after irradiation. At the time points indicated, cells were washed twice in cold PBS, harvested by scraping, centrifuged and resuspended in RA1 buffer (Nucleospin RNA II, Macherey Nagel) for mRNA extraction. Samples were stored at -20°C until needed for further experiments.

Mouse skin biopsy samples were irradiated with six successive pulses of 5 mJ/cm² UVC, recovered at the indicated time points by placing the skin sample directly into RNAlater buffer (Qiagen) and were stored at -20°C.

Gene expression analysis-

RNA was extracted using Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Recovered RNA was quantified using the Nanodrop device (Nanodrop Technology). For skin explants, using the Macherey Nagel kit, an extra Trizol/chloroforme purification step is needed to remove protein. cDNA was obtained by reverse transcription using

a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) according to the manufacturer's instructions from 1 µg of total RNA. Gene expression was analyzed by qRT-PCR in sealed 384-well microtiter plates using the SYBR Green TM PCR Master Mix (Applied Biosystem) with the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Relative amounts of transcripts were determined using the delta Ct method (20). The mRNA levels at each time point following stimulation are expressed as fold increase, relative to non-irradiated cells. Data were normalized to the house keeping gene mouse *HPRT*. Each experiment was carried out at least twice and each time point was repeated in triplicate. Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-tailed Student's t-test) between control and irradiated samples * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0,001.

Forward (F) and reverse (R) primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche®) or primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) and have been previously tested for their efficiency (data not shown) :

mHPRT-F, 5'-tcctctcagaccgctttt-3';
mHPRT-R, 5'-aacctggctcatcgcgtaa-3';
mCSA-F, 5'-gaagacgcagcttccacatta-3';
mCSA-R, 5'-tggacatgatctcagtcagca-3';
mCSB-F, 5'-gcagctgggtcaggaaaac-3';
mCSB-R, 5'-ctggatgaactgctcctgt-3';
mUSF1-F, 5'-gcagctgggtcaggaaaac-3';
mUSF1-R, 5'-gcagctgggtcaggaaaac-3';
mUSF2-F, 5'-gcagctgggtcaggaaaac-3';
mUSF2-R, 5'-gcagctgggtcaggaaaac-3';
mGadd45α-F, 5'-acccgataacgtgtactg-3';
mGadd45α-R, 5'-gatctgcagagccacatcc-3'.

Western blot analysis

Harvested cells were immediately lysed by incubation for 30 min in ice-cold RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA, protease and phosphatase inhibitors), and centrifuged (13000 g - 4°C) for 15 min. Equal amounts of protein lysates were denatured in Laemmli buffer for 5 min at 95°C and resolved by 15% SDS-PAGE. Membranes were probed with appropriate antibodies and signals detected using the Odyssey Infrared Imaging System were quantified (LI-COR Bioscience).

Chromatin Immunoprecipitation Assay

We performed a ChIP assay using 15-20 x 10⁶ HaCaT and mouse cell lines, according to the previously described protocol with some

modifications (21-23). Cells were grown to 70-80% confluence in medium supplemented with 5% FCS. Cells were then irradiated with six pulses of UVC (one pulse every 15 minutes). Reference data were obtained from non-irradiated cells. Cells were subjected to cross-linking (1.5% formaldehyde for 15 min at RT, quenched by 0.125 M glycine for 15 min at RT), washed twice and collected in 1 ml of cold PBS. Cells were then lysed sequentially by pipetting, centrifuging for 5 min at 2,000g at 4 °C with PBS, 1 ml Buffer A (10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6.5) and 0.25% Triton X-100) and 1 ml Buffer B (1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH 6.5) and 200 mM NaCl), and three pulses of sonication (15 seconds, power level 3 and 50% output; Sonifier Cell Disruptor, Branson) in 1ml of lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB (Sigma)). Aliquots (100 µl) of the supernatants obtained from the centrifugation step were used as inputs. The remainder of the supernatant was diluted by a factor of 2.5 in IP buffer (2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) and 0.5% Triton X-100). This fraction was subjected to immunoprecipitation overnight using 3 µg of the appropriate antibody, after a 3 h pre-clearing at 4 °C with 2 µg sheared salmon sperm DNA, and 100 µl of a 50% protein A-Sepharose bead (Amersham Pharmacia Biosciences) slurry. Complexes were recovered after 3 h incubation at 4 °C with 2 µg of sheared salmon sperm DNA and 50 µl of protein A-Sepharose bead slurry. Precipitates were then serially washed, complexes were removed from the beads, cross-linking reversed and DNA purified using the Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel).

PCR or qPCR analyses were carried out with primers spanning the *CSA* proximal promoter or, as a reference, with primers targeting an unrelated promoter region (the HSP70 promoter region) for PCR and to distal regions (4 Kb to 2 Kb from the E-box target region) of the *CSA* promoter for qPCR analysis.

End-point PCR was performed in semi-quantitative conditions for ChIP (30 amplification Cycles). For qPCR analysis, fold enrichment was determined using the $\Delta\Delta Ct$ method: Fold enrichment = $2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)}$, where ΔCt = (Ct target sequence – Ct control region) and where $\Delta Ct 1$ is the ChIP of interest and $\Delta Ct 2$ the control ChIP.

Primers used :

pCSA proximal (-320) F-5'-agttctgtactgcgggatgt-3'; R-5'-gggttggtctcaggattgt-3'.

pCSA distal 1 (-2001) F-5'-actggcaaacccatacaatg-3'; R-5'-agtcgtgcttgcctcac-3'.

pCSA distal 2 (-4278) F-5'-tgggacagtctcaaatggaa-3'; R-5'-ccgtcatgaataactcc-3'.

pHSP70 proximal (-260) F-5'-gggtctcgtgacgacttat-3'; R-5'-tctcgaaaaggtagtgactgt-3'.

Electrophoresis mobility shift assay

Gel electrophoresis DNA binding assays were performed with crude HaCaT keratinocyte nuclear extracts under conditions previously described (19,24,25), with modifications. Double-stranded oligonucleotides were labeled with T4 polynucleotide kinase in the presence of P32- γ ATP (3000 Ci/mmol) and purified in columns (Mini Quick Spin Oligo Columns, Roche Diagnostic) according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed at 4°C with nuclear extracts. Reaction mixtures contained 2-4 µg of total protein and 0.03 pmol of 32P end-labeled probe in binding buffer (Hepes 25mM, KCl 150mM, 10% Glycerol, DTT 10mM, 1 µg of poly(dIdC), 1 µg salmon sperm DNA). After 20 min of incubation, samples were loaded onto a low ionic strength 6% polyacrylamide gel (29:1 cross-linking ratio) containing Tris Borate Na2 EDTA buffer pH 8.3.

Supershift and competition assays were performed by adding competitor probes (at concentrations ranging from 1X to 100X) or antibodies (0.2 µg) prior to incubation with labeled probe.

Radioactive bands were quantified with a STORM 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Probes used :

CSA-E-box-154 5'-ggcactcaggagaccacgtgcccggccgagccc-3'.

CSA-ΔE-box-154 5'-ggcactcaggagacgaattcccggccgagccc-3'.

Plasmid constructs

The sequence lying -847/+1 upstream of the transcription start site of the *CSA* gene was isolated by PCR and inserted into the luciferase reporter pGL3-basic plasmid (Promega). E-boxes (CACGTG) were mutated (GAATTC) using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instruction using specific oligonucleotides (sequences available on request).

Luciferase reporter analysis

CSA promoter regulation was studied in HEK cells and in mouse XB2 keratinocytes. Cells were plated at 60-70% confluence in 12-well plates in medium supplemented with 10% SVF without antibiotics and were maintained for 12h. Cells were co-transfected or not with pGL3-*CSA* reporter vector and pCMV (empty, USF1, or

different post-translational forms of USF1 or USF2), as previously described (18,26). The transfection mix, containing up to 1 µg of plasmid DNA, was prepared in OptiMem® medium (Invitrogen®) and used to transfect cells for 3h using Lipofectamin 2000® (Invitrogen®) according to the manufacturer's instructions. After 3h of transfection, the medium was replaced with fresh medium supplemented with 10% SVF and 1% antibiotics and cells were maintained. Cells were irradiated with UVC, as described above. Cells were harvested up to 48h after transfection and 5 hours following UV treatment. Cells were then passively lysed and luciferase activity was quantified in a Microplate Luminometer Centro LB 960 (Berthold®) using the Luciferase Reporter Assay System (Promega®).

Immunofluoro-staining

The day before induction, cells were plated at 70% confluence in 3 cm Petri dishes with cover slips placed on the bottom. The following day, cells were UVC-irradiated every 15 min for 1 or 2 hours (6 x 1 mJ/cm² of UVC). The medium was completely removed before and replaced immediately after irradiation. At the time points indicated, cells were washed twice in cold PBS and fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde methanol solution. Cells were washed again with PBS containing 0.5% Tween for 5 min. Cover slips were then saturated with PBS containing 0.5% tween and 5% BSA at room temperature. Anti-CSA primary antibody was incubated overnight at 4°C (dilution 1:1000). Cells were washed twice with PBS containing 0.5% Tween before incubating for 1h with secondary antibody in the dark. Cover slips were fixed onto glass slides with specific Vectashield mounting medium with Dapi (Vector®). Fluorescence microscopy was performed using a Leica inverted microscope (DMRXA).

Antibodies

Anti-USF1 (C-20), -USF2 (N-18) and -CSA (PEP 2) antibodies were purchased from Santa-Cruz. Anti α -Tubulin (ARP42211) was purchased from Sigma.

RESULTS

1. CSA transcription is induced by UV in mouse and human keratinocytes

To explore the effects of UV rays on the expression of the *CSA* and *CSB* genes, we irradiated cultured mouse keratinocytes (XB2) with a short UVC wavelength (254 nm), known to directly generate DNA damage. Rather than

irradiating cultured cells with a single pulse, we used repeated pulses of low-dose UVC. Briefly, XB2 cells were irradiated with six pulses of 1 mJ/cm² UVC at 15 min intervals and collected over a period of five hours. Next, we investigated the time course of production of these two transcripts by harvesting cells at the indicated times after the last UVC pulses (Fig. 1A). UVC treatment did not affect the abundance of the *CSB* transcript. By contrast, it caused a rapid and significant increase in *CSA* mRNA (6-fold increase over 30 min following six pulses of 1 mJ/cm² UVC; Fig. 1A). This induction of *CSA* transcript appeared very quickly, only 30 min after the last pulse of UVC or two hours after the first pulse of UVC radiation. *CSA* transcript levels then remained constant over one hour. After this peak in expression, the level of *CSA* transcript decreased slowly, reaching base-line levels after four hours. The level of *Gadd45 α* transcript was used as a positive control for the response to UVC. *Gadd45 α* thus showed a significant increase in expression levels 30 min to one hour after exposure to six pulses of 1 mJ/cm² UVC (4-fold increase, Fig. 1A). Comparable inductions of *CSA* were obtained with human keratinocytes (HaCaT) cell lines (data not shown).

To determine if this increase in *CSA* mRNA levels led to an increase in *CSA* protein, western blot analysis using antibody directed specifically towards *CSA* protein was performed (Fig. 1B). Protein preparations were from same experiments in which RNA was analysed and therefore *CSA* protein level could be directly compared to the corresponding mRNA profiles. The *CSA* protein level increased dramatically 2 hours after the last UVC hits and remained relatively constant up to 6 hours after UV induction. The 2 hour increase of *CSA* protein level corresponds well with increases of the mRNA. This increase in *CSA* protein levels was abolished when cells were pre-treated with α -amanitin (5µg/ml 30 min before the first UVC hit) an agent that disrupts transcription, confirming that the increase in *CSA* mRNA was responsible for the increase in *CSA* protein level (data not shown). By contrast, *CSB* protein levels seemed to remain constant after UVC treatment, consistent with our data obtained for *CSB* expression analysis. We also investigated whether this increase in *CSA* mRNA levels led to an increase in *CSA* protein by the immunofluoro-staining of XB2 keratinocytes using antibodies directed specifically against *CSA* protein (Fig. 1C). Under the same experimental conditions, we observed a significant increase in the amount of *CSA* protein after only one hour following the last of six UVC pulses (6 x 1 mJ/cm²). Although

normally present in the cytoplasm, we found CSA to be specifically localized in the nuclear matrix in these irradiated cells (Fig. 1C). Indeed, the amount of CSA protein found close to the nucleus was significantly greater in irradiated than in non-irradiated cells. After five hours of UVC irradiation, CSA protein levels, although showing a slight decrease over time, remained at a high level (Fig. 1C). The immunofluoro-staining results are consistent with our findings from western blot following UVC treatment under the same conditions, showing the highest CSA protein levels around two hours after the last UVC pulse (data not shown).

2. USF family members bind the CSA proximal promoter *in vivo* and *in vitro*

To investigate the mechanisms involved in regulating CSA expression levels after UV irradiation, we first performed an *in silico* analysis of the human CSA proximal promoter (Fig. 2A). We found that the human CSA promoter contains one E-box motif (CACGTG) upstream from the transcription start site (TSS) at -260, which is highly conserved during evolution and more specifically among mammals (lower part of Fig. 2A), whereas there was no E-box in the CSB promoter (sequence not shown). Given that Upstream Stimulating Factor-1 (USF1) transcription factor acts as a key mediator of UV-regulated gene expression by interacting with E-box cis-regulatory element (CACGTG) (27), CSA may be a USF1 target gene. To test this hypothesis, we performed *in vivo* and *in vitro* binding assays to determine whether USF transcription factors interact with the CSA proximal promoter. It should be noted that USF1 binds to E-box motifs as homodimers or heterodimers with its related partner USF2. We performed chromatin immunoprecipitation assays using antibodies specific for USF1 or USF2. Bound DNA recovered from the human HaCaT keratinocyte cell line was amplified by PCR using primers spanning the proximal promoter of the CSA gene (Fig. 2A). Our results show the specific amplification of products corresponding to the CSA proximal promoter bound to USF1 or USF2 (upper part of Fig. 2B). No PCR product corresponding to the proximal CSA promoter was observed using the non-specific IgG antibody.

We next investigated whether USF1 and USF2 interact with the CSA proximal promoter *in vivo* following UV-irradiation ($6 \times 1 \text{ mJ/cm}^2$). ChIP assays were performed over a five-hour time course with UV-irradiated and non-irradiated HaCaT cells (lower part of Fig. 2B). We detected the specific amplification of products

corresponding to the CSA proximal promoter sequence bound to USF1, with a peak in amplified product (levels 8 times higher than in non-irradiated cells) observed 30 min after the last UV pulse. The binding of USF1 to CSA decreased progressively, returning to lower levels three hours after UV-irradiation. Less significant results were obtained for USF2, with only small amounts of amplified product corresponding to the CSA proximal region of the promoter bound to USF2, and with no difference observed between irradiated and non-irradiated cells.

We characterized the binding motifs required for USF binding to the CSA proximal promoter, focusing on the conserved E-box motif also present in the ChIP amplified products. We thus carried out *in vitro* assays using a probe that specifically targets the E-box located at -260 (Fig. 2A) from the TSS. These assays showed specific DNA-protein complexes detected by labeled probes in HaCaT crude nuclear extracts (Fig. 2C). These complexes were competed efficiently by homologous wild type probe (cold probe) and super-shifted by antibodies against if USF1 or USF2 but not by non-specific antibody (IgG) (Fig. 2C). We did not observe super-shifted bands in the presence of antibodies specifically targeting other transcription factors such as Myc or Tbx2. Additionally, we did not detect the formation of DNA-protein complexes with fragments carrying mutated E-box sequences (Δ E-box). Thus, this motif is required for the binding of USF transcription factors to the CSA proximal promoter and may be a target for regulation of CSA expression.

3. *In vitro* transcriptional regulation of CSA by USF factors in response to UV

To determine whether the E-box motif targeted by USF transcription factors on the CSA promoter is involved in the regulation of this gene in response to UV irradiation, we transiently transfected 293 HEK cells with a CSA promoter construct cloned upstream from the luciferase reporter in a pGL3-Luc expression vector (-847/+1), containing either with a WT or mutated E-box motif under different experimental conditions. We compared CSA expression levels in cells transfected with vector containing the CSA promoter construct with those in control cells transfected with empty pGL3. This showed firstly the minimum region required for basal transcription of CSA by UV (Fig. 3A) and then whether USF transcription factors are involved in the up-regulation of CSA expression (Fig. 3B). Comparable data were observed in XB2 keratinocytes cell lines (data not shown).

Transfection of the *CSA* promoter construct resulted in a significantly higher basal level of luciferase activity than observed with empty vector (Fig. 3A). Furthermore, in XB2 cells transfected with pCSA-Luc and treated with four pulses of 1 mJ/cm² UVC pulses every 15 min, 48 hours after transfection, we observed a significant (6 fold) increase in *CSA* expression only 30 min after the last UVC pulse, with levels remaining significantly higher than controls over the first five hours (dark gray Fig. 3A). This persistent activation of *CSA* transcription *in vitro* does not fully correspond to the physiological response to DNA damage and the need for *CSA* renewal *in vivo*. In cells cotransfected with pCSA-Luc containing a mutated E-box, the basal luciferase activity of the promoter was similar to cells transfected with the normal *CSA* promoter sequence (light gray Fig. 3A). However, we did not detect any activation of *CSA* transcription upon UVC irradiation of cells transfected with the mutant E-box construct. These results show that the consensus E-box motif of the *CSA* promoter is essential for DNA damage-induced activation of expression caused by UV radiation. However, given that the basal activity of normal or mutated forms of pCSA-Luc was not completely abolished, we could not exclude regulation of transcription of *CSA* by other endogenous transcription factors that may bind within the vicinity of the proximal promoter.

To determine whether USF transcription factors are involved in the control of *CSA* expression regulation, we cotransfected cells with the pCSA-Luc construct and increasing amounts of USF1 or USF2 expression vector or a dominant negative form of endogenous USF transcription factors (A-USF), which prevents the binding of endogenous factors to DNA (dark gray, Fig. 3B). Luciferase activity from pCSA-Luc in the presence of USF transcription factors was significantly higher (by a factor of 1.5 to 2), particularly in the presence of USF2, than in cells cotransfected with empty pCMV vector. In the presence of the construct with a mutated E-box, cotransfection with USF factor-encoding constructs did not lead to increased luciferase activity (light gray Fig. 3B); rather, luciferase activity was slightly lower than controls. Our results show that USF factors play a role in the regulation of *CSA* expression through binding to its specific consensus E-box (-260). We confirmed these findings by showing that cotransfection of cells with the pCSA-Luc construct and the dominant negative form of USF resulted in slightly lower *CSA* luciferase activity levels, by preventing the binding of endogenous USF factors

(Fig. 3B). When we cotransfected cells with pCSA-Luc construct and various forms of USF1 recombinant protein, corresponding to stress-regulated forms with specific transcriptional activity, luciferase activity was significantly increased in the presence of the phospho-activated form of USF1 (T153E) but not in the presence of the inactivated form (T153A) (Fig. 3B). The above results show that the -847/+1 *CSA* promoter is UV-inducible through a USF- and E-box-dependent mechanism.

4. UV-induced *CSA* mRNA is abolished in USF1 knock-out mice

We used a genetic approach to investigate the relative roles of USF transcription factors in the regulation of *CSA* gene expression in USF1 knock-out (KO) mice and their wild-type (WT) littermates (28).

The levels of UV-induced transcription differed between USF1 KO and WT mice, whereas basal transcription levels remained the same. Skin punch biopsy samples from WT and USF1 KO mice were cultured for 12 hours and subjected to successive pulses of UV (6 x 5 mJ/cm² every 15 min). *CSB* mRNA levels remained unchanged in WT skin biopsies. However, *CSA* mRNA levels increased between 30 min and 1 h (by a factor of between 2.5 and 3) after the last pulse of UVC and then decreased slowly to base-line levels after 5 h (Fig. 4A). These results were consistent with the results obtained using cultured cells (Fig. 1A). *Gadd45α* expression was used as a positive control, with a significant increase in *Gadd45α* transcript levels observed two hours after UV irradiation (2-3 fold). In the same experiment repeated in USF1 KO cultured skin biopsy samples, *CSA* was not induced by UVC (Fig. 4B), whereas the UV-regulated gene *Gadd45α*, which is independent of USF1, was induced under these conditions (Fig. 4B). Again, *CSB* expression was not affected by UVC. Taken together, these results confirm that USF1 is responsible for the activation of *CSA* gene transcription upon low dose UV irradiation of the skin.

DISCUSSION

CSA and *CSB* proteins are essential for the initiation of TCR, following DNA damage, for recognition of stalled RNA polymerase II on bulky DNA and for the recruitment of transcription-coupled DNA repair machinery. Thus, the control of *CSA* and *CSB* levels, in response to UVC-irradiation, is essential for the repair of DNA mismatches and for the rapid

resumption of cellular transcription. In our study, we showed for the first time that the specific expression of *CSA*, but not *CSB*, is significantly induced in response to cumulative UVC. We also confirmed that *CSA* RNA up-regulation following exposure to UVC leads to increased protein and specific localization of this protein at the nuclear matrix. We highlighted the mechanism, by which *CSA* expression is induced after cumulative low wavelength UV irradiation. Indeed, we involved for the first time the evolutionarily conserved eukaryotic basic-helix-loop-helix leucine-zipper transcription factors USF (Upstream Stimulating factor, USF1 and USF2) in the UV regulation of TCR. Indeed, in response to UVC, USF transcription factors, in particular the stress-responsive USF1 factor, regulates *CSA* expression after binding to the specific consensus E-box element (CACGTG, -260) of its promoter. USF1 and USF2 factors have been previously described to promote the transcriptional activation of many genes involved in a variety of functions and networks (stress and immune responses, cell cycle and proliferation, lipid and glucose metabolism, and the tanning response) through distinct hierarchical mechanisms (29). USF proteins stimulate gene transcription by binding to cognate E-box *cis*-regulatory elements. The USF1 transcription factor operates as a transcriptional sensor in the stress response, mediated by the p38 stress-dependent kinase (18,26), notably in response to UV. In a paralleled study, we also showed, for the first time, that the USF transcription factors are involved in the regulation of UV damage-induced DNA repair by regulating in response to UVC the expression of one essential factor of the NER subpathway, the GGR (Global Genome Repair) (30). Taken together, the USF transcription factors are thus shown to be crucial for the initiation steps of NER occurring rapidly after recognition of DNA damage. Also, because we observed a significant increase of *CSA* gene expression in human keratinocyte HaCaT cell lines, that are p53 deficient, we can eliminate an eventual regulation of *CSA* after UVC by the p53 factor. The mechanism is thus clearly different from the one that occurs for the regulation of the other NER factors DDB2 in response to UV (31). The up-regulation of NER factors through gene expression regulation after UV irradiation is proposed to allow an efficient recruitment of these factors for NER activation.

The UV-induced regulation of *CSA* expression by USF transcription factors in response to DNA damage may also be dependent on the specificity of proteins function during TCR. Indeed, differences in the DNA damage response

have been observed for *CSA* and *CSB*, with *CSB* $-/-$ cells but not *CSA* $-/-$ cells showing hypersensitivity to oxidative stress (32). It has also been shown that *CSB*, but not *CSA*, is able to cleave 8-oxo-dG in oligonucleotides. However, recent studies have suggested an effect of *CSA* on 8-oxo repair immediately after DNA damage (33). It would be interesting to further analyze the role of CS proteins and to evaluate *CSA* gene expression following oxidative stress because the response to environmental factors depends largely on the type of damage and on the cellular molecular phenotype. For instance, 6-4 PP are efficiently removed by GGR, whereas TCR is the predominant pathway activated for repair of CPD and 8-oxo-dG. Defects in TCR are associated with a strong apoptotic response in fibroblasts but not in keratinocytes, whereas defects in GGR seem to have no effect on the apoptotic response of either cell type. The increase of apoptosis in response to DNA damage has been previously associated with an increase of p53 levels following the stalling of RNAPII at sites of DNA damage (34). Previous findings have shown that *CSB* expression is under the control of HIF-1, and plays a major role during hypoxic response, redistributing p300 between HIF-1 and p53 (35). Each TCR factor (*CSA* or *CSB*) seems to be under control of specific transcription factors dependently to the environmental and cellular induction, for example UV irradiation or oxidative stress.

The specific control of *CSA* protein levels in response to UVC and DNA damage may be correlated to its major role in TCR and to the overall regulation of DNA repair after RNA pol II stalling and after initiation of TCR by the *CSB* protein. Although the *CSB* homolog in yeast (called *RAD26*) is essential for TCR, the apparent yeast homolog of the human *CSA* gene, *RAD28*, is not crucial for TCR (36). Indeed, deletion of *RAD28* gene does not lead to increased cell death due to UV radiation (37). In human, CS proteins functions are distinct and crucial, mutation of *CSA* or *CSB* genes are both associated with genetic disorders that present slightly different phenotypes. It is clearly established that a large part of *CSB* protein is found associated to chromatin and to RNA pol II, even in the absence of DNA damage (38). By contrast, *CSA* does not interact with RNAPII (11). It has been shown a clear and rapid increase in the interaction of *CSB* with the chromatin bound-RNAPII complex upon UV irradiation. Furthermore, previous studies of normal cells at early times after UV irradiation have shown that, in addition to *CSA*, the RNAPII/*CSB* complex is also associated with DDB1 and subunits of the COP9 signalosome

FOOTNOTES

(CSN) complex (11). CSN differentially regulates the ubiquitin ligase activity of the DDB2 and CSA complexes in response to UV irradiation (10). CSA is not essential for the recruitment of NER proteins, but it is required, in cooperation with CSB, for the recruitment of XAB2, the nucleosomal binding protein HMGN1 and TFIIS, thus triggering DNA repair mediated by XP complexes and PCNA protein (39). The regulation of CSA protein levels after UV induction is thus essential for the recruitment and stabilisation of the initiation complex on the chromatin.

It has also been previously shown that UV exposure leads to the ubiquitination and subsequent degradation of the large subunit of RNA pol II via the proteasome. CS-deficient cells do not undergo this specific ubiquitination process (12). Following UV irradiation, CSB is degraded at a late stage of the repair process through a proteasome- and CSA-dependent mechanism. Both RNA pol II and CSB degradation are required for the recovery of transcription after TCR (17). The E3 ubiquitin ligase CSA, seems to act as a key regulator of these proteins at early and late stages of TCR. It also plays an important role in the regulation of transcription following TCR recovery. For example, loss of the CSA/CSB ubiquitination pathway in CS-deficient cells leads to increased p21 (Cdkn1a) but not p53 levels after UV induction (40). This over-abundance of p21 in these cells affects several pathways involved in the DNA damage response, including checkpoint-mediated cell cycle arrest, transcription, apoptosis, and DNA repair. In such cases, the cell cycle is thus slowed down. Although the control of p21 is not essential for DNA repair, it is important for cell cycle progression and transcription regulation (41). A lack of RNA pol II or CSB proteosomal degradation after ubiquitination by CSA may lead to an increase in the expression of several genes, by immobilizing RNAPII at sites of damaged DNA, and may thus cause the deregulation of various cellular pathways.

In conclusion, the transcriptional regulation of DNA repair proteins involved in GGR and TCR seems to be particularly important in the response to DNA damage and to UV irradiation at skin level. Elucidation of the molecular processes involved in this regulation may help us to understand how cells are able to rapidly and efficiently repair DNA damages without compromising DNA replication, transcriptional regulation or cell division.

This work was supported by the “Ligue National contre le Cancer – Comités Départementaux du Grand Ouest” and the “Association pour la Recherche contre le Cancer - ARC” foundations. Yorann Baron has been successively supported by the Conseil Général Région Bretagne (ARED) and the ARC PhD fellowship programs. Sebastien Corre was supported by the CHU-research program. We would also like to acknowledge the Rennes University, the CNRS and the IFR-140 for their support and facilities. The authors would like to thank Guillemette Ramey and Jean-Christophe Deschemin for animal care and genotyping.

REFERENCES

1. Lehmann, A. R. (2003) *Biochimie* **85**, 1101-1111
2. Sarasin, A., and Stary, A. (2007) *DNA Repair (Amst)* **6**, 265-269
3. Nospikel, T. (2009) *Cell Mol Life Sci* **66**, 994-1009
4. Tornaletti, S. (2009) *Cell Mol Life Sci* **66**, 1010-1020
5. van Hoffen, A., Natarajan, A. T., Mayne, L. V., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H., and Venema, J. (1993) *Nucleic Acids Res* **21**, 5890-5895
6. van der Horst, G. T., Meira, L., Gorgels, T. G., de Wit, J., Velasco-Miguel, S., Richardson, J. A., Kamp, Y., Vreeswijk, M. P., Smit, B., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Friedberg, E. C. (2002) *DNA Repair (Amst)* **1**, 143-157
7. Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1992) *Cell* **71**, 939-953
8. Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R. E., Hoeijmakers, J. H., and Vermeulen, W. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 7643-7653
9. Newman, J. C., Bailey, A. D., and Weiner, A. M. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9613-9618
10. Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A. F., Tanaka, K., and Nakatani, Y. (2003) *Cell* **113**, 357-367
11. Foustero, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A. A., and Mullenders, L. H. (2006) *Mol Cell* **23**, 471-482
12. Luo, Z., Zheng, J., Lu, Y., and Bregman, D. B. (2001) *Mutat Res* **486**, 259-274
13. Bregman, D. B., Halaban, R., van Gool, A. J., Henning, K. A., Friedberg, E. C., and Warren, S. L. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11586-11590
14. Anindya, R., Aygun, O., and Svejstrup, J. Q. (2007) *Mol Cell* **28**, 386-397
15. Kamiuchi, S., Saijo, M., Citterio, E., de Jager, M., Hoeijmakers, J. H., and Tanaka, K. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 201-206
16. Saijo, M., Hirai, T., Ogawa, A., Kobayashi, A., Kamiuchi, S., and Tanaka, K. (2007) *Mol Cell Biol* **27**, 2538-2547
17. Groisman, R., Kuraoka, I., Chevallier, O., Gaye, N., Magnaldo, T., Tanaka, K., Kisselev, A. F., Harel-Bellan, A., and Nakatani, Y. (2006) *Genes Dev* **20**, 1429-1434
18. Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. (2001) *Embo J* **20**, 5022-5031
19. Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D. C., Vaultont, S., Goding, C. R., and Galibert, M. D. (2004) *J Biol Chem* **279**, 51226-51233
20. Pfaffl, M. W. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**, e45
21. Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D., and Broach, J. R. (1993) *Genes Dev* **7**, 592-604
22. Metivier, R., Gallais, R., Tiffoche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R. Z., Carmouche, R. P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., Benes, V., Jeltsch, A., Gannon, F., and Salbert, G. (2008) *Nature* **452**, 45-50
23. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003) *Cell* **115**, 751-763
24. Cereghini, S., Blumenfeld, M., and Yaniv, M. (1988) *Genes Dev* **2**, 957-974
25. Galibert, M. D., Miyagoe, Y., and Meo, T. (1993) *J Immunol* **151**, 6099-6109
26. Corre, S., Primot, A., Baron, Y., Le Seyec, J., Goding, C., and Galibert, M. D. (2009) *J Biol Chem* **284**, 18851-18862
27. Ferre-D'Amare, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G., and Burley, S. K. (1994) *Embo J* **13**, 180-189
28. Vallet, V. S., Casado, M., Henrion, A. A., Bucchini, D., Raymondjean, M., Kahn, A., and Vaultont, S. (1998) *J Biol Chem* **273**, 20175-20179
29. Corre, S., and Galibert, M. D. (2005) *Pigment Cell Res* **18**, 337-348
30. Baron, Y., Corre, S., Mouchet, N., Vaultont, S., Prince, S., and Galibert, M. D. (2009) *submitted* 2009
31. Tan, T., and Chu, G. (2002) *Mol Cell Biol* **22**, 3247-3254
32. de Waard, H., de Wit, J., Andressoo, J. O., van Oostrom, C. T., Riis, B., Weimann, A., Poulsen, H. E., van Steeg, H., Hoeijmakers, J. H., and van der Horst, G. T. (2004) *Mol Cell Biol* **24**, 7941-7948
33. Dianov, G., Bischoff, C., Sunesen, M., and Bohr, V. A. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**, 1365-1368
34. D'Errico, M., Lemma, T., Calcagnile, A., Proietti De Santis, L., and Dogliotti, E. (2007) *Mutat Res* **614**, 37-47

35. Filippi, S., Latini, P., Frontini, M., Palitti, F., Egly, J. M., and Proietti-De-Santis, L. (2008) *Embo J* **27**, 2545-2556
36. Li, S., Ding, B., LeJeune, D., Ruggiero, C., Chen, X., and Smerdon, M. J. (2007) *DNA Repair (Amst)* **6**, 1596-1606
37. Bhatia, P. K., Verhage, R. A., Brouwer, J., and Friedberg, E. C. (1996) *J Bacteriol* **178**, 5977-5988
38. van Gool, A. J., Citterio, E., Rademakers, S., van Os, R., Vermeulen, W., Constantinou, A., Egly, J. M., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J. H. (1997) *Embo J* **16**, 5955-5965
39. Fousteri, M., and Mullenders, L. H. (2008) *Cell Res* **18**, 73-84
40. Cleaver, J. E., Hefner, E., Laposa, R. R., Karentz, D., and Marti, T. (2007) *Neuroscience* **145**, 1300-1308
41. Savio, M., Coppa, T., Cazzalini, O., Perucca, P., Necchi, D., Nardo, T., Stivala, L. A., and Prosperi, E. (2009) *DNA Repair (Amst)* **8**, 778-785

Figure 1: CSA expression is up-regulated in mouse keratinocytes after low-dose UVC irradiation.

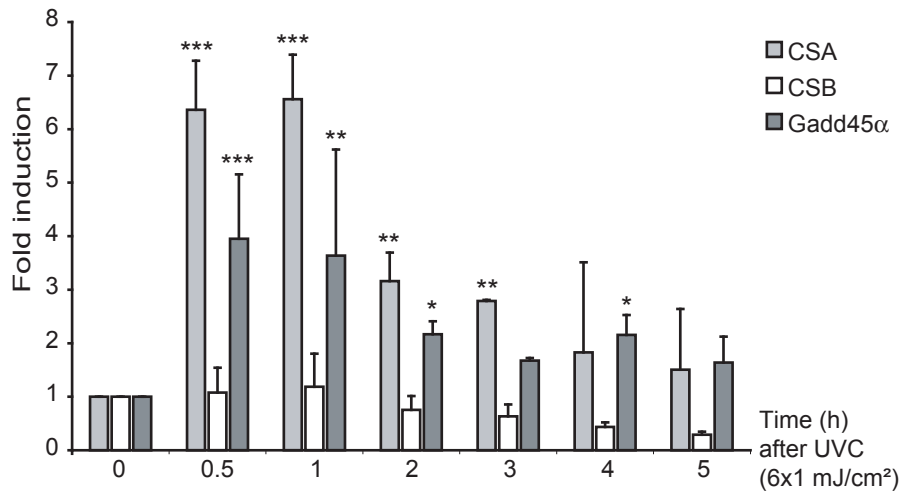
(A) XB2 mouse keratinocytes were irradiated with six successive 1 mJ/cm² UVC pulses at 15 min intervals and harvested at the indicated times after the last UV pulse. Total RNA was extracted and CSA and CSB transcripts were quantified by RT-qPCR. Data obtained following UV treatment are expressed relative to controls (no UV treatment). The *HPRT* transcript was used as a calibrator. *Gadd45α* expression levels after UVC were used as a positive control for the up-regulation of transcription after stimulation of XB2 keratinocytes. Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-tailed Student's t-test) between control and irradiated samples * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001.

(B) Western blot analysis of XB2 cells irradiated as previously described, α-Tub protein level was used as loading control. The experiment was performed several times.

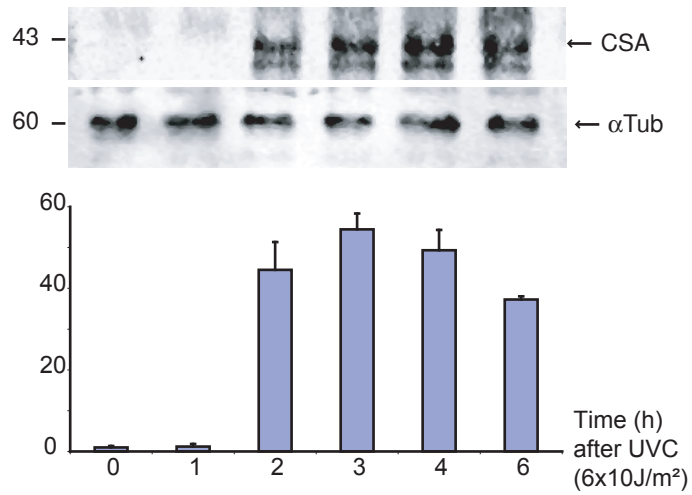
(C) CSA in XB2 cells, irradiated as described above, was detected by immunofluorostaining using the specific anti-CSA antibody. Secondary TRITC-coupled antibody was used to detect the protein; DAPI was used to visualize cell nuclei.

Figure 1

A RT-qPCR



B Western blot analysis



C Immunofluoro-staining of CSA after UVC induction of XB2 keratinocytes

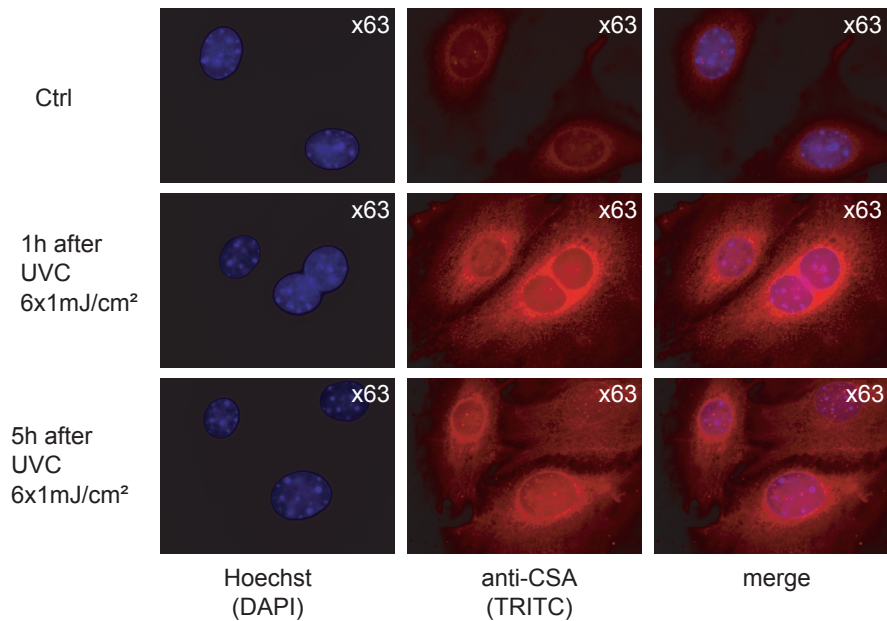


Figure 2: USF family members interact with the CSA proximal promoter *in vitro* and *in vivo*

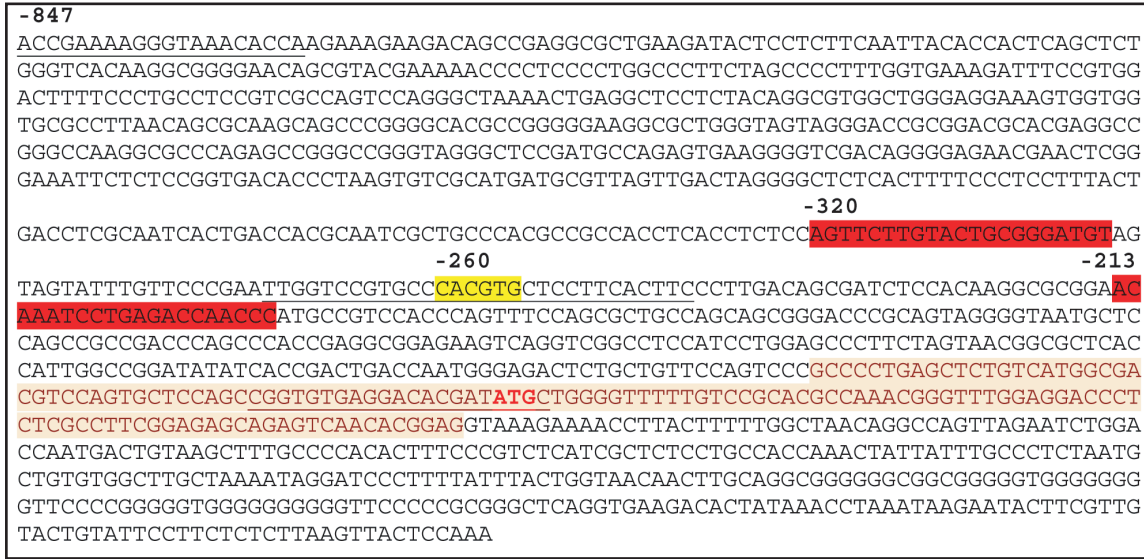
(A) Diagram showing the human CSA promoter sequence. Conservation of the E-box (-260) region in mammals (see as below) is highlighted in yellow. Positions of the primers used for CHIP analysis, band shift and luciferase assays, relative to the transcription start site, are given (underlined).

(B) *In vivo* chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) with human HaCaT cells using anti-USF1 or USF2, or non-specific antibody as a negative control (NS). (B) DNA recovered from non- cells in basal conditions was subjected to PCR using primers specific for the proximal or distal CSA promoter. Irradiated HaCaT cells were harvested at the indicated times after exposure to six successive UV pulses (as illustrated in figure 1B). Recovered DNA was subjected to quantitative PCR using primers specific for the proximal CSA promoter or non specific *HSP70* proximal region. Transcript levels of irradiated cells were compared with data obtained for non-irradiated cells and non-specific ChIP. Results are expressed as fold enrichment in irradiated cells.

(C) *In vitro* electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using HaCaT nuclear extract and radiolabeled probes targeting the E-box of the CSA proximal promoter (-260). WT and mutated probe sequences are shown below the gels. DNA binding reactions were performed with anti-USF1, anti-USF2 or non-specific antibodies, as indicated. Cold WT probe was used, at the concentrations indicated, for competition assays. Shifted and supershifted complexes are indicated by arrows.

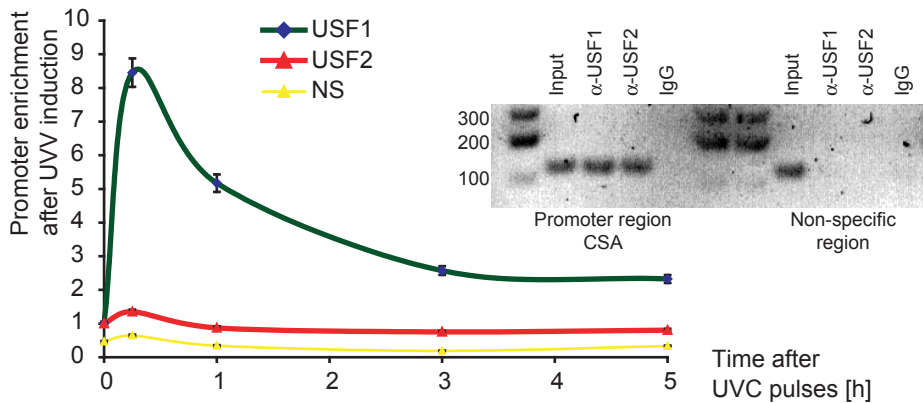
Figure 2

A



Homo_sapiens	CGAATTGGTCCGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Pan_troglodytes	CGAATTGGTCTGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Pongo_pygmaeus	CGAATTGGTCCGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Macaca_mulatta	CGAATTGGTCCGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Mus_musculus	CCAGATGGTCCGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Rattus_norvegicus	CCAGATGGTCCGTGCCCACGTGCTCCTTCACTTCCCTTG
Bos_taurus	CGAACCGGTCTGTGCCCACTTGTCTTTCCTTCCCTTG
Canis_familiaris	CAAAGCGGTCCGTGCCCACGTGCTGCTTCCCTTCCCTTG
Equus_caballus	CGAACCGGTCTGTGCCCACTTGTCTTTCCTTCCCTTG

B CHIP Analysis



C Band shift assay

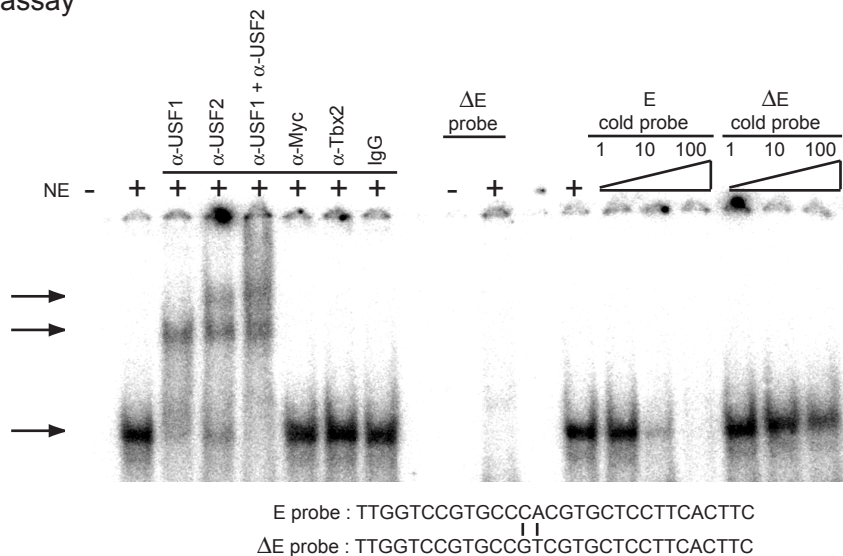


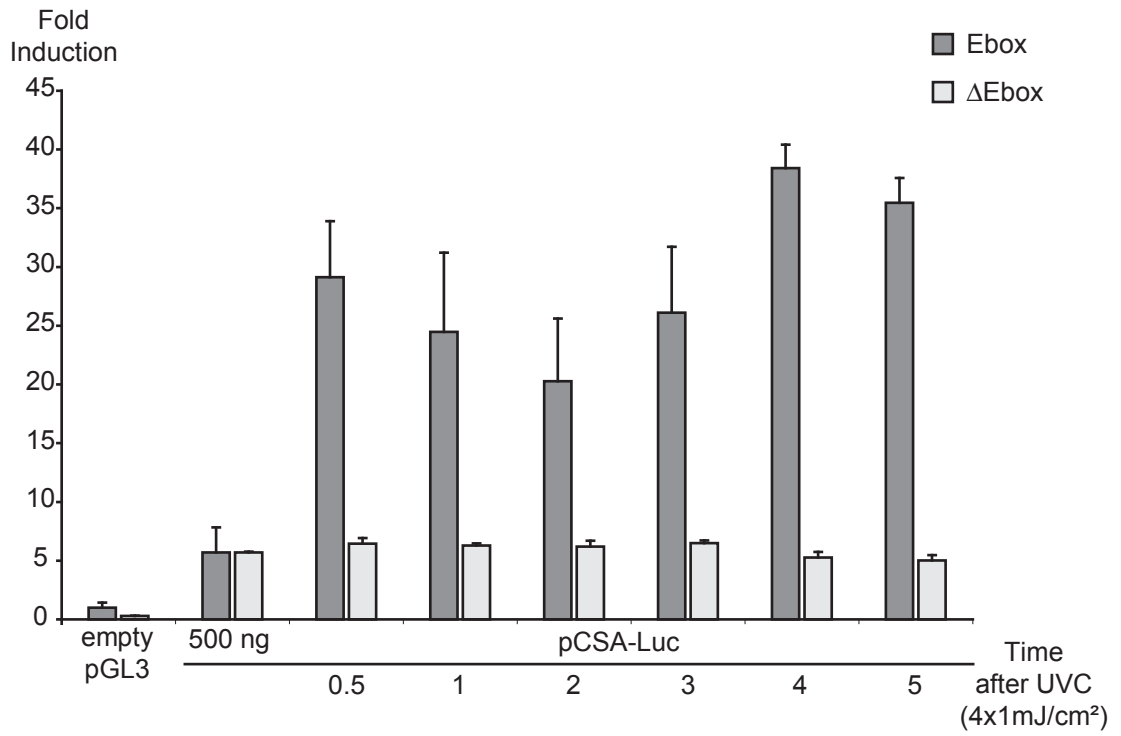
Figure 3: *In vitro* transcriptional regulation of human CSA

(A) XB2 keratinocytes were transiently transfected with WT CSA or mutated E-box constructs (Fig. 2A). 48 hours after transfection, cells were irradiated, or not (controls), with UV pulses (4 pulses 1 mJ/cm² every 15 min) and harvested at various times over 5 hours. Fold induction of luciferase was determined relative to the basal activity of the WT construct. The E-box motif was necessary for UV-induced activity of the CSA promoter.

(B) XB2 keratinocytes were transiently co-transfected with WT construct and a series of different amounts of pCMV-USF1 or pCMV-USF2 expression vectors, a dominant negative form of USF transcription factor or mutated forms of USF1, as indicated below. Fold induction of luciferase was determined relative to the basal activity of the WT construct.

Figure 3

A Luciferase assay



B Luciferase assay

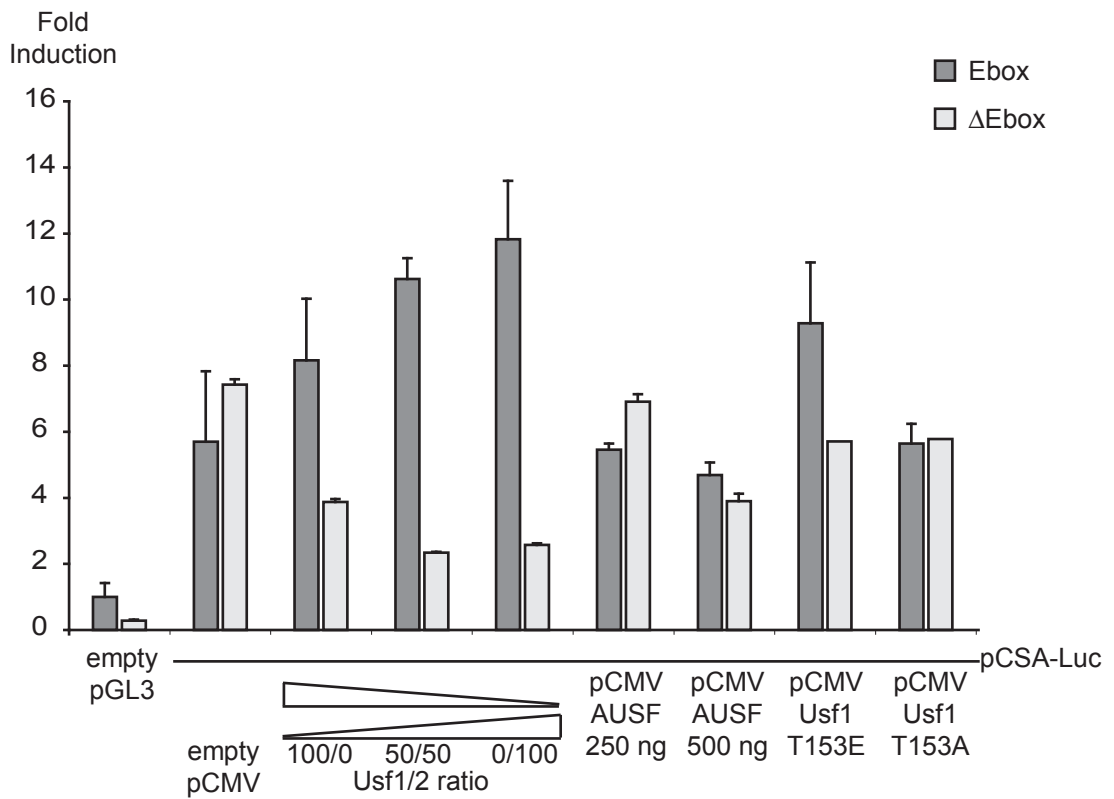
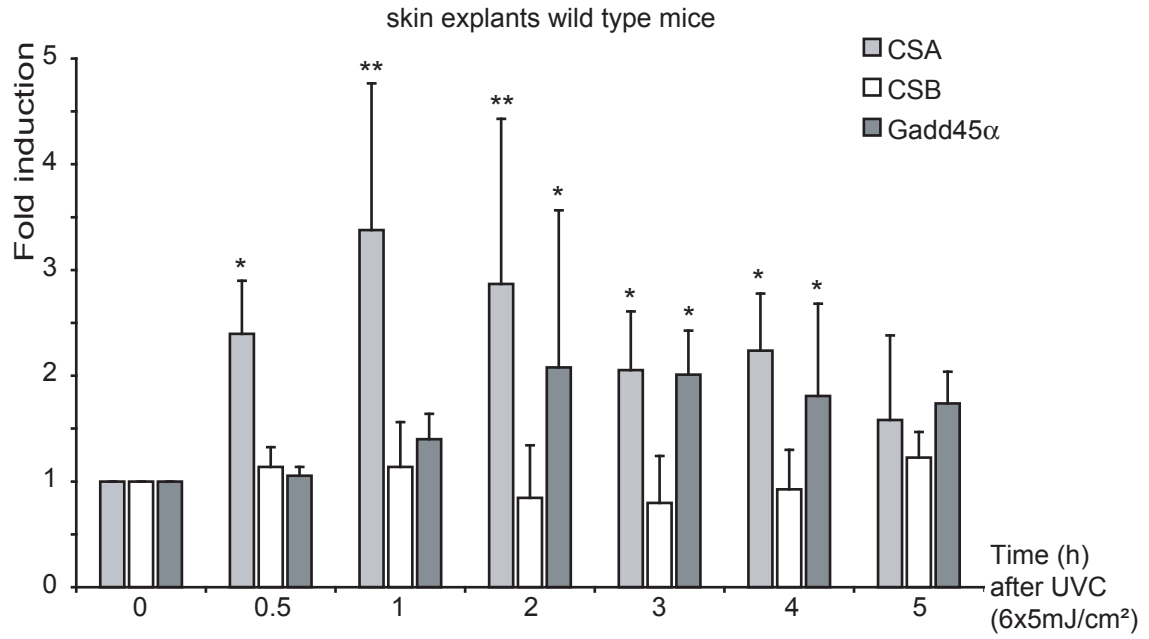


Figure 4: UV-induced CSA mRNA levels are dependent on USF1

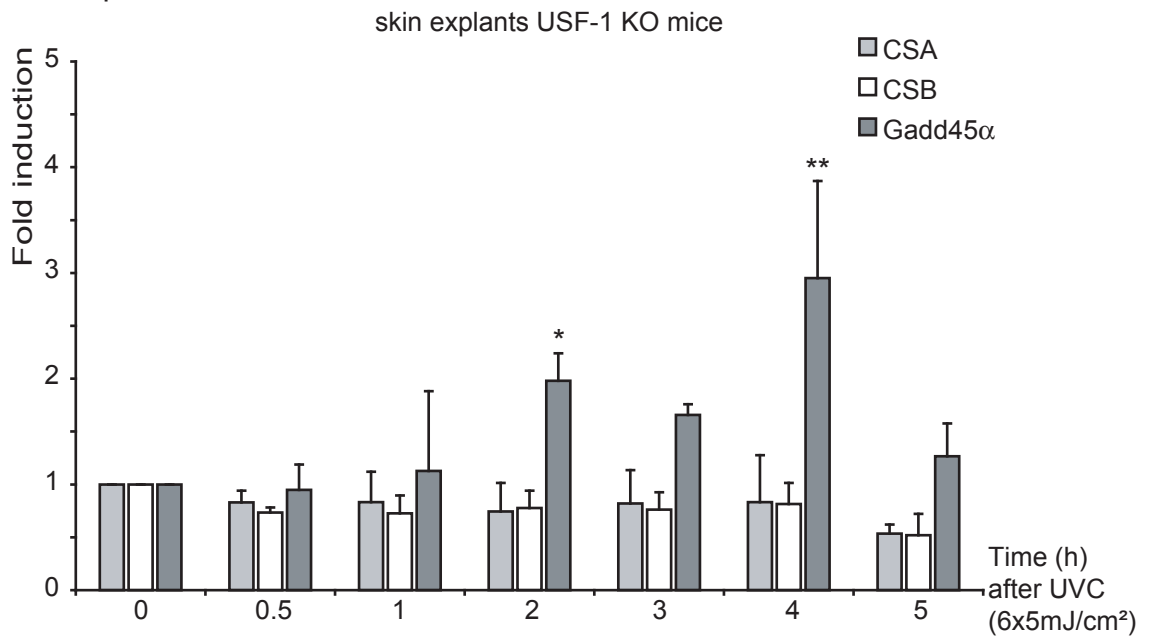
Cultured punch biopsy samples from WT mice (**A**) or USF1-KO mice (**B**) were irradiated with six successive pulses of UVC (5 mJ/cm^2) as indicated. Biopsy samples were lysed at various time points over 5h period following the last UVC pulse, total RNA was extracted and *mCSA*, *mCSB* and *mGadd45 α* transcripts were quantified by RT-qPCR. Results for UV-treated samples are expressed relative to controls (no irradiation) and the *HPRT* transcript is used as calibrator. Errors bars represent standard deviation, stars indicate statistically significant differences (two-tailed Student's t-test) between control and irradiated samples * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 4

A RT-qPCR



B RT-qPCR



Discussion et Perspectives

I - Synthèse des résultats

Les radiations UV constituent un stress permanent pour les cellules de l'épiderme, première barrière de l'organisme, car elles sont responsables de lésions sur l'ADN génomique, majoritairement des dimères de pyrimidines. La persistance de ces dommages affecte l'intégrité du génome et peut conduire à l'apparition d'un phénotype cancéreux. Afin de conserver intacte l'information génétique, les cellules ont développé des systèmes d'élimination de ces dommages UV induits, notamment le mécanisme d'excision de nucléotide (NER), principal système de réparation intervenant dans l'élimination des adduits UV. Ce mécanisme NER complexe et versatile est bien conservé chez les eucaryotes (Costa *et al.*, 2003 ; Nospikel, 2009).

Dans le NER, la reconnaissance initiale des sites endommagés est l'étape cruciale. En effet chez les eucaryotes supérieurs, l'immensité du génome de l'ordre de $3,5 \cdot 10^9$ pb impose un formidable défi de détection des quelques lésions présentes contenues dans la vaste majorité de bases intactes. Selon la localisation des dommages, on distingue deux sous voies de reconnaissance, TCR et GGR, impliquant respectivement les complexes ARNPII-CSB-CSA et XPC-HR23-centrine2. Malgré les travaux montrant l'action séquentielle de ces complexes dans ces étapes de reconnaissance, une des problématiques aujourd'hui est la régulation globale du mécanisme du NER et la régulation du niveau protéique des acteurs de ces étapes initiales. Durant mes travaux de thèse, je me suis ainsi intéressé à l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes codant les protéines HR23A et CSA.

Par une approche expérimentale combinant des études *in vivo* (RT-QPCR, ChIP, WB) et *in vitro* (EMSA, dosage luciférase) nos travaux montrent une activation transcriptionnelle UV-induite des gènes *HR23A* et *CSA* impliqués dans les deux sous voies complémentaires de reconnaissance des lésions. Cette induction est observée après répétition d'irradiations UV et est directement dépendante des facteurs de transcription USF dont des motifs de fixation sont retrouvés dans les promoteurs proximaux des gènes cibles *HR23A* et *CSA*. Comparée aux régulations transcriptionnelles précédemment observées, l'induction transcriptionnelle de *HR23A* et *CSA* survient rapidement après irradiation UV. Leur régulation peut ainsi avoir un impact direct sur le mécanisme du NER ou sur sa régulation du fait que ces deux nouvelles cibles UV-induites soient aussi impliquées dans la régulation protéique par le système ubiquitine-protéasome. De plus, nos travaux montrent une différence de régulation des deux

homologues *HR23A* et *HR23B* dont les produits ont des fonctions redondantes, ce qui conduit à une interrogation sur leur importance respective.

Enfin, l'utilisation de souris KO pour le gène *USF-1* a permis de mettre en évidence le rôle clé de la protéine *USF-1*, impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires de réponse au stress et activé par phosphorylation en réponse aux UV. L'implication de ce facteur de transcription dans la régulation UV-induite du niveau d'expression des gènes *HR23A* et *CSA* des deux voies complémentaires du TCR et GGR, établit un lien entre pigmentation UV-induite et réparation des lésions causées par les UV, deux mécanismes complémentaires bien qu'indépendants.

II - Activation transcriptionnelle UV induite des gènes *HR23A* et *CSA*

De nombreuses études sur le NER ont permis de documenter et de décrire ce mécanisme de réparation complexe. Mais si les différentes étapes sont actuellement connues, les fonctions de chaque facteur et surtout la régulation de leur niveau protéique restent à découvrir. Ainsi, chez les mammifères, il existe peu de données de régulation transcriptionnelle de gènes codant des protéines du NER. Parmi la vingtaine de facteurs impliqués, seuls les gènes *XPC* et *DDB2* ont été montrés activés de manière transcriptionnelle en réponse à une irradiation UV (Hwang *et al.*, 1999 ; Nichols *et al.*, 2000 ; Adimoolam et Ford, 2002 ; Tan et Chu, 2002). Les inductions par les UV de ces deux gènes étant tardive (16h après UV pour *XPC* et 30h pour *DDB2*), leurs impacts immédiats sur le NER reste peu probables, mais on peut envisager que cette régulation intervienne afin de reconstituer un niveau protéique suffisant en cas d'une seconde "attaque" UV. D'un point de vue mécanistique, cette régulation requiert la présence de *p53*, démontrée par une comparaison entre lignées sauvages et KO pour *p53*, mais l'effet direct n'a pas été montré. Chez la levure, davantage de gènes ont été montrés activés en réponse à une irradiation, dont les gènes *RAD2*, *RAD7*, *RAD16* ou *RAD23* (Robinson *et al.*, 1986 ; Madura et Prakash, 1990 ; Bang *et al.*, 1995 ; Scott et Waters, 1997). Dans le cas de *RAD23*, cette induction n'a pas été retrouvée pour ses homologues *HR23A* et *B* chez la souris (van der Spek *et al.*, 1996).

Ce manque de données chez les mammifères, nous a ainsi conduit à examiner la régulation transcriptionnelle des acteurs du NER par une approche quelque peu différente de l'irradiation unique majoritairement expérimentée. Ainsi en effectuant une succession de faibles doses de radiations UV, nous avons voulu reproduire expérimentalement un flux d'UV se rapprochant ainsi des conditions physiologiques d'exposition des cellules de l'épiderme aux

radiations UV solaires. De manière intéressante, par cette approche expérimentale nous avons observé l'induction transcriptionnelle du gène *HR23A*, dépendante de l'intensité et du nombre d'irradiation, alors que cette activation n'est pas visible par un protocole d'irradiation unique (van der Spek *et al.*, 1996). Ces résultats ne sont pas en réelle contradiction avec l'étude de Van der Speck car les approches sont différentes, mais ils montrent l'importance du protocole d'irradiation par répétition d'un même stress. Ainsi, utilisant ce même protocole expérimental mais avec un temps de récupération des cellules plus court, nous observons l'induction du gène *CSA* pour lequel aucune donnée de variation transcriptionnelle n'a, à ce jour, été publiée. Dans le même temps, nous avons examiné les transcrits d'autres gènes codant des acteurs des étapes de reconnaissance du NER et des données très préliminaires semblent indiquer que le gène *DDB1* serait aussi inductible dans les conditions expérimentées, selon une cinétique comparable au gène *CSA* (données préliminaires, non publiées). L'induction de ces trois gènes est observée selon un même mode expérimental mais à des temps différents ce qui met en évidence l'importance de la fenêtre d'observation. Nous pouvons donc supposer l'existence d'autres gènes régulés de manière transcriptionnelle à des temps distincts ou selon des conditions d'exposition différentes. Il serait intéressant d'examiner les effets biologiques de divers modalités expérimentales variant les doses délivrées et les temps de récupération. L'observation morphologique des cellules après irradiation suggère que la succession de faibles doses d'UV (notre protocole expérimental) induise moins de mort cellulaire qu'une unique forte dose. Ces observations sont à confirmer, par exemple par évaluation du pourcentage de viabilité cellulaire (dosage MTT).

Ces inductions ont été obtenues en utilisant des longueurs d'ondes courtes, UV-C, majoritairement utilisés dans l'étude de la réparation car l'exposition à de très faibles doses est suffisante pour générer davantage de dommages que des temps d'exposition similaire de longueurs d'ondes plus élevées. Nous avons cependant réalisé des expériences préliminaires d'induction du gène *HR23A* par une dose unique d'UV-A en présence ou non de 8-MOP, agent photosensibilisant qui, après activation photonique, induit la formation de liaisons covalentes (Heshmati, 2003). Ainsi, alors qu'une dose unique d'UV n'induit pas d'augmentation significative du transcrit du gène *HR23A*, l'ajout préalable de photo-sensibilisant potentialise l'effet de l'irradiation et résulte en une induction significative du gène *HR23A*. Ces observations sont en accord avec nos résultats obtenus après succession de courtes irradiations par comparaison à une unique et longue exposition. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences en irradiant les cellules par une répétition de faibles doses d'UV-A et/ou d'UV-B

qui sont d'un meilleur impact physiologique car naturellement présents à la surface terrestre à l'inverse des UV-C normalement bloqués par la couche d'ozone.

III - Impact de l'induction transcriptionnelle des gènes *HR23A* et *CSA*

La mise en évidence de l'induction transcriptionnelle des gènes *HR23A* et *CSA* est intéressante de par leur implication dans les deux sous voies complémentaires (GG-NER et TC-NER) de l'initiation du NER et d'autre part, par leur rôle ambigu à l'interface entre le mécanisme de NER et la régulation de celui-ci par l'ubiquitination de protéines qui conduit à une dégradation par le protéasome ou au contraire à leur stabilisation. De plus, des données préliminaires sur le gène *DDB1* suggèrent une même activation transcriptionnelle UV-induite. Ces trois protéines sont impliquées dans les trois sous voies de reconnaissance des lésions: la présence de *HR23A* stabilise le complexe XPC de reconnaissance des lésions du GG-NER, *DDB1* en complexe avec *DDB2* augmente la distorsion de l'ADN améliorant leur reconnaissance par le complexe XPC-*HR23A* dans le GG-NER et enfin *CSA* en association avec *CSB* et l'ARNPII bloquée au niveau de la lésion permet le recrutement du TFIIF pour la poursuite du mécanisme. Leur régulation transcriptionnelle suggère l'importance d'un niveau protéique élevé, ou un renouvellement protéique nécessaire pour cette étape initiale cruciale du NER. L'impact de leur régulation transcriptionnelle dans le NER pourra être évalué par comparaison du temps d'élimination des lésions (6-4) PP et CPD entre des souris sauvages et des souris KO *USF-1*, en quantification globale sur l'ADN extrait par la technique ELISA ou par visualisation directe sur des coupes immuno-histologiques à l'aide d'anticorps dirigés contre les (6-4) PP et les CPD. Une quantification de l'ARNm de gènes référents permettrait aussi d'évaluer l'efficacité de la reprise de la transcription dans la sous voie du TC-NER, en fonction de la présence ou non du facteur de réponse aux radiations UV, *USF-1*.

Chez les mammifères qui possèdent deux homologues de *RAD23*, *HR23A* et *HR23B*, il a été montré que ces protéines possédaient des fonctions hautement redondantes mais que, malgré leur présence interchangeable, la majorité du facteur de reconnaissance XPC était retrouvé associé à l'homologue *HR23B* (Masutani *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1997 ; Sugawara *et al.*, 1997 ; Okuda *et al.*, 2004). Nos travaux montrent que parallèlement à l'induction d'un facteur quatre de la protéine *HR23A*, on observe une perte progressive de la protéine *HR23B*. Ainsi, il est envisageable que les deux observations soient fonctionnellement liées, et que l'induction de *HR23A* permette de compenser la perte de *HR23B* observée dans nos conditions. Après irradiation UV, il serait ainsi intéressant d'étudier l'évolution de la nature

du partenaire HR23A ou B associé à XPC dans le complexe XPC-HR23 de reconnaissance des lésions UV-induites. Ceci pourrait être réalisé par exemple par co-immunoprécipitation de la protéine XPC, de 1h à 8h après répétitions d'irradiation UV, suivi d'un Western Blot quantitatif en utilisant un anticorps dirigé contre HR23A ou HR23B.

Outre leur importance relative en tant qu'acteurs "directs" du NER, les deux protéines HR23A et CSA jouent aussi un rôle dans le processus d'ubiquitination et la régulation de l'enchaînement des étapes de celui-ci. Malgré que leurs fonctions dans ce mécanisme soient distinctes, le fait que ces deux facteurs soient régulés par les UV et que des données préliminaires suggèrent qu'il en soit de même pour le gène DDB1 est assez troublant. En effet, CSA comme DDB1 font partie d'un complexe E3 ligase responsable du transfert de l'ubiquitine sur le substrat (dont DDB2 ou CSB), et HR23A est une enzyme E4 impliquée dans l'exportation ou protection du substrat ubiquitiné (XPC, p53). Ainsi l'induction transcriptionnelle de ces facteurs pourrait aussi avoir un effet sur la régulation du niveau protéique par le système UPS. La régulation de *HR23A* et de *CSA* (et probablement de *DDB1*) pourrait avoir un impact sur le taux protéique d'acteurs du NER comme DDB2, XPC, CSB ou encore p53 impliqué à la fois dans la régulation transcriptionnelle de gènes du NER (XPC, DDB2) mais surtout dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire, le temps de la reconnaissance et de l'excision des lésions.

L'induction de CSA en réponse aux UV pourrait conduire à une augmentation de l'ubiquitination des protéines DDB2 et CSB aboutissant à leur dégradation. La dégradation de DDB2 pourrait entraîner la dissociation du complexe DDB, libérant la lésion de type CPD qui pourra alors être fixée par le complexe XPC initiant ainsi la poursuite du NER (Sugasawa, 2009). Par ailleurs la dégradation de CSB pourrait permettre la dissociation du complexe RNAPII-CSB-CSA libérant la lésion pour l'association du complexe TFIIH et la poursuite du NER (Groisman *et al.*, 2006). Un élément de réponse à cette hypothèse pourrait être apporté par la quantification du niveau protéique des substrats DDB2 et CSB après irradiation UV, dans des lignées cellulaires KO USF-1, comparées aux lignées sauvages dans lesquelles on observe l'induction de la protéine CSA. L'absence d'induction de CSA dans les lignées KO USF-1 devrait entraîner de manière indirecte l'accumulation de DDB2 ou CSB par absence de dégradation par le système ubiquitine-protéasome.

Le rôle des protéines HR23 dans le système UPS apparaît plus complexe. En effet, ces deux facteurs sont des protéines E4 possédant des domaines UBA et UBL permettant leur liaison à l'ubiquitine et au protéasome. La fixation du substrat peut entraîner sa protection ou faciliter son exportation au protéasome. Ainsi les protéines HR23 stabiliseraient XPC

probablement par protection de la dégradation par l'UPS. En faveur de cet argument, des travaux chez la levure montrant que RAD4 (l'homologue de XPC chez la levure) est dégradé par l'UPS en l'absence de RAD23 (Gillette *et al.*, 2006).

De la même manière, l'influence des protéines HR23 sur la stabilité de la protéine p53 reste mal comprise. Alors que la suppression de la protéine HR23A entraîne l'accumulation de p53, sa surexpression déstabilise le complexe, p53 polyubiquitiné-HR23A-protéasome 26S, ce qui résulte aussi en une accumulation de p53 (Glockzin *et al.*, 2003 ; Brignone *et al.*, 2004). Il ressort néanmoins de ces données divergentes que les variations stoechiométriques fines du niveau d'expression de la protéine HR23A influent fortement sur la stabilisation de p53. L'induction de *HR23A* en réponse aux UV pourrait ainsi participer au maintien du niveau de p53, parallèlement à la boucle de stabilisation/dégradation via MDM2. On pourrait ainsi émettre l'hypothèse qu'après irradiation UV, la fraction poly-ubiquitinée de p53 liée à HR23A pourrait être protégée de la dégradation et constituer un réservoir disponible de p53.

L'impact de l'induction de HR23A dans la régulation d'un niveau protéique semble complexe à montrer, notamment par la redondance de fonction avec l'homologue HR23B. Néanmoins, il serait intéressant de quantifier la fraction polyubiquitinée/non polyubiquitinée de substrats tels que XPC et p53 dans nos conditions de surexpression de HR23A et comparer ces données dans des cellules KO *USF-1* dans lesquelles le niveau protéique HR23A resterait basal. Quelle que soit l'étude fonctionnelle réalisée, je pense qu'il serait aussi nécessaire d'étudier l'impact d'une surexpression de HR23A, après suppression totale de l'homologue HR23B par ARN interférents (siRNA ou shRNA) et irradiation UV.

IV - Complémentation fonctionnelle des protéines HR23A et HR23B

HR23A et HR23B sont deux protéines homologues issus d'un même gène précurseur RAD23 chez la levure (Masutani *et al.*, 1994). Ces deux protéines sont codées par deux gènes distincts mais présentent une grande redondance fonctionnelle qui soulève une interrogation dans l'intérêt pour la cellule de posséder deux versions comparables d'une protéine originale. Chez la souris, à l'inverse du KO HR23A qui n'induit pas de phénotype sévère, le KO HR23B entraîne de nombreuses déficiences, notamment des retards de développement, et induit l'augmentation de mort prématurée. La délétion des deux versions HR23 est létale, probablement lié à l'implication des protéines HR23 dans la régulation de la dégradation protéique par le système UPS. L'obtention d'une lignée cellulaire double KO HR23A/B révèle un NER déficient, phénotype comparable au KO XPC, et "sauvé" par la transfection de

HR23B ou de XPC exogène (Ng *et al.*, 2002 ; Ng *et al.*, 2003 ; Okuda *et al.*, 2004). Ces données sont en contradiction avec la caractérisation du phénotype des levures KO RAD23 dans lesquelles les auteurs notaient une sensibilité moyenne aux radiations UV (Watkins *et al.*, 1993 ; Verhage *et al.*, 1996). La caractérisation de ces phénotypes amène deux interrogations: Chez la levure, la fonction de RAD23 dans le GGR est-elle assurée par un autre facteur? Chez les mammifères, comment expliquer la conservation de deux versions interchangeables d'une même protéine ancestrale? Même s'il semble exister des fonctions propres au facteur HR23B, leur redondance est frappante. Dans ce contexte, nos travaux montrant une activation transcriptionnelle par le facteur USF-1 de HR23A, la version la moins essentielle pour l'organisme, alors que parallèlement la perte de l'homologue HR23B est observée, peut suggérer que cette régulation soit nécessaire pour le maintien d'un niveau minimum de protéine HR23.

V - *HR23A* et *CSA*: Deux nouveaux gènes cibles du facteur USF-1

Comme de nombreux membres de la super famille des b-HLH-LZ (Mtf, Max, Mad ou Myc), les facteurs de transcription USF jouent un rôle central dans la réponse au stress cellulaire. Parmi les nombreux processus cellulaires impliquant ces facteurs on peut citer le contrôle de la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire et la régulation des gènes suppresseurs de tumeurs, trois processus dont la dérégulation est liée au développement tumoral (Corre et Galibert, 2005). La mise en évidence de la phosphorylation activatrice de la protéine USF-1 par la kinase p38-MAPK en réponse à un stress UV, et son implication dans la pigmentation UV-induite nous a conduit à examiner son implication dans la régulation de gènes de la réparation de l'ADN (Galibert *et al.*, 2001 ; Corre *et al.*, 2004). La famille USF comprend deux membres USF-1 et 2, codés par 2 gènes distincts dont l'organisation est comparable avec une importante homologie de séquence codante et capables d'agir sous forme d'homo et/ou d'hétéro-dimères (Sirito *et al.*, 1992 ; Lin *et al.*, 1994 ; Galibert *et al.*, 1997). Le double KO USF-1 et 2 conduit à un phénotype létal chez la souris, à l'inverse du simple KO de l'un des deux facteurs ce qui montre la complémentarité fonctionnelle des protéines USF et met en évidence leur importance. En accord nos résultats montrent une fixation des promoteurs des gènes *HR23A* et *CSA* par les deux protéines USF-1 et 2 (ChIP, EMSA et luciférase essais). En revanche, l'absence d'induction UV-dépendante de ces gènes cibles, observée chez les souris KO USF-1 montre que cette complémentarité USF-1/USF-2 ne survient pas en condition de stress UV dans les conditions observées. Ces données

montrent que, malgré la redondance de fonction des deux facteurs USF, seul USF-1 semble responsable de la réponse à un stress UV, ce qui est en accord avec son activation par la protéine p38.

L'identification de deux nouvelles cibles des facteurs de transcription USF, les gènes *HR23A* et *CSA*, enrichit le groupe de plus en plus important des gènes dont l'activation transcriptionnelle est USF dépendante. Il serait très intéressant de pouvoir identifier la globalité des cibles de ces facteurs. Ceci est aujourd'hui rendu possible par les améliorations récentes des techniques d'identification de l'ensemble des cibles d'un facteur de transcription, que ce soit par ChIP-on-ChIP (Immunoprécipitation de chromatine suivi d'une hybridation des fragments précipités sur une puce à ADN) ou par ChIP seq (Immunoprécipitation de chromatine suivi de séquençage global des séquences obtenues). La confrontation de ces données avec les résultats de puces expression comparant les variations transcriptionnelles basales et UV-induites dans les souris KO pour le gène USF-1 permettrait à la fois la visualisation des réseaux régulés et d'identifier les cibles directes de cette protéine clé.

Nos travaux montrant la régulation de *HR23A* et *CSA* par le facteur USF-1 établissent un lien entre deux processus complémentaires de protection du génome, pigmentation UV-induite et réparation des lésions UV-induites. Ces deux mécanismes sont complémentaires car par la pigmentation UV-induite, l'augmentation de synthèse de mélanine contribue à diminuer les effets mutagènes des radiations UV qui malgré cette "barrière" sont à l'origine de lésions de l'ADN réparés par le NER. Une diminution de l'efficacité de reconnaissance de ces lésions affecte le mécanisme entier et peut conduire à la persistance de dommages pouvant modifier le génome et favoriser le développement de cancers cutanés. L'implication du facteur de transcription USF-1 dans la régulation des étapes de reconnaissance des lésions par le NER ouvre des perspectives d'étude de son implication dans les carcinomes et notamment le carcinome épidermoïde qui apparaît majoritairement à partir de kératoses actiniques, lésions précancéreuses sur des zones cutanées exposées à des expositions chroniques d'irradiations UV. De plus la mise en évidence d'une modification post-traductionnelle inhibitrice de la protéine USF-1 dans des conditions de stress importants souligne l'importance de ce facteur dans la réponse au stress (Annexe 2). Ainsi, une caractérisation du gène codant la protéine USF-1 dans ces lésions pré-cancéreuses serait intéressante car elle pourrait mettre évidence des anomalies de la protéine (par mutation, perte ou duplication de la séquence codante) ou la présence de variants alléliques. De même, on peut envisager une étude génétique du facteur USF-1 dans les mélanomes de Dubreuilh, qui se développe chez les sujets âgés au niveau de

zones cutanés photoexposées. Un défaut de ce facteur clé de la réponse UV pourrait potentiellement favoriser leur développement cancéreux.

Annexes

Annexe 1:

Identification of specific Protein/DNA complexes: lessons from the ubiquitously expressed USF transcription factors of the b-HLH-LZ super family

Methods in Molecular Biology, volume "Transcription factors: methods and protocols"

(in press)

**IDENTIFICATION OF SPECIFIC PROTEIN/DNA COMPLEXES:
LESSONS FROM THE UBIQUITOUSLY EXPRESSED USF TRANSCRIPTION
FACTORS OF THE B-HLH-LZ SUPER FAMILY.**

Marie-Dominique GALIBERT^{1,2*} and Yorann BARON¹

¹ CNRS-UMR6061 Genetic and Development Institute of Rennes
Transcriptional Regulation and Oncogenesis Team,
Rennes University, FRANCE

² Department of Medical Genomics
Rennes Hospital, FRANCE

*Corresponding author:

CNRS UMR6061 Institut de Génétique et Développement de Rennes,
Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS
2 av du P^r Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes cedex, France
Tel: 0033 223 234 705 / Fax: 0033 223 234 607

mgaliber@univ-rennes1.fr

Abstract:

In order to determine how gene expression is regulated in response to environmental cues it is necessary to identify the specific interaction between transcription factors and their cognate cis-regulatory DNA elements. Here we have out-lined Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) and Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) protocols to define *in vitro* and *in vivo* USFs specific interacting sequences. The proposed procedures have been optimized for the USFs transcription factor family, allowing the identification of USF-specific targets.

Key Words: USF Transcription factors – Protein/DNA interaction – EMSA – ChIP

1. Introduction

Gene expression is a tightly regulated cell-process that in response to environmental cues allows cells to adapt precisely, in fine-tune. Gene expression is dependent on the loading of the PIC (Pre-Initiation Complex) machinery in the vicinity of the transcription start site, at the TATA-box binding-site, when present or to the initiator element (Inr) sequence (1). Subsequently, the transcription level is accurately fixed by transcription-factors of different strengths, including activators and repressors. Transcription factors (also referred to trans-elements) interact specifically to DNA-motifs (also referred to cis-elements), present in proximal and distal promoter regions and/or enhancer regions. This does not exclude possible binding downstream to the transcription start-site in exonic and/or intronic regions (2).

Cis-elements can be recognised and activated by one specific transcription factor or by members of a transcription factor family, increasing the binding-specificity complexity (3, 4). Accordingly, symmetrical E-box motifs are the principle target-binding sites for members of the conserved b-HLH and b-HLH-LZ transcription factor families (5). The canonical E-box sequence, CANNTG, is only six nucleotides long, with some potential degenerate bases, favouring a broad distribution over the genome. Albeit, only a restricted set of E-box motifs are identified as DNA control elements. Specific binding of E-box motifs is dependent on the nature of the two central nucleotides (CACCGTG; CATTCTG) and on the flanking ones (NNCANNTGNN). Together and in combination with the respective amount of active E-box binding proteins present in the cells at a given time, it will affect significantly the binding-affinity and selectivity of the different E-box-binding proteins (4, 6-8).

The b-HLH-LZ transcription factors are characterized by the presence of a DNA-binding domain: the basic region forming specific and tight interactions with the E-box nucleotides and two dimerization domains: the HLH (Helix-Loop-Helix) and Leucine-Zipper (LZ).

Dimerization is a restricted process, regulated by specific rules, and which can only occur between definite b-HLH-LZ members (*9, 10*). Dimerization is finally required for DNA interaction.

The Upstream Stimulating Factors, USFs, are members of the b-HLH-LZ family and consist of two transcription factors, USF-1 and -2, driven by two distinct genes. The human *USF-1* is located on chromosome 1 in the q22-23 region while the human *USF-2* is assigned to chromosome 19 in q13. Human USF-1 and -2 proteins which are of 43 and 44 kDa respectively, are able to homo or heterodimerize together and interact specifically to E-box sequences (*9-11*).

For these reasons we propose to investigate the required tools to identify accurate USF/E-box complexes participating in gene expression regulation. Before focusing on one putative E-box regulatory element within your favourite gene, it is well advised to perform sequence analysis by comparing the human promoter sequence to the ones present in other species. These alignments will tell you if the identified E-box element is evolutionary conserved or not. A conserved E-box, including central and flanking nucleotides, in addition to its relative position within the promoter, is generally a good candidate.

Identifying specific Protein/DNA interaction requires a combination of *in vitro* and *in vivo* assays including Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) and Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP). EMSA is based on the observation that proteins that form specific complexes with a DNA fragment (probe) migrate through low-ionic-strength polyacrylamide gels more slowly than the uncomplexed DNA fragment (free probe). In other words the protein/DNA complexes are shifted (band-shift). The inclusion in the assay of non specific competitors (salmon sperm DNA, calf thymus DNA) or poly(dI-dC) improves the sensitivity, allowing the identification in crude nuclear extracts, eukaryotic proteins that recognize specific DNA sequence elements. In this technique a radiolabelled DNA fragment

is incubated with crude nuclear extract in the presence of non-specific DNA competitors. The resulting complexes are resolved from the free probe by electrophoresis and visualized by autoradiography or with a phospho-imager (STORM), which allows the precise quantification of the Protein/DNA complexes formed (Fig. 1). The sequence specificity of the detected complexes is tested by competitions using the same cold DNA fragment in the presence or absence of mutations abrogating the E-box motif or not and with cold heterologous DNA fragments of the same length. Heterologous ds-oligonucleotide or mutated E-box ds-oligonucleotides (Fig. 1 panel C) should not affect the formation of specific protein/DNA complexes, while homologous ds-oligonucleotides should completely abolish its formation. Once the specificity of the protein/DNA complex is established, the presence of USF-members within the shifted complex can be tested by competition assays using a previously well-characterized and definite USF binding site. Specific competitions will therefore suggest the presence of USFs members within the complex. Presence of USF-1 and -2, within the shifted complex, is then resolved by the use of accurate antibodies, recognising specifically USF-1 or USF-2 and other members of the b-HLH-LZ family (Mitf, Myc...), as controls. In the case of USF-1/USF-2 heterodimers both antibodies should be use in the same assay. The new antibody-protein-DNA complex formed will migrate again more slowly than the protein-DNA complex, being retained in the upper part of the gel. By analogy this complex is super-shifted.

Taken together the EMSA experiments performed with crude nuclear extract will document the binding specificity of the nucleotide sequence and the nature of the interacting protein(s). However those *in vitro* data do not estimate the protein/DNA-interaction in living cell and chromatin context. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays have been developed to address this question (12-14). ChIP is a powerful tool to identify proteins associated with specific regions of the genome. The initial step of ChIP-assays is the cross-

linking of protein-protein and protein-DNA in live cells with formaldehyde. After cross-linking, the cells are lysed and crude extracts are sonicated to shear the DNA. Proteins together with cross-linked DNA are subsequently immunoprecipitated using in our case USFs antibodies. Protein-DNA cross-links in the immunoprecipitated material are then reversed and the DNA fragments are purified and PCR amplified. Standard PCR or Q-PCR is performed to identify the DNA sequence present in the immuno-precipitated protein/DNA complexes, using specific primers of studied genes. The limiting step of this assay is the antibody, and its ability to immunoprecipitate the target protein in a chromatin context.

In conclusion, EMSA and ChIP are complementary assays, being both required for protein/DNA interaction studies. EMSA focuses on a specific motif using an *in vitro* system with short DNA sequences (30bp) as a bait, while ChIP assays address the question *in vivo*, a much more complex situation, and will document the binding of a specific transcription within a promoter region (150-300 bp). Finally, once specific protein/DNA interaction is documented it remains essential to prove whether or not this protein/DNA complex is transcriptionally active. Again a combination of *in vitro* transcription assays (Luc-assay with WT or mutated recombinant transcription factor (pCMV-USF) and WT or E-box mutated promoter-region linked to the Luciferase reporter gene) and *in vivo* studies (qRT-PCR in a knock-out cell line, in response to various stimuli...) will establish the impact of the protein/DNA complex on transcription in response to environmental cues.

2. Materials

2.1 Cell Nuclear extract preparation

- Cold-PBS: for 1l: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ * 7H₂O; 0.2 g KH₂PO₄
- Cell Lysis Buffer (1): 10 mM Tris-Hcl (pH 7,5 @ 25°C), 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂.
(store aliquots at -20°C).
- Nuclear Lysis Buffer (2): 20mM Hepes pH 7.9, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA pH 8, 25% Glycerol (store aliquots at -20°C). Just before used add 0.5 mM DTT, 1x proteases inhibitors and 1x phosphatases inhibitors.
- 10% NP40 in H₂O
- Protease Inhibitors: cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets – (Roche Applied Science - # 1 697 498). Dissolve 1 tablet in 2 ml H₂O to prepare a stock solution at 25x. Aliquot and store at -20°C.
- Phosphatase Inhibitors (1x): 1 mM NaF (Sodium Fluoride); 40nM Na₃VO₄ (Sodium orthovanadate); 1 mM C₃H₇O₆PNa₂ (β Glycerophosphate). Prepare a stock solution at 25x in H₂O, aliquot and store at -20°C.

2.2 Probe Labelling

2.2.1 Annealing

- 10x Annealing Buffer: 500 mM Tris-Hcl (pH 7.9 @ 25°C); 1 M NaCl ;100 mM MgCl₂ ;10 mM Dithiothreitol, (corresponds to New England Biolabs® - NEBuffer 3)

2.2.2 Labelling

- γ³²P-ATP (3000 Ci/mmol) (be cautious!).
- 10x Kinase Buffer: 500 mM Tris-Hcl (pH 7,6 @ 25°C), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidine, 1 mM EDTA

- T4 polynucleotide kinase (10u/μl – Fermentas # EK0031).
- Mini Quick Spin Oligo Columns (Roche Diagnostic # 11814 397 001)

2.3 EMSA – Competition – Super Shift

2.3.1 Low ionic strength 6% polyacrylamide gel

- 10xTBE: Tris-borate electrophoresis buffer. Per litre: TRIS Base 108 g, Boric Acid 55 g, EDTA 9.3g. Working conditions 1x, pH must be at 8.3.
- Running buffer (0.5xTBE)
- 30% Acrylamide/bis-acrylamide solution: 29/1 ratio
- 10% APS: prepare 10% solution in water, aliquot in 300μl for single use, and immediately freeze at –20°C
- TEMED

2.3.2 Binding Reaction

- Band Shift Buffer: Hepes 25mM, KCl 150mM, 10% Glycerol
- poly-dIdC 1ug/μl
- DTT 10mM
- Loading Buffer 6x: 0.25% Bromophenol-Blue, 0.25% Xylene-Cyanol (XC), 30% glycerol
- Fix Solution: 10% acetic acid, 10% ethanol
- Whatman 3MM paper
- Saran wrap

2.3.3 Competition Assays

- Serial dilution of cold ds-oligonucleotides

2.3.4 SuperShift

- Antibodies: Anti-USF1 (Santa Cruz, # sc-229); Anti-USF2 (Santa Cruz, # sc-861); Anti-Tbx2 (Santa Cruz, # sc-17880), preimmune IgG (Sigma)

2.4 ChIP

2.4.1 Crosslinking step

- PBS: for 1l: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ * 7H₂O; 0.2 g KH₂PO₄
- 1.5% Formaldehyde in PBS
- 0.125 M Glycin in PBS. Filtered the solution with a 0.2 μm filter unit.

3.4.2 Chromatin preparation

- PBS: for 1l: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ * 7H₂O; 0.2 g KH₂PO₄
- NCP Buffer-1: EDTA 10 mM – EGTA 0.5 mM – Hepes 10 mM pH 6.5 – Triton X-100 0.25%
- NCP Buffer-2: EDTA 1 mM – EGTA 0.5 mM – Hepes 10 mM pH 6.5 – NaCl 200 mM
- Lysis Buffer: EDTA 10 mM – Tris-HCl 50 mM pH 8.1 – 0.5% NP40 – SDS 1%.

Just before used add 1x protease inhibitors and 1x phosphatase inhibitors

3.4.3 Immunoprecipitation

- PBS: for 1l: 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na₂HPO₄ * 7H₂O; 0.2 g KH₂PO₄
- protein A/G Sepharose Beads
- IP-buffer: EDTA 2 mM – NaCl 150 mM – Tris-HCl 20 mM pH 8.1 – Triton X-100 1%

Just before used add 1x protease inhibitors and 1x phosphatase inhibitors

- ssDNA (salmon sperm DNA): 1 μg/μl in H₂O
- Antibodies: Anti-USF1 (Santa Cruz, # sc-229); Anti-USF2 (Santa Cruz, # sc-861); Anti-Tbx2 (Santa Cruz, # sc-17880), Anti-Rabbit IgG

- Washing Buffer 1: EDTA 2 mM –Tris-HCl 20 mM pH 8.1 –
SDS 0.1% – Triton X-100 1% – NaCl 150 mM
- Washing Buffer 2: EDTA 2 mM –Tris-HCl 20 mM pH 8.1 –
SDS 0.1% – Triton X-100 1% – NaCl 500 mM
- Washing Buffer 3: Tris-HCl 10 mM pH 8.1 – EDTA 1 mM –
LiCl 250 mM – Deoxycholate 1% – NP-40 1%
- Washing Buffer 4: Tris-HCl 10 mM pH 8.1 – EDTA 1mM
- Extraction Buffer : SDS 1% - NaHCO₃ 0.1M

3.4.4 DNA preparation

- NucleoSpin Extract[®] II, Macherey Nagel (Cat. Nos. 636971), NT Buffer should be replaced by the NTB Buffer

3.4.5 Real time PCR

- Primers (10 μ M): about 20 bases, about 50% GC, amplicons of 100-150 bp
- Power SYBR[®] Green, PCR Master Mix Applied Biosystems (Cat. N^o 4367659)
- Thermocycler used: Applied Biosystems 7900 HT Fast Real Time PCR System
- PCR-program: 1x95°C 2min; 40x(95°C 10min; 95°C 15sec ; 60°C 1min)

3. Methods

3.1. Cell Nuclear extract preparation

The following protocol has been successfully used with $15\text{-}20 \cdot 10^6$ 501mel cells, and $15\text{-}20 \cdot 10^6$ HaCaT cells.

- Wash 80% confluent-cells twice with cold-PBS (2x 15 ml)
- Add 1.5 ml of cold-PBS and collect cells by scraping.
- Spin ($450 \times g$ -5 min- 4°C). Keep cells on ice and remove the supernatant.
- Resuspend gently cell-pellets with 5V of cooled-Lysis Buffer-1 by pipetting up and down several times, leave on ice 10 min.
- Add 5 μl of 10% NP40 solution (detergent) per 100 μl of cell lysate. Mix gently and incubate on ice 5 min. (*see* Note 1)
- Centrifuge 5-10 min at $13000 \times g$ - 4°C , remove the supernatant, which corresponds to the cytoplasmic fraction. Wash the nuclei pellet with 100 μl of cooled-Lysis Buffer-1. Spin again and discard the supernatant.
- Add 1V of cooled-Nuclear Buffer-2, resuspend the nuclei pellet by pipetting up and down several times, leave on ice 10 min.
- Centrifuge at high speed (10 min at $13000 \times g$ - 4°C).
- Transfer and aliquot the supernatant to pre-chilled tubes. Store at -80°C , to avoid freeze and thaw cycles
- Proceed to protein quantification on one aliquot using the Bradford method.
- Alternatively you can use a commercial nuclear extract kit.

3.1 Probe Labelling

3.1.1 Sequence design

- The oligonucleotide sequence of about 25-30 mer should be centered on the target E-box motif.

- Binding efficiency decrease significantly with short ds-oligonucleotides (12 mer) although binding remains possible (**8**).
- The length of the oligonucleotide should be the same for the radiolabelled ds-oligonucleotides and for the cold ds-oligonucleotides used as competitors.
- If SNPs are present within your sequence, I would recommend to use both sequences even though it does not affect the cognate E-box motif, it could still modify overall DNA-binding and cooperation.

3.1.2 Annealing

- Single stranded (ss) complementary oligonucleotides should be hybridized at the highest concentration (use the oligonucleotide solution stock).
- Anneal exactly the same amount of sense and anti-sense ss oligonucleotide by mixing 1 nMole of each ss oligonucleotides in 1x Annealing Buffer and complete with water up to 20 μ l. Use a thermocycler and set the following program: 2' 94°C ; ramp-cool to 25°C over a period of 45 minutes; 10' 4°C. Alternatively, place tube in a standard heating block at 90 - 95°C. Remove the heating block from the apparatus and allow cooling to room temperature (or at least below 30°C) on the workbench. Slow cooling to room temperature should take 45-60 minutes. Then, transfer to 4°C to follow cooling and store at 4°C until ready to use.
- Prepare a working solution at 5 pmole/ul by dilution (1/10).
- Comparable protocol should be followed to prepare ds-oligonucleotides competitors, store at -20°C.

3.1.3 Labelling

- 5' labelling of double stranded (ds)-oligonucleotides is performed by T4 polynucleotide kinase.

- The kination reaction is performed in a final volume of 10-20 μl in the presence of $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP.
- Mix 15pmole of ds-oligonucleotide (3 μl of the 5pmole/ μl working solution), with 1.5 μl of 10x Kinase Buffer, 1.5-3 μl of $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol), complete with water up to 14 μl and add 1 μl of T4 polynucleotide kinase (10 u/ μl).
- Incubate 30 min at 37°C
- Add 35 μl of H₂O and proceed to the labelled-probe purification with the “Mini quick Spin Oligo Columns” (Roche Diagnostic). Apply the 50 μl labelled-probe solution to the top-centre of the prepared Sephadex G-25 column bed. Elute the labelled probe (50 μl) by centrifugation (1000xg – 4min – RT) and dilute it: 1/20. Alternatively labelled probes can be recovered by Phenol/Chloroform extraction and Ethanol precipitation. But the used of the spin quick column that retains free $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP is more efficient, less time consuming and more hazard free.
- Labelled-probes and diluted samples are stored at –20°C or 4°C when used immediately.
- Probe specific activity should be check.
- Again, double stranded oligonucleotides can also be labelled with Klenow, with comparable results. In this case use protruding 5'-end with ^{32}P -dATP or ^{32}P -dCTP.

3.2 EMSA – Competition – Super Shift

3.2.1 Low ionic strength 6% polyacrylamide gel

- For a standard 20x20 cm/ 1.5 mm thick gel mix in a beaker 10 ml of 30% acrylamide/bis solution (29:1), 2.5 ml of 10xTBE and complete with water up to 50 ml. Finally add 250 μl of 10%APS and 80 μl of TEMED. Mix again; pour immediately and insert the appropriate comb (usually 20 wells, 1.5-mm).

- Allow acrylamide to polymerize at room temperature (RT); it should take about 30 minutes. (*see* Note 2)
- When you start the binding reaction, pre-run for approximately 30 min at 190V (about 20mA).

3.2.2 Binding Reaction

- Binding reactions are performed in 20 μ l final volumes. Binding reactions are performed on ice and start by the addition of 13 μ l of Band-Shift Buffer, 1 μ g of poly-dIdC, 0.5 μ l of DTT (10mM), 2-4 μ g NE, complete with water to a final volume of 18 μ l. Quick spin, shake gently and finally add 2 μ l of diluted probe (0.03pmole). (*see* Note 3)
- Shake gently and incubate on ice 20min.
- Load on the pre-run gel.
- Loading buffer should be added only in one lane as a control; and in free lanes to allow a perfect migration, with no edge effect.
- Migrate at 190V, 1h30/2h. The front dye (XC) should not run off the gel (around 2-3 cm from the bottom). Otherwise 25-mer free probes are lost.
- At the end of the run, lift up one glass plate from a corner using a spatula. Submerge for 10 min (until the dye changes colour) the gel/glass into 10% acetic acid, 10% ethanol, to fix it. Transfer the gel to a Whatman 3 MM paper, cover it with saran wrap and dry according to the dryer specification, about 30 min 80°C.
- Expose over night (regular film or imager cartridge) and quantify the percentage of shifted bands.

3.2.3 Competition Assay

- By serial dilution of the defined cold ds-oligonucleotides, prepare a range of concentrations of –50 to –1 fold molar of cold ds-oligonucleotides relative to the probe.
- For the competition assay, proceed as previously described except that 1µl of cold competitor-dilution should be added to the binding reaction. Mix and incubate on ice, before loading. Maintain an equal volume between the competition samples and the control one (no cold ds-oligonucleotides).
- For relative affinity calculation, a range of 1x, 2x, 4x, 8x... of cold ds-oligonucleotides should be used (Fig.1, panel A and B) (*Fig.1 near*).. Again mix and incubate on ice, before loading. Maintain an equal volume of 20µl between the competition samples and the control one.

3.2.4 SuperShift

- For supershift assay proceed as previously described except that 1µl (0.2 u) of antibody should be added at the binding reaction. Mix and incubate for 20min on ice, before loading.
- Alternatively, binding reaction can be performed first (20 min incubation on ice). Next, add the antibody to the binding reaction. Mix and incubate for an additional 20 min, before loading. Similar results, with the USFs antibodies are obtained in our hands.
- To evaluate USF1/USF2-heterodimer and/or USF1-, USF2-homodimer DNA-complexes, both anti-USF1 (α -USF1) and anti-USF2 (α -USF2) antibodies should be used alone and together.
- Use an unrelated antibody for the control sample; in our case we use rabbit-IgG or anti-Tbx2.

3.4 ChIP

The following protocol has been adapted from Metivier and Braustein respective procedures (*12, 14*) and has been successfully used in experiments with $15\text{-}20 \cdot 10^6$ 501mel cells, and $15\text{-}20 \cdot 10^6$ HaCaT cells (about one 80% confluent 15 cm dish, which allows to perform in parallel four immunoprecipitation using four distinct antibodies).

Day 1

3.4.1 Crosslinking step

- Wash 80% confluent-cells twice with PBS (2x 15ml)
- Add 5ml of 1.5% Formaldehyde solution to cover completely the cells, and incubate for 15-20 min at RT, under gently rotation (rotating-platform), to allow protein/protein and protein/DNA cross-linking. Crosslinking for longer periods (>30mins) may cause cells to aggregate and not sonicate efficiently.
- Quench the cross-link reaction by direct addition of 10 ml 0.125 M Glycin and incubate for 10-15 min at RT, under gently rotation (rotating-platform).
- Wash the cells twice with 10 ml of cold PBS, scrap the cells in 3 ml of cold PBS to allow complete recovery and collect them in two 2-ml Eppendorf tubes. Spin the cells 5 min at 2000xg – 4°C and resuspend each cell pellet with 250 μ l of cold PBS. Pool the samples. You should end with only one Eppendorf tube containing 500 μ l of cross-linked cells.

3.4.2 Chromatin preparation

Chromatin is recovered following several steps of washing-resuspension.

- Spin the cells 5 min at 2000xg – 4°C (*see Note 4*)
- Resuspend and wash the cells with 1ml of cold PBS
- Spin the cells 5 min at 2000xg – 4°C, discard the supernatant.
- Resuspend and wash the cells with 1 ml of cooled NCP buffer 1

- Spin the cells 5 min at 2000xg – 4°C, discard the supernatant.
- Resuspend and wash the cells with 1 ml of cooled NCP buffer 2
- Spin the cells 5 min at 2000xg – 4°C, discard the supernatant.
- Resuspend the cells in 1 ml Lysis Buffer at RT
- Sonicate for 15 seconds at power 3 and 60% output, with 1-minute refractory period between the 3 sonications. Keep the lysate on ice during this time, but remember the presence of SDS. So don't leave the lysis more than 2min on ice.
- Spin 10 min at 10000xg – RT.
- Remove 100 µl of lysate (Input) and store at –20°C until proceed to the reverse cross-linking step. The immunoprecipitation will be performed on the remaining 900 µl.

(see Notes 5 and 6)

3.4.6 Immunoprecipitation

- Beads Preparation: Prepare 500 µl of 50% protein A/G Sepharose Beads slurry. Wash 3-times the beads with 1 ml cold PBS; twice with 1 ml IP-buffer and resuspend in 500 µl IP-buffer. (see Note 7)
- Split in two the 900 µl of chromatin suspension. To each 450 µl of chromatin suspension, add 900 µl of IP Buffer, and proceed to the pre-clearing step by adding 10 µg of ssDNA (salmon sperm DNA 1mg/ml) and 100 µl of the 50% protein A/G Sepharose Beads slurry. Incubate the two 2ml-Eppendorf tubes 3-4 hours at 4°C under rocking.
- Pellet the unspecific protein A/G Sepharose Beads complexes by centrifugation at 800g for 1min at 4°C. Recover the supernatant (1400 µl per 2 ml-Eppendorf tube).
- To proceed to the Immunoprecipitation: incubate under rocking overnight at 4°C, 700 µl of supernatant with each specific antibody. In our case 15 µl of anti-USF1, 15 µl of anti-USF2,

15 μ l anti-Tbx2 and 15 μ l of Rabbit IgG, these later unrelated antibodies serve to see background pull-downs (Figure 2) (*Fig. 2 near*).

Day 2

- Add 2 μ g of ssDNA and 40 μ l of the 50% protein A/G Sepharose Beads slurry to each immuno-precipitated samples.
- Incubate 2-3 hours at 4°C under rocking
- Pellet the specific complexes by centrifugation at 800xg for 1min at 4°C and remove the supernatant.
- Wash 7-times and spin successively the specific complexes with 300 μ l of Washing Buffer 1, Washing Buffer 2, Washing Buffer 3 and finally 3-times with Washing Buffer 4. Perform the seven spins at 800xg for 1min and 4°C, and discard the supernatant.
- To recover the specific DNA/protein complexes from the beads: Extract the complexes by adding 50 μ l of Extraction Buffer to bead-pellets, shake 10min (vortex-vibrax: 1000rpm). Spin (800xg – 5min; 4°C). Remove the supernatant and store it on ice. Repeat twice the extraction step. You should end with 150 μ l of extract protein/DNA complexes.
- To reverse the crosslinking of each protein/DNA complexes (Input 100 μ l and supernatants 150 μ l): incubate the samples overnight at 65°C, under gently agitation (500rpm). Make a hole in the lid of the Eppendorf tube, using a syringe, to help evaporation and denaturation of the formaldehyde.

Day 3

3.4.7 DNA preparation

- Recover DNA from the 150 μ l reversed crosslink samples by using NucleoSpin Extract[®] II, columns (Macherey Nagel), Elute DNA in 50 μ l H₂O.

3.4.8 PCR

Standard and real time PCR assays are performed to measure genomic DNA promoter sequence enrichment present in the DNA extract within the Chromatin Immunoprecipitation samples. We initially used standard PCR to analyze *in vivo* promoter occupancy (Fig.3, panel A) (*Fig.3 near*) and now we tend to use Real-Time PCR (Fig.3, panel B), which allows us to quantify sequence fold enrichment of the studied promoter.

Sequence enrichment will be relative to IgG ChIP-control and to control-region amplification. For control-region amplification, we initially used an unrelated promoter region (the Hsp70 promoter region; **(13)**) and now with real time PCR we use distal regions of the studied promoter. In this case the control-sequence should be distant by about 2-3 kb from the E-box target promoter sequence (although it depends on sonication efficiency). Control-region amplification should also not contain conserved E-box motif.

- At least two sets of primers should be designed one centered on the target E-box sequence, and one amplifying a control-region. Sequence amplification should be of 100 to 150 nucleotides long.

- Primer should be designed carefully and validated. Generally we use a length of about 20-bases, containing 40-60% GC. Avoid sequences that might produce internal secondary structure, avoid three G or C nucleotides in a row near the 3'-end of the primer (non specific primer annealing), 3'-ends of the primers should not be complementary (production of primers dimers). For real time PCR, T_m should be between 58 and 60°C (ideally both primers should have nearly identical melting temperature). Several primer-design programs can be used with comparable results; among them we frequently use Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Primers efficiency needs to be check and specific amplification assessed by the dissociation curve profile, in the case of real time PCR.

- Real Time PCR reaction is obtained by mixing 3 pmoles of each designed Forward and Reverse primers (0.3 µl of the 10 µM stock), with 5 µl of Power SYBR[®] Green, PCR Master Mix (Applied Biosystem) to 2 µl of extracted DNA-ChIP or Input DNA samples. Complete with H₂O to a final volume of 10 µl-program.

- Sequence fold enrichment will be calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method (http://www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Real-TimePCR/AbsolutevsRelativeQuantitation/index.htm).

$$\text{Fold Induction} = 2^{(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})}$$

where : ΔC_{t1} = (Ct Target sequence – Ct Control Region) Specific ChIP

in our case USFs antibodies

and: ΔC_{t2} = (Ct Target sequence – Ct Control Region) Control ChIP

in our case IgG or unrelated antibody (anti-Tbx2).

4. Notes

1. Cell Lysis can be checked under the microscope by the addition of the Trypan Blue solution to an aliquot of cells. The dye is excluded from intact cells, but stains the nuclei of lysed cells. When trained you do not need to use Trypan Blue anymore.

2. It is well advised to prepare the gels on Day 1 and to perform the assay on Day 2. In this case to avoid that the acrylamide-gel dries, humidify the upper part with 0.5xTBE soaked-tissue, wrap in saran and place in the cold room. On Day 2, remove the comb; complete the assembly of the gel unit; add running buffer in the upper and lower tanks; wash the wells

with running buffer (0.5xTBE) and remove the bubbles that would interfere with the migration.

3. Each set of binding assays must include a control in which no protein is added (free-probe only).

4. Samples can be stored at this step for at least 3 days at -80°C , in this case wash with cold PBS the cells previous follow up.

5. Sonication is used to disrupt the cross-linked chromatin fibres. It is crucial to generate the appropriate length of chromatin fragments as it can greatly affect the read-out obtained at the end of the procedure. A length of 1000bp is accepted as optimal. The sonication step has to be set up according to the sonicator model present in your lab. The present settings are to be used with a Sonifier Cell Disruptor II W450 from Branson, with a 3mm microtip probe.

6. To check the efficiency of sonication, take 15 μl of the lysate. Load the sample onto a 1% agarose gel and visualize by Ethidium Bromide staining. Repeat these latter steps until the desired fragment size is obtained.

7. Bead preparation should be performed the previous day and stored at 4°C .

5. References

1. Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20:253-9.

2. Jones FS, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. Identification and characterization of the promoter for the cytotoxic gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:6497-501.
3. Blackwell TK, Huang J, Ma A, et al. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* 1993; 13:5216-24.
4. Blackwell TK, Weintraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 1990; 250:1104-10.
5. Baxevanis AD, Vinson CR. Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3:278-85.
6. Aksan I, Goding CR. Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 1998; 18:6930-8.
7. Halazonetis TD, Kandil AN. Determination of the c-MYC DNA-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:6162-6.
8. Galibert MD, Miyagoe Y, Meo T. E-box activator of the C4 promoter is related to but distinct from the transcription factor upstream stimulating factor. *J Immunol* 1993; 151:6099-109.
9. Sirito M, Lin Q, Maity T, Sawadogo M. Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:427-33.
10. Sirito M, Walker S, Lin Q, Kozlowski MT, Klein WH, Sawadogo M. Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* 1992; 2:231-40.
11. Corre S, Galibert MD. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 2005; 18:337-48.
12. Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, Broach JR. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* 1993; 7:592-604.
13. Corre S, Primot A, Sviderskaya E, et al. UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38 activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 2004.
14. Metivier R, Gallais R, Tiffocche C, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; 452:45-50.

Acknowledgment: This work was supported over the years by the LNCC – “Comités Départementaux du Grand Ouest” and the ARC cancer care fundings. We would also like to thank the CNRS, University of Rennes and Brittany Region for their support.

Figure 1: E-box Band Shift & Competition Assays

Panel A: Free probe or unbound radio-labelled ds-nucleotide migrate at high mobility compared to the Protein/DNA complexes. Binding specificity of the Protein/DNA complex is evaluated by competition. A 1-fold excess (1x) of homologous cold competitor is diminished by 2 the Protein/DNA complexes formed. Increasing the amount of cold homologous competitor leads to the loss of the Protein/DNA complexes. These competitions highlight specific Protein/DNA complexes, obtained between the labelled sequence and proteins present in the nuclear extract used (NE). Homologous competitors able to compete protein/E-box complexes as efficiently are named Class I. They include the WT cold-probe but also mutated ds-oligonucleotide that does not affect the protein/E-box interactions (Panel C).

Panel B: Competition assays performed with Class II and III competitors.

Class III competitors are not able to interfere with the formation of specific protein/E-box complexes. They include all ds-oligonucleotides mutated within the core E-box motif (CACGTG). Class II competitors are able to interfere with the formation of specific protein/E-box complexes but with lesser extend than Class I. They include mutated db-oligonucleotide within the flanking E-box nucleotides; those mutations decrease the binding affinity towards a specific transcription factor.

Panel C: Schematic representation of radiolabelled-probe and competitors used in this assay. The 32 ds-nucleotide probe is centered on the Ebox sequence of the C4 promoter gene (8).

Ebox Band Shift Assays & Competition Assays

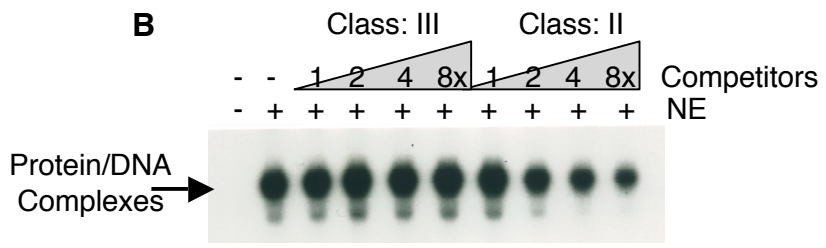
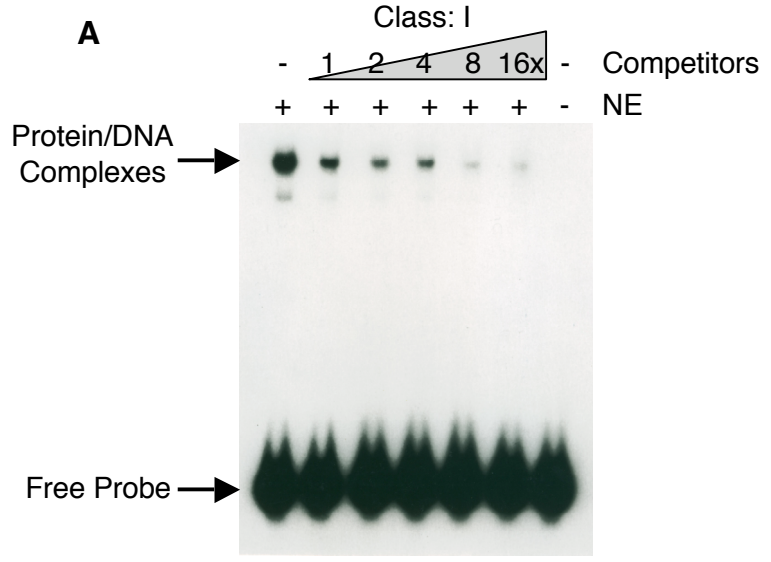


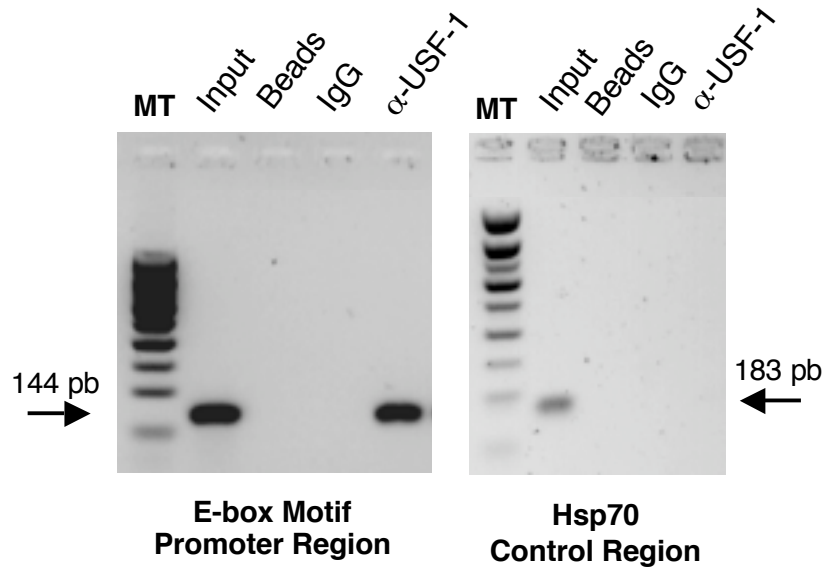
Figure 2: USFs Super-Shift Assays

Super-shift assay determine which b-HLH-LZ proteins are responsible for the observed shifted bands. In this assay, USF1 and USF2 antibodies are able to shift alone nearly completely the Protein/DNA complexes (lanes 2 and 3: α -USF1 and α -USF2). Together (lane 4: α -USF1/ α -USF2), they shift completely the protein/DNA complexes. The mobility of the protein/DNA complexes is unchanged in the presence of an antibody raised against a transcription factor that does not belong to the bHLH-LZ family (anti-Tbx2), or with rabbit immunoglobulin (IgG). Taken together these data clearly show that under the experimental conditions used this E-box sequence binds specifically USF1 and USF2 b-HLH-LZ members.

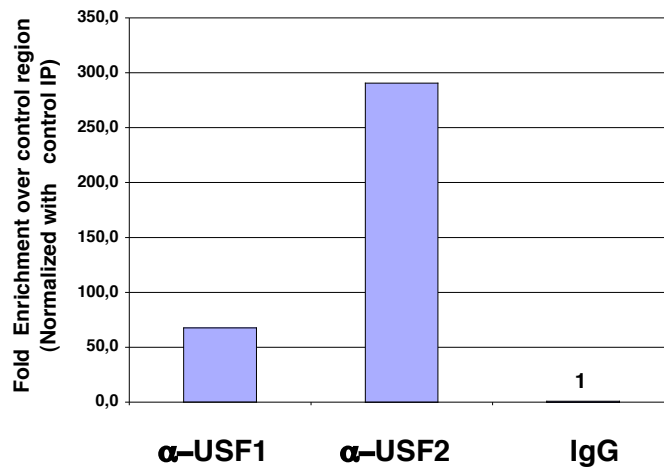
Figure 3: USFs ChIP analysis

An example of typical results obtained with USFs antibodies in ChIP assays. Immunoprecipitated DNA was amplified by standard PCR (Panel A) or by real time PCR (Panel B). Accuracy of the PCR is given by the amplification of a specific single product, corresponding to the target gene in the Input and in the α -USF ChIP lanes, while no amplification is observed in the control ones (beads, IgG), and amplification of a control region (the Hsp70 gene (Panel A) in this example) is limited to the input. In case of real time PCR fold enrichment is calculated, by normalization with a control region and a control ChIP.

A: Standard ChIP



B: Quantitative ChIP



Annexe 2:
Target gene specificity of USF-1 is
directed via p38-mediated
phosphorylation-dependent acetylation

Target Gene Specificity of USF-1 Is Directed via p38-mediated Phosphorylation-dependent Acetylation*

Received for publication, November 12, 2008, and in revised form, March 26, 2009. Published, JBC Papers in Press, April 23, 2009, DOI 10.1074/jbc.M808605200

Sébastien Corre^{‡§1}, Aline Primot[§], Yorann Baron[§], Jacques Le Seyec[¶], Colin Goding^{‡||},
and Marie-Dominique Galibert^{§2}

From the [‡]Signaling and Development Laboratory, Marie Curie Research Institute, The Chart, Oxted RH8 OTL, United Kingdom, [§]CNRS UMR 6061, Genetic and Development Institute of Rennes, Régulation Transcriptionnelle et Oncogénèse Team, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, Institut Fédérative de Recherche (IFR) 140 Génomique Fonctionnelle Agronomique et Santé (GFAS), 2 Avenue du Professor Léon Bernard, CS 34317, Rennes 35043 Cedex, France, [¶]INSERM U522, Hôpital Pontchaillou, IFR140 GFAS, Avenue Henri Le Guilloux, Rennes 35033 Cedex, France, and the ^{||}Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford, Old Road Campus Research Building, Old Road Campus, Headington, Oxford OX3 7DQ, United Kingdom

How transcription factors interpret the output from signal transduction pathways to drive distinct programs of gene expression is a key issue that underpins development and disease. The ubiquitously expressed basic-helix-loop-helix leucine zipper upstream stimulating factor-1 binds E-box regulatory elements (CANNTG) to regulate a wide number of gene networks. In particular, USF-1 is a key component of the tanning process. Following UV irradiation, USF-1 is phosphorylated by the p38 stress-activated kinase on threonine 153 and directly up-regulates expression of the *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *TYRP-1* and *DCT* genes. However, how phosphorylation on Thr-153 might affect the activity of USF-1 is unclear. Here we show that, in response to DNA damage, oxidative stress and cellular infection USF-1 is acetylated in a phospho-Thr-153-dependent fashion. Phospho-acetylated USF-1 is nuclear and interacts with DNA but displays altered gene regulatory properties. Phospho-acetylated USF-1 is thus proposed to be associated with loss of transcriptional activation properties toward several target genes implicated in pigmentation process and cell cycle regulation. The identification of this critical stress-dependent USF-1 modification gives new insights into understanding USF-1 gene expression modulation associated with cancer development.

The ability of a cell to direct specific programs of gene regulation that enable it to adapt to changing environmental cues is mediated by the response of transcription factors to signal transduction pathways. Whether a gene is activated will therefore depend on a combination of the repertoire of transcription factors that may decorate its promoter, together with signaling-dependent post-translational modifications of those factors that regulate their interaction with specific transcriptional cofactors. A further level of regulation may be achieved if signal

transduction-induced post-translational modifications of transcription factors lead to alterations in their ability to bind different sets of genes. However, the molecular mechanisms underpinning post-translational-dependent targeting of transcription factors to distinct gene sets is relatively unexplored.

The basic-helix-loop-helix leucine zipper transcription factor USF-1 binds to characteristic E-box elements via base-specific DNA contacts with its basic region and can homo- and heterodimerize with the related USF-2 transcription factor (1, 2). The *USF-1* and *-2* genes are ubiquitously expressed albeit with different ratios depending on the cell type (3). Although, USF family members share similar DNA-binding properties, their functions are not completely redundant. *USF-1*^{-/-}/*USF-2*^{-/-} double knockout mice, and the heterozygous *USF-1*^{-/+}/*USF-2*^{-/-} mice are lethal at the embryonic stage, while heterozygous *USF-1*^{-/-}/*USF-2*^{+/-} mice are viable (4, 5).

Because 6-bp E-box motifs (CANNTG), including the canonical sequence (CACGTG) and the M-box subtype (CATGTG), are well represented within promoter sequences, USF proteins regulate transcription of a wide variety of genes involved in the immune response (Ig Chain, C4) (6), glucid and lipid pathways (Glucokinase, L-pyruvate kinase, insulin, fatty acid synthase, and apolipoprotein) (7), cell cycle (*CDK4*, *CCNB1*, and *CDC2*) (8, 9), and cell proliferation (*TERT* and *TGFβ2*) (10, 11). Previously we implicated the USF-1 transcription factor as a key stress-responsive, regulatory element of the pigmentation cascade in response to UV stimulation (12, 13). Following UV irradiation, USF-1 is phosphorylated on threonine 153 by the p38 stress-activated kinase, leading to transcription activation of key upstream components of the pigmentation signaling pathway (*POMC* and *MC1R*) (12), and of genes implicated in pigment manufacturer (*TYR*, *TRP-1*, and *DCT*) (15). However, although phosphorylation of USF-1 by p38 leads to altered gene regulatory activity, the precise molecular mechanisms underlying the regulation of USF-1 by p38 have not been fully determined.

We now demonstrate that USF-1 is subject to a post-translational modification cascade in which p38-dependent phosphorylation on Thr-153 is a pre-requisite to acetylation of lysine 199 lying immediately adjacent to the USF-1 basic region that in turn leads to altered gene regulation. Taken together our

* This work was supported in part by the Ligue Nationale contre le Cancer-Comités Départementaux du Grand Ouest, the Marie Curie Cancer Care, and the Association pour la Recherche contre le Cancer Foundations.

¹ Supported by the Rennes University and the Intra-European Fellowship (6 Framework Programme).

² To whom correspondence should be addressed: CNRS, UMR 6061, Institut de Génétique et Développement de Rennes, Université de Rennes-1, Faculté de Médecine, IFR140 GFAS, 2 av. du Pr. Léon Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France. Tel.: 33-223-234-705; Fax: 33-223-234-607; E-mail: mgaliber@univ-rennes1.fr.

Stress-dependent Acetylation of USF-1

data highlight a novel mechanism that directs USF-1 to an altered repertoire of target genes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Human 501mel, and mice B16F1 melanoma cell lines were maintained in RPMI 1640 medium (catalogue no. 21875-034, Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS)³ and 1% penicillin-streptomycin antibiotics (Invitrogen), in a controlled atmosphere (10% CO₂).

BLM 1492 and CS6269 human fibroblasts, isolated, respectively, from patients that displayed Bloom and Cockaine syndromes (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Cat. No. 41966-029, Invitrogen) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin antibiotics in a controlled atmosphere (5% CO₂).

Cell Stimulations—DNA damage was obtained using specific UV lights (UVB 312 nm and UVC 254 nm) using UV Stratalinker apparatus (Stratagene), methylmethane sulfonate (MMS: 0.2 mM and 1 mM), and hydroxyurea (2 μM). Oxidative stress was performed with hydrogen peroxide (H₂O₂: 0–10 mM) and menadione (0.1 μM). Heavy metal stress was obtained with cadmium (5 μM) and arsenic (5 μM). Briefly, cells were plated at 50–70% confluence, depending on their doubling time, in 10- and 3.5-cm diameter Petri dishes for, respectively, RNA and protein preparation, such that they reached 80% confluence at the harvesting time. 12 h before stress induction, medium was replaced with medium containing only 1% FBS. Chemical inductions were then obtained by adding specific compounds directly into the medium. UVB induction was performed as previously described (12).

When required, cells were pre-treated, for 1 h prior to stimulation, with specific inhibitors of p38α and -β (10 μM SB203580), p38β kinase (10 μM SB202190), mitogen-activated protein kinase (10 μM U0126), Cyclin A2/B1-CDC2 (10 μM roscovitine) and 10 μM olomucin, phosphatidylinositol 3-kinase (200 nM wortmannin), Braf protein (1 μM ZM336372), p70 S6 kinase (1 nM rapamycin), protein kinase A-protein kinase C (100 nM bisindolylmaleimide), and the deacetylases (Trichostatin A 100 nM to 10 μM). Stimulated monolayer cells were washed twice with phosphate-buffered saline, harvested by scraping and then centrifuged at a low speed. Cell pellets were resuspended in either 350 μl of lysis buffer (Nucleospin[®] RNA II extraction kit, Macherey-Nagel[®], or RNeasy mini kit, Qia-gen[®]) solution for mRNA extraction, or resuspended in Laemmli buffer for Western blotting analysis. To prevent action of proteases, phosphatases and deacetylases, respectively, proteases inhibitors (Roche Applied Science), phosphatases inhibitor (sodium fluoride 25 mM, orthovanadate 1 mM, and β-glycerophosphate 25 mM) and deacetylases inhibitor sodium butyrate (10 mM) were added to the medium before induction and also in cells lyses buffer.

Viruses and Mycoplasma Infection—VSV strain (vesicular stomatitis virus, a kind gift of A. Ruffaud) was amplified *in vitro*

using Vero cells. The titer, estimated by plaque assays with Vero cells, was 5 × 10⁶ plate forming units per ml (pfu/ml). Infections were performed in CS6269 fibroblasts and 501mel cells with gradual dilutions of virus solutions. 24 h post-infections, cells were recovered for Western blotting protein analysis.

The *Mycoplasma hyorrhinis* strain was isolated from the supernatant of a contaminated cell line. Contamination of CS6269, BLM1492, and 501mel cells, were monitored by immunofluorescent staining using Hoechst solution, included in 4',6-diamidino-2-phenylindole mounting medium (Vectashield[®], Vector), according to manufacturer's instructions. Contaminated cells were recovered also for Western blot analysis.

Cell Viability Analysis—Cell viability in response to H₂O₂ was analyzed in a 96-well plate. Briefly, 501mel cells were plated at 1 × 10⁴ cells/well, 8 h before H₂O₂ inductions, which were performed at increasing concentrations from 50 nM up to 100 mM. 24 h post-induction, tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml (M2128, Sigma) was added at 0.5 mg/ml to the cell culture medium. After 4 h of incubation (37 °C), the medium was removed and 150 μl of DMSO was added to each well to solubilize salt crystals. Percentage of cell viability was then analyzed by measuring the DMSO-optical density, at 690 and 540 nm with a Multiskan spectrophotometer, as the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide salt (yellow) is transformed in formazan (purple) by the mitochondrial dehydrogenase enzyme in viable cells. None-induced cells were used as the reference.

Mutagenesis of USF-1 Transcription Factor—Wild-type pCMV-USF-1 constructs with T153E and T153A mutants have been previously described (13). The K188R, K199R, K214R, K286R, K288R, and K306R USF-1 mutant forms were obtained by single mutation of the WT pCMV-USF-1 using the Stratagene[®] QuikChange[®] site-directed mutagenesis kit (200518-5) according to the manufacturer's specifications. All vectors were sequenced previously to their use. Details of the cloning strategies can be provided under request.

Transient Transfection Assays—501mel cells were plated in 10% FBS-supplemented medium and allowed to grow overnight to 80% confluence. Transfections were performed using FuGENE reagent (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions using 1 μg of plasmid DNA for 6 wells plates or 6 μg for 10-cm Petri dishes. 48 h post-transfection, cells were or not induced with UVB (400 J/m²) or 1 mM H₂O₂, for 3 h.

Western Blots—Whole cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE, using a 200:1 acrylamide:bisacrylamide ratio. Following blotting, membranes were probed with appropriate primary antibodies, and positive signals were detected using peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies, visualized by ECL Super Signal Detection Kit (Pierce).

The primary antibodies used were the polyclonal anti-USF-1 (SC-229, Santa Cruz Biotechnology), anti-USF-2 (SC-861, Santa Cruz Biotechnology), anti-Lamin B (SC-6216, Santa Cruz Biotechnology), anti-acetylated-K (AB3879, Chemicon International), anti-Ub (SC-6085, Santa Cruz Biotechnology), anti-p38 antibodies (9212, Cell Signaling) and the monoclonal anti-

³ The abbreviations used are: FBS, fetal bovine serum; MMS, methylmethane sulfonate; VSV, vesicular stomatitis virus; WT, wild type; Ab, antibody; ChIP, chromatin immunoprecipitation.

tubulin (T5201, Sigma), anti-P-p38 Ab (9211, Cell Signaling), and anti-SV5 flag antibodies (MCA1360CA, Serotec).

Phosphoprotein Purification—Phosphoproteins purification was performed from mycoplasma-contaminated BLM 1492 cells using the PhosphoProtein purification kit (37101, Qiagen®), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, proteins that carry a phosphate group on any amino acid are bound with high specificity to PhosphoProtein purification resin, whereas proteins without phosphate groups do not bind to the resin and can therefore be found in the flow-through fraction.

ChIP—Chromatin immunoprecipitation assays were performed in CS6268 and 501mel cell lines, as previously described (12), and using μ MACS Protein G MicroBeads (Miteney Biotec). ChIP products were eluted and recovered by ethanol precipitation and resuspended in 100 μ l of H₂O for PCR. The primers used to amplify the different promoters are available on request.

Electrophoresis Mobility Shift Assays—The DNA-binding mobility assays were performed using both mycoplasma-free and mycoplasma-contaminated BLM 1492 whole cell extracts or following 501mel cells transfection with various SV5 tag USF-1 expression vectors following the protocol described previously (16). Either the consensus M box (5'-TCTCAGCCAA-GACATGTGATAATCACTGT-3') located in the human *TYR* promoter (-183) or the derived E-box (5'-TCTCAGCCAA-GACACGTGATAATCACTGT-3') were ³²P-labeled to used as a probe. Supershift was obtained with the polyclonal anti-USF-1 antibody.

RNA Extraction cDNA Synthesis and Expression Analysis—RNA was extracted by using the Nucleospin® RNA II extraction kit (Macherey-Nagel) or RNeasy mini kit, Qiagen according to the manufacturer's instruction. Recovered RNA was quantified using the Nanodrop device (Nanodrop Technology). Reverse transcription reactions were carried out using the reverse transcriptase avian myeloblastosis virus enzyme (11495062001, Roche Applied Science) according to manufacturer's specific recommendations, with 1 μ g of total RNA and 300 ng of random primer (48190-011, Invitrogen). Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcription-PCR in sealed 96-well microtiter plates using the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), and the results were evaluated using the associated software (version 1.2.3, Applied Biosystems). Real-time PCR was also carried out in a 100-well disc using the SensiMixPlus SYBR (QT605, Quantace) using the Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science). The 18 S ribosomal RNA subunit, the values of which remain constant over time, was used as a housekeeping gene. The relative amounts of transcripts were determined using the ΔC_t method. The mRNA levels at each time point following stimulation are expressed as a -fold increase compared with non-stimulated control cells. Each experiment was carried out at least twice, and each time point was done in duplicate.

Forward (F) and reverse (R) primers were designed using the Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science) and have been previously tested for their efficiencies

(data not shown). The human and murin primers used for quantitative PCR are available on request.

Luciferase Assays—The pGL3-vectors used for tyrosinase luciferase assays were previously described (13). 501mel cell lines were plated in 12-wells plate in 10% FBS supplemented medium 24 h prior to transfection. Cotransfections of 500 ng of pGL3-vectors (TYR promoter -300/+80, TYR promoter -300/+80 plus mutation of E box element environment -183) with 500 ng of distinct pCMV-USF-1-expressing vectors (WT, T153E, T153A, and K199R) were performed as above. 48 h after transfection and 4 h after H₂O₂ (200 μ M and 1 mM) treatment, cells were recovered in 100 μ l of luciferase assay lysis buffer, and luciferase activity was evaluated in 20 μ l with the Luciferase Assay System (Promega), using a Microplate Luminometer LB96V (EG & G Berthold).

RESULTS

New Stress-dependent Post-translational Modification of USF-1—We have previously shown that the ubiquitously expressed USF-1 transcription factor is a downstream target of the UV-activated p38 kinase, leading to the appearance of a phospho-USF-1 form (P-T153-USF-1), which can be distinguished by SDS-PAGE (Fig. 1A) (13). P-T153-USF-1 correlates with the appearance of activated p38 kinase (P-p38), 1.5 h following treatment of B16F1 or 501mel melanoma cells, or fibroblasts with the DNA-damaging agents MMS (0.2 mM) or menadione (0.1 μ M) treatments (Fig. 1A). To analyze further the implication of the USF-1 transcription factor in mediating the stress response to these agents, we examined USF-1 protein 24 h post stimulation (Fig. 1B). The results indicate that MMS treatment over 24 h induces the appearance of a novel 47-kDa USF-1-specific band that we term M-USF-1 for "Modified USF-1," which is specifically and predominantly observed by Western blotting following long term stimulation of cells with additional inducers of cellular stress, hydroxyurea (2 μ M), cadmium (5 μ M), or arsenic (5 μ M) (Fig. 1B). These levels of stress induce a full post-translational modification of the USF-1 transcription factor. Comparable results are obtained in a dose- and time-dependent manner when 501 melanoma cells are treated with hydrogen peroxide (Fig. 1C). H₂O₂ treatment of cells also induces the appearance of the 47-kDa USF-1 form when the treatment lasts 4 h and the H₂O₂ dose is at least 1.25 mM. Under these conditions no post-translational modification of the related factor USF-2 was detected. When samples were analyzed 24 h post H₂O₂ treatment (Fig. 1D), M-USF-1 appears at lower doses (10 μ M H₂O₂), which interestingly correlates with a decrease of cell viability attested by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test (Fig. 1E), and with the presence of ROS species, quantified using the fluorescent H2-DCFDA Probe and FACS analysis (data not shown). Also, with these specific dose stimulations (Fig. 1D), the three forms of USF-1 are concomitantly present, indicating that the relative percentage of the three USF-1 protein forms in the cell is correlated with the type of cellular stress, and the level of induction. Cell confluence is also an important factor that seems to modulate also the USF-1 ratio (data not shown).

Stress-dependent Acetylation of USF-1

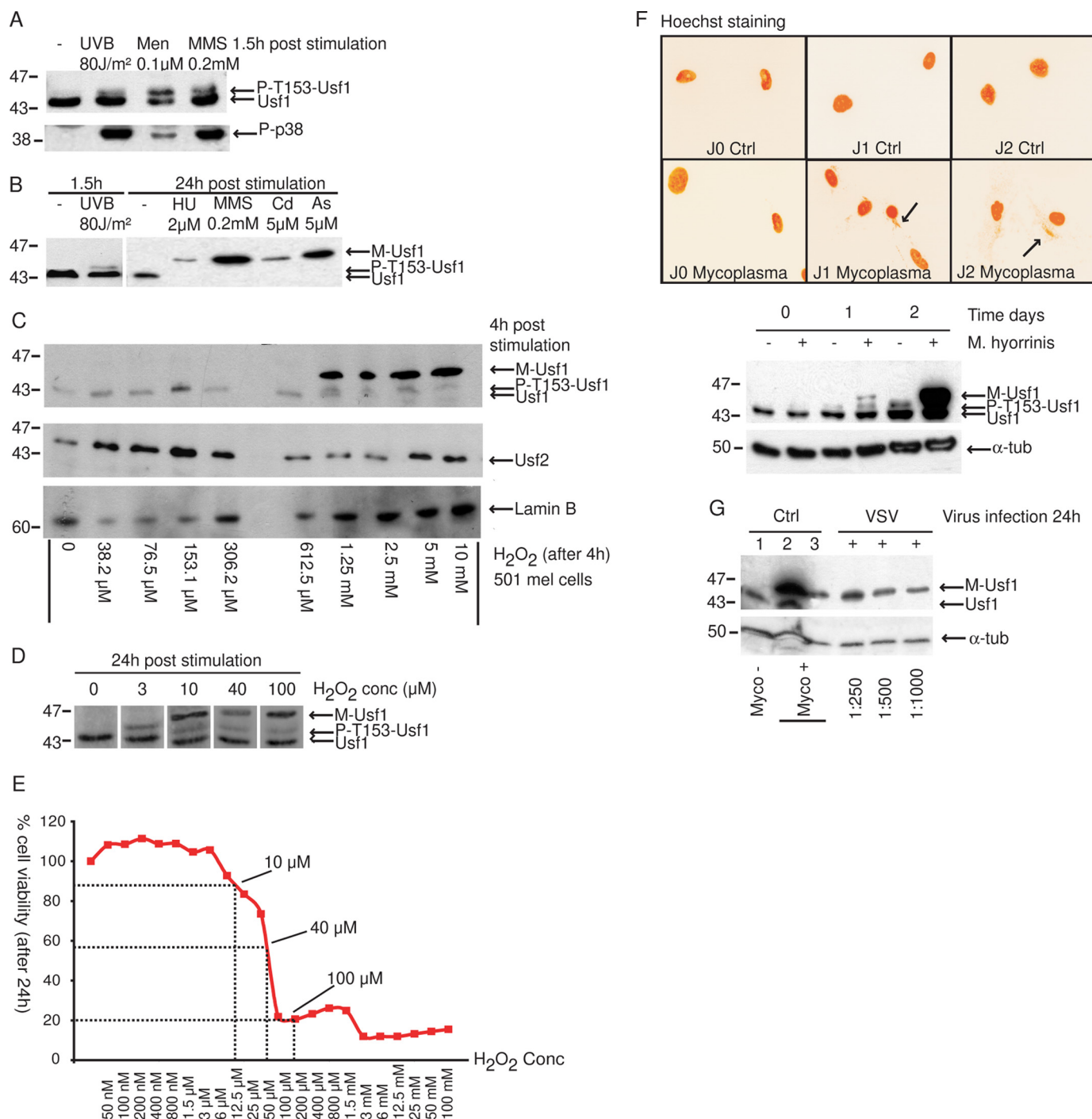


FIGURE 1. Identification of a new USF-1 stress-responsive form. Western blot analysis of 501mel cell extracts after cells treatment using anti-USF-1, anti-USF-2, anti-P-p38, and anti-β-tubulin or anti-Lamin B antibodies as loading control. **A**, cells recovered 1.5 h after UVB irradiation (312 nm 80 J/m²), menadione (0.1 μM), and MMS (0.2 mM). **B**, 501mel cells extracts treated for 24 h with DNA-damaging compounds (hydroxyurea (HU): 2 μM, methyl methane sulfonate (MMS): 0.2 mM) and heavy metal compounds (cadmium (Cd): 5 μM; arsenic (As): 5 μM). **C**, 501mel cells treated for 4 h with increasing concentrations of hydrogen peroxide (from 0 to 10 mM). **D**, 501 mel cells stimulated for 24 h using critical H₂O₂ concentrations (10, 40, and 100 μM) in the presence or not of the specific p38 kinase inhibitor (SB203580 10 μM, 1 h before induction). **E**, the impact of oxidative stress on cell viability is assessed using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test after 24-h H₂O₂ treatment (from 50 nM to 100 mM). **F**, *M. hyorrrhinis* contamination (black arrow) of BLM1492 cells: contamination level is monitored by immunofluorescence using DNA staining (Hoechst) (negative image) and a time course induction of M-USF-1 formation is visualized by Western blotting analysis in relation to contamination level. **G**, CS6269 cells were infected with vesicular stomatitis virus (VSV) using gradual dilutions (1:250, 1:500, and 1:1000) of a virus stock titrated at 5.10⁶ plaque forming units per ml (pfu/ml). 24-h post-infection cells were recovered for Western blotting analysis.

Then, we investigated the possibility for USF-1 to be a downstream target of bacterial infection. *M. hyorrrhinis*, one of the most common strains found to infect tissue cultures cells, was used over a 2-day time course. Immunofluorostaining to mon-

itor *Mycoplasma* contamination of CS6269 cells revealed the presence of a low contamination level on day 1, which increased dramatically on day 2, and correlated with the appearance and increase of M-USF-1 (Fig. 1F). Comparable results were

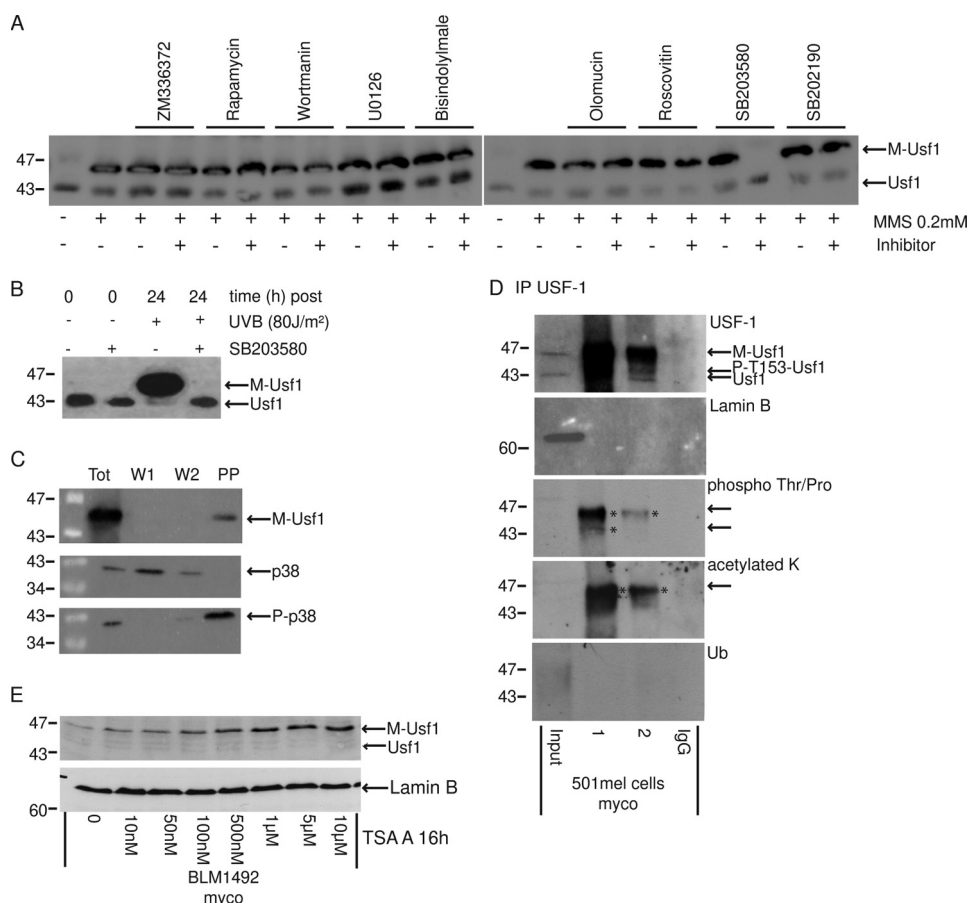


FIGURE 2. Implication of p38 pathway in M-USF-1 form and identification. Western blot analysis of 501mel cell extracts after cells treatment using anti-USF-1, anti-USF-2, anti-P-p38, and anti- β -tubulin or anti-Lamin B antibodies as loading control. **A**, cells recovered 24 h post-stress stimulation (MMS, 0.2 mM), in the presence or not of specific kinase inhibitors, added to the cell culture 1 h prior to the MMS stimulation. **B**, pretreated 501mel cells with the p38-specific kinase inhibitor (SB 203580, 10 μ M) 1 h prior to UVB (80 J/m²) stimulations. **C**, purification of the phosphoprotein fraction of mycoplasma-infected BLM1492 cells using the PhosphoProtein purification kit (Qiagen®). Aliquots of total cell extract, wash 1 and 2 (W1 and W2) and purified phosphoprotein (PP) fractions were resolved on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting analysis using anti-USF-1 Ab (Santa Cruz Biotechnology), p38 Ab (Cell Signaling), and P-p38 Ab (Cell Signaling). **D**, immunoprecipitations of USF-1 were performed on total cell extract from 501mel cells highly contaminated with mycoplasma, using specific anti-USF-1 Ab. In these cells, M-USF-1 protein is mainly present and thus facilitates the identification of post-translational modification of M-USF-1 by Western blot analysis. We load into the gel two different concentrations of recovered protein (high: 1, low: 2) to distinguish the different post-translational modifications of USF-1. **E**, Western blot analysis of *Mycoplasma*-infected BLM1492 cells, obtained 12 h after stimulation in the presence of different concentrations the specific deacetylases inhibitor trichostatin A (0–10 μ M).

obtained with different cell lines (501mel, B16F1, and BLM1492), and high infection level could also lead directly to the appearance of M-USF-1.

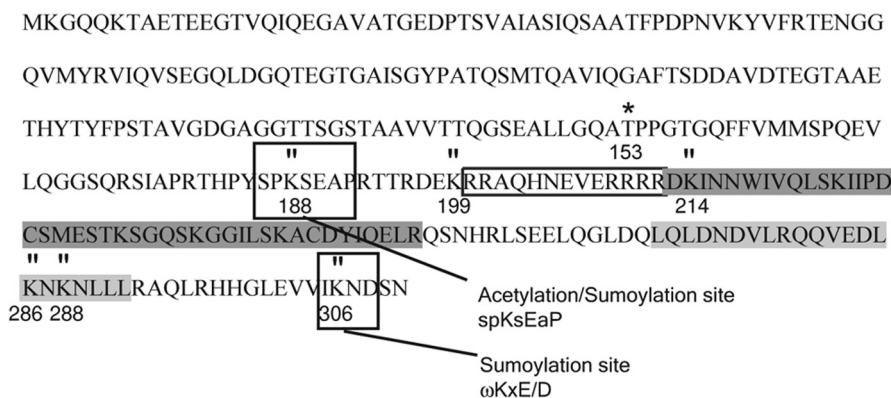
In addition to its cellular functions, the USF-1 transcription factor also participates in virus gene regulation, and virus infection activates the p38 signaling pathway (17, 18). We therefore evaluated whether biological insults also induced the appearance of M-USF-1. To this end, we infected CS6269 fibroblasts and 501mel cells with VSV. 24 h post-infection CS6269 cells infected with increasing titers of VSV show a dramatic appearance of the 47-kDa USF-1 band in a dose-dependent manner (Fig. 1G). Again, the level of infection is sufficient to entirely modify USF. Comparable results are observed in 501mel cells using VSV, or following herpes simplex virus infection (data not shown). Thus, a wide variety of cellular stresses ranging from viral and bacterial infection to DNA-damage can induce the appearance of M-USF-1.

purified according to its phosphorylation state using a specific phosphoprotein affinity purification column. Western blot analysis of the purified fractions revealed that M-USF-1 is indeed retained specifically by the column (PP fraction) and co-purified with phosphorylated (active) p-38 kinase (P-p38), while unphosphorylated p-38 kinase is present in the flow-through fractions (Fig. 2C). To identify any additional modifications participating in the low mobility shift of the M-USF-1 protein, we performed two independent immunoprecipitations of USF-1 forms in mycoplasma-contaminated 501mel cells (Fig. 2D, 1 and 2), using the anti-USF-1-specific antibody. Under such conditions, M-USF-1 is the predominant form present in the cell. Given the role of lysine acetylation (22) in regulation of gene expression, we analyzed the immunoprecipitated M-USF-1 for modifications on lysine residues. The immunoprecipitations confirmed that M-USF-1 is phosphorylated on TP residues by using anti-phospho-Thr/Pro-antibody

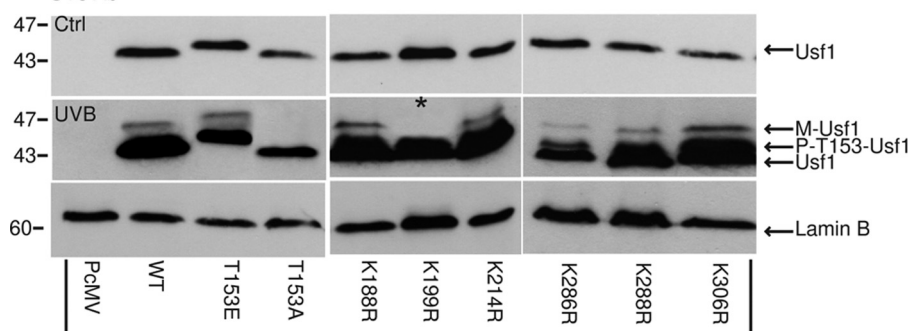
Characterization of the M-USF-1 Post-translational Form—We next investigated the possibility that additional phosphorylation events were responsible for the appearance of M-USF-1, because USF-1 is reported to be a downstream target of several different kinases (p38 α , β , Cyclin-CDC2, protein kinase A-protein kinase C, and phosphatidylinositol 3-kinase) (6, 19–21). We first used specific inhibitors of each kinase pathway (respectively, SB203580, roscovitin, olomucin, bisindolylmaleimide, and wortmannin) to facilitate the identification of the signaling pathway responsible for the appearance of M-USF-1. We also used additional inhibitors (ZM336372, U0126, rapamycin, and SB202190) to explore possible roles of the BRAF-mitogen-activated protein kinase pathway, the P70S6 and p38 β . As shown in Fig. 2A, 24 h of MMS (0.2 mM) treatment results in the predominant appearance of M-USF-1, which is only abrogated in the presence of the p38 α , β -specific inhibitor pathway (SB203580, 10 μ M) but not using the other inhibitors tested, including SB202190, which is specific for p38 β , suggesting that p38 α kinase activity is necessary for the induction of M-USF-1. Comparable results are obtained following UV, H₂O₂, and hydroxyurea treatment (Fig. 2B and data not shown). These results suggest that M-USF-1 contains at least one phosphorylated residue and thus can possibly be

Stress-dependent Acetylation of USF-1

A Structure of USF-1 transcription factor



B SV5 Ab



C

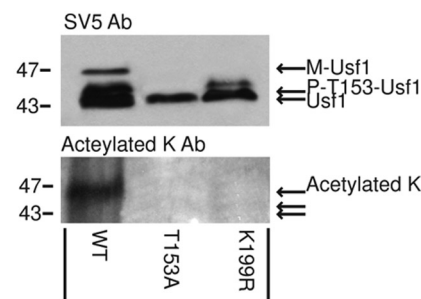


FIGURE 3. Modification of M-USF-1 corresponds to acetylation on Lysine 199. To identify the potential position of the M-USF-1 modifications, lysine residues were mutated to arginine. *A*, structure and position of the mutated lysines. *B*, wild type (WT) and mutated (T153E, T153A, K188R, R199R, K214R, K286R, K288R, and K306R) recombinant USF-1 proteins transiently expressed in 501mel cells, followed by UVB induction (400 J/m²) or not, were resolved on an SDS-PAGE and analyzed using SV5-tagged antibody. Previous to the induction, sodium butyrate (deacetylase inhibitor, 10 mM final) was added to the culture medium. Anti-Lamin B was used as loading control. *C*, immunoprecipitation of WT, T153A, and K199R recombinant proteins expressed in BLM 1492 mycoplasma-positive cell line using anti-USF-1 antibody. The presence of post-transcriptional modifications in response to stress stimuli (mycoplasma infection) was analyzed by Western blot using anti-SV5, and anti-acetylated K antibodies.

and also potentially acetylated by Western blotting using anti-acetyl lysine antibodies. No ubiquitin residue could be observed using an anti-ubiquitin-antibody (Fig. 2D). Furthermore, mycoplasma contaminated BLM 1492 cells, presenting only the M-USF-1 form in Western Blot analysis and treated with an increasing amount of the specific deacetylase inhibitor trichostatin A, led to an increasing abundance of M-USF-1 that correlated to the amount of trichostatin A used, supporting the notion that M-USF-1 is acetylated (Fig. 2E).

M-USF-1 Is Acetylated on Lysine 199—To identify the acetylated lysine(s) present in M-USF-1, several lysines within the protein at relevant positions were replaced by arginine (K>R) (Fig. 3A) from the WT USF-1 SV5-tagged recombinant protein. These mutations prevent physiological acetylation of the recombinant transcription factor at the targeted amino acid position. The impact of the different mutations on the mobility of WT or mutated USF-1 was examined by Western blotting following transfection of the corresponding epitope-tagged expression vectors into 501mel cells treated or not by UVB (400 J/m²) (Fig. 3B). Under normal conditions, WT and mutated recombinant USF-1 proteins display identical mobility, with the exception of the T153E mutant that leads to a reduced mobility by SDS-PAGE and mimics the mobility of P-Thr-153 USF-1 as previously shown (13). After UVB treatment, we can distinguish the different post-translational modifications of the

transcription factor, and WT and USF-1 single mutants K188R, K214R, K286R, K288R, or K306R, are resolved into three closed bands of various intensities corresponding to M-USF-1, P-T153-USF-1, and native USF-1 forms. By contrast, the K199R-USF-1 mutant displayed only two poorly resolved bands corresponding to P-T153-USF-1 and native USF-1. Significantly, the T153A-USF-1 mutant resolved as a single band corresponding to native USF-1. Comparable results were obtained 4 h after H₂O₂ (1 mM) treatment of 501mel cells (data not shown). To characterize further the nature of the modification occurring on Lys-199 in response to stress, we immunoprecipitated WT USF-1 and the T153A and K199R mutants following transfection of the corresponding expressing vectors into BLM 1492 cells and subsequently subjected the cells to UVB stimulation (400 J/m²) (Fig. 3C). As expected, WT-USF-1 displayed three bands, the T153A mutant only one, and the K199R mutant only two. Acetylation was detected only with WT-USF-1, when the M-USF-1 form was present, but not with the T153A or K199K mutants. Taken together, the data suggest that under severe stress conditions USF-1 is acetylated on Lys-199 following phosphorylation of Thr-153.

Specific In Vivo and In Vitro Interaction of M-USF-1 with DNA—To investigate the role of M-USF-1, we concomitantly examined native USF-1 and M-USF-1 subcellular localization in fractionated cell extracts. As shown in Fig. 4A, M-USF-1, like

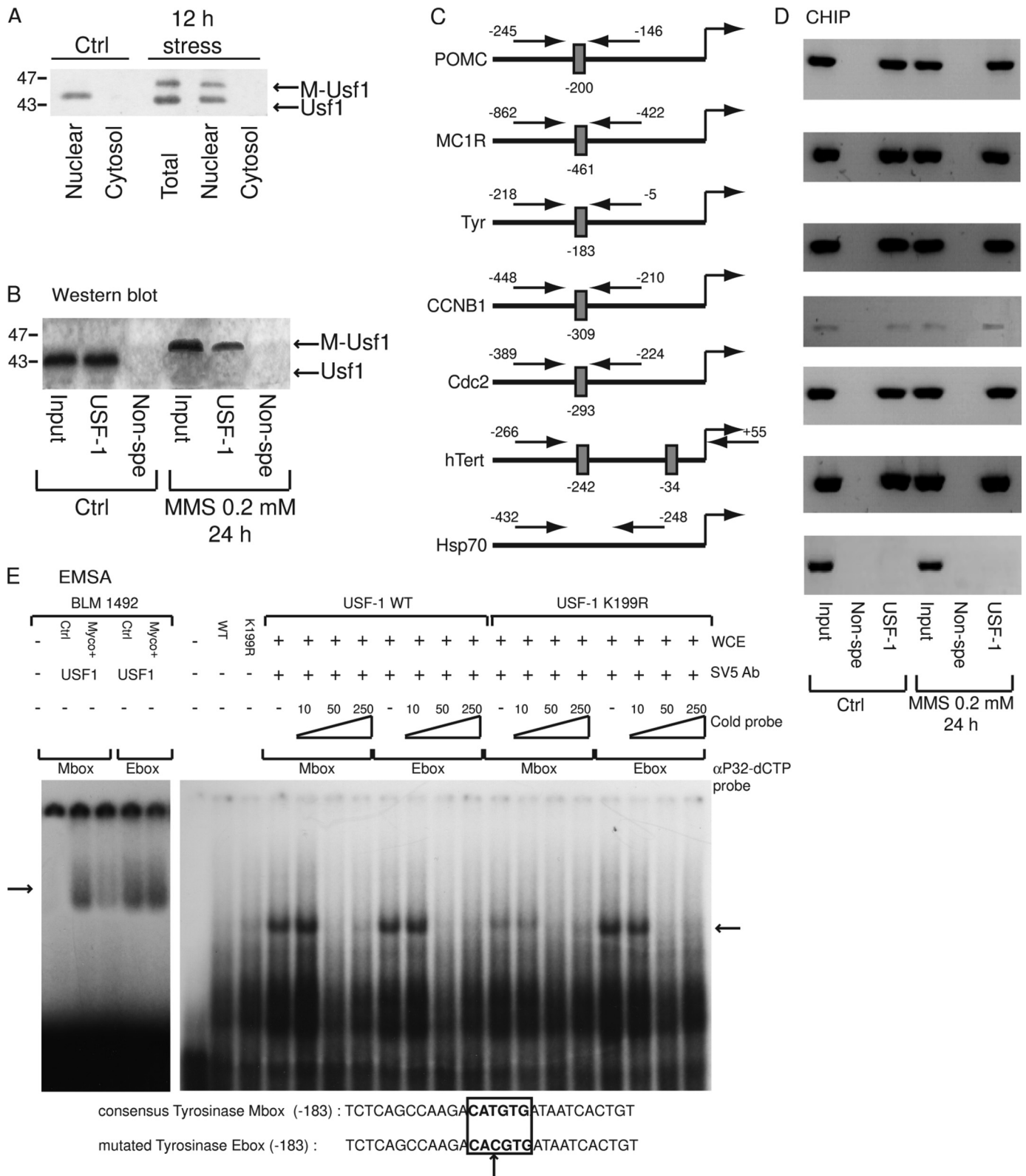


FIGURE 4. M-USF-1 interacts *in vivo* and *in vitro* with DNA. *A*, Western blot analysis (anti-USF-1 antibody) of fractionated cell extract, obtained 12 h after stress stimulation (MMS, 0.2 mM). *B*, Western blot analysis is performed on ChIP extract to confirm that M-USF-1 was exclusively present in MMS-treated cells. *C*, schematic representation of human *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CCNB1*, *CDC2*, *TERT*, and *HSP70* promoters. E-box motifs are shown as gray rectangles. Positions of PCR primers (→←) used for chromatin immunoprecipitation assays are shown relative to the start sites of each promoter, and are centered on each E-box motif, except for *HSP70* primers. *D*, ChIP assays are performed on 501mel cells, which were stimulated or not with MMS (0.2 mM for 24 h), using anti-USF-1 antibody or nonspecific IgG. Recovered DNA was subjected to PCR using specific primers of each promoter. Specific primers for the *Hsp70* promoter gene were used as negative control. *E*, DNA-binding mobility assay were performed in the presence of mycoplasma-free (*Ctrl*) and contaminated BLM 1492 whole cell extracts and following transfection of different USF-1 mutants in 501mel cells, using both consensus Mbox and derived Ebox for *TYR* promoter-labeled probes. USF-1 is shifted with specific anti-USF-1 or anti-SV5 FLAG antibodies, and competition is performed with cold probes.

Stress-dependent Acetylation of USF-1

native USF-1, is exclusively present in the nuclear fraction of treated cells (0.2 mM for 12 h). To analyze the interaction of M-USF-1 with promoters for genes that are known to be regulated by USF-1 (*POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CCNB1*, *CDC2*, and *TERT*) after binding of specific E box (Fig. 4C), we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using the USF-1-specific antibody (13) and treated cells presenting exclusively the M-USF-1 form (to avoid USF-1 and P-USF-1 background). Untreated cells were used as positive control. Western blot analysis confirmed that in these experiments the M-USF-1 form is exclusively present in ChIP extracts, when 501mel cells are treated with MMS (0.2 mM-24 h) (Fig. 4B). *In vivo* interactions of USF-1 and M-USF-1 with the *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CCNB1*, *CDC2*, *TERT*, and *HSP70* promoters were evaluated by PCR amplification using promoter-specific primers. The results indicate that M-USF-1 interacts specifically with *POMC*, *MC1R*, *TYR*, *CCNB1*, *CDC2*, and *TERT* promoters, which all possess E-box regulatory elements, whereas no interaction is found with *HSP70* promoter, which lacks an E-box motif. Finally, no PCR product was observed after immunoprecipitation using nonspecific IgG (Fig. 4D).

We next used an *in vitro* DNA binding assay (Fig. 4E) to evaluate the direct interaction of both native and modified endogenous USF-1, with the canonical M-box motif (CATGTG) present in the *TYR* gene promoter and the derivative E-box (CACGTG). As shown in Fig. 4E, both native and phospho-acetylated USF-1 forms are able to bind canonical E-box and M-box sequences, albeit a weaker signal is observed for the phospho-acetylated USF-1-M-box complex. According to the *in vitro* competition assays, WT and K199R recombinant USF-1 proteins bind also specifically to both E-box and M-box sequences. Although, a weaker signal is again observed with the M-box and the K199R mutant, comparable complexes are detected for the others (WT USF-1 and both M- and E-boxes, K199R mutant and the E-box).

M-USF-1 Transcriptional Function—To investigate M-USF-1 transcriptional function, we analyzed endogenous gene expression levels of USF-1 target genes in 501mel cells by real-time RT-PCR following MMS stimulation (0.2 mM) over a 12-h time course. As shown in Fig. 5A, a 5- to 15-fold induction of transcript level was observed for pigmentation (*TYR*, *POMC*, and *MC1R*), and cell cycle genes (*CCNB1*, *CDC2*, and *TERT*) 5 h post cell stimulation, correlating with the appearance of P-T153-USF-1 (Fig. 5B). By contrast, when the M-USF-1 form starts to appear during stress response, 12 h post-MMS stimulation, the transcript levels return to the levels observed prior to MMS treatment. Interestingly, although, USF-1 protein is subjected to various post-translational modifications, USF-1 mRNA levels remain constant under these cell conditions. Comparable results are obtained in presence of high UVB doses (400 and 800 J/m²), when Phospho-acetylated USF-1 is present (data not shown).

To gain further insight in M-USF-1 transcriptional function, we performed luciferase assays using 501mel cells co-transfected with the USF-1 responsive *TYR* promoter (−300/+80) linked to the luciferase reporter gene (Tyr-Luc) and various pCMV-USF-1 expression vectors. Transfected cells were also subjected to various level of stress treatment (H₂O₂) (Fig. 5C).

Basal activation of the *TYR* promoter is observed in the presence of WT-USF-1, and significant increase (*asterisk*) is observed when WT-USF-1 transfected cells are stimulated with H₂O₂ (200 μM H₂O₂). Increased expression is concomitant with the appearance of the P-153-USF-1 modification. Comparable luciferase activity was observed in the presence of the T153E USF-1 mutant mimicking the active phosphorylated form. Although the T153A mutant presents no transcriptional activity compared with the WT as previously reported. When transfected cells are stimulated with higher H₂O₂ doses (1 mM), leading to the appearance of phospho-acetylated recombinant USF-1 protein, transcription is reduced, being slightly lower than basal, and significantly different from mild treatment (200 μM H₂O₂). To confirm that acetylation of Lys-199 was responsible for down-regulating gene expression, we used the K199R mutant that cannot be anymore acetylated on the targeted lysine. We show that, in the absence of cellular stress, the K199R USF-1 mutant activates the *TYR* promoter as WT-recombinant USF-1, whereas in presence of mild H₂O₂ treatment (200 μM H₂O₂) luciferase activity is significantly increased, comparable to T153E promoter activation, and corresponds to the appearance of the phospho-K199R-USF-1 form. When K199R-transfected cells are stimulated with higher H₂O₂ doses (1 mM), promoter activation remains comparable to the one observed with mild treatment, K199R-USF-1 phosphorylation is still present, and no acetylation is observed. Transcriptional activation is thus significantly different from WT promoter activation following high H₂O₂ doses (1 mM) treatment. We also confirmed by luciferase assays that the acetylation of USF-1 is associated with loss of transcriptional activity. Indeed, when transfected-501mel cells are treated with trichostatin A (0.1 to 10 μM, 12 h), total acetylation of endogenous USF-1 (after 1 mM H₂O₂ treatment) correlates with a decrease of transcription of *TYR* promoter luciferase reporter (−300/+80) (Fig. 6A). Also, after transfection of recombinant USF-1 proteins, phosphorylation of recombinant-USF-1 were associated with an increase of *TYR* transcription (200 μM H₂O₂), whereas the acetylated recombinant form prevented transcription activation. Acetylation maintenance with trichostatin A treatment further decreased the transcription level. Abrogation of acetylation modification, with K199RUSF-1 recombinant protein, prevented transcription inactivation (Fig. 6B). Taken together, loss of Lys-199 acetylation correlated with the loss of transcription down-regulation.

DISCUSSION

The ubiquitously expressed USF-1 transcription factor plays major roles in regulation of gene expression with P-T153-USF-1 mediating an early stress response following direct phosphorylation by the p38 stress-activated kinase (13). However, little is known of USF-1 post-translational modifications and functions in response to increasing environmental stress. In this study we identify a novel 47-kDa USF-1 post-translational modified form and show that 47-kDa USF-1 is acetylated in a phospho-Thr-153-dependent manner in response to various stress stimuli. Indeed, several lines of evidence support the fact that 47-kDa USF-1 comprises phospho and acetyl modifications. These include immuno-analysis of the immunoprecipi-

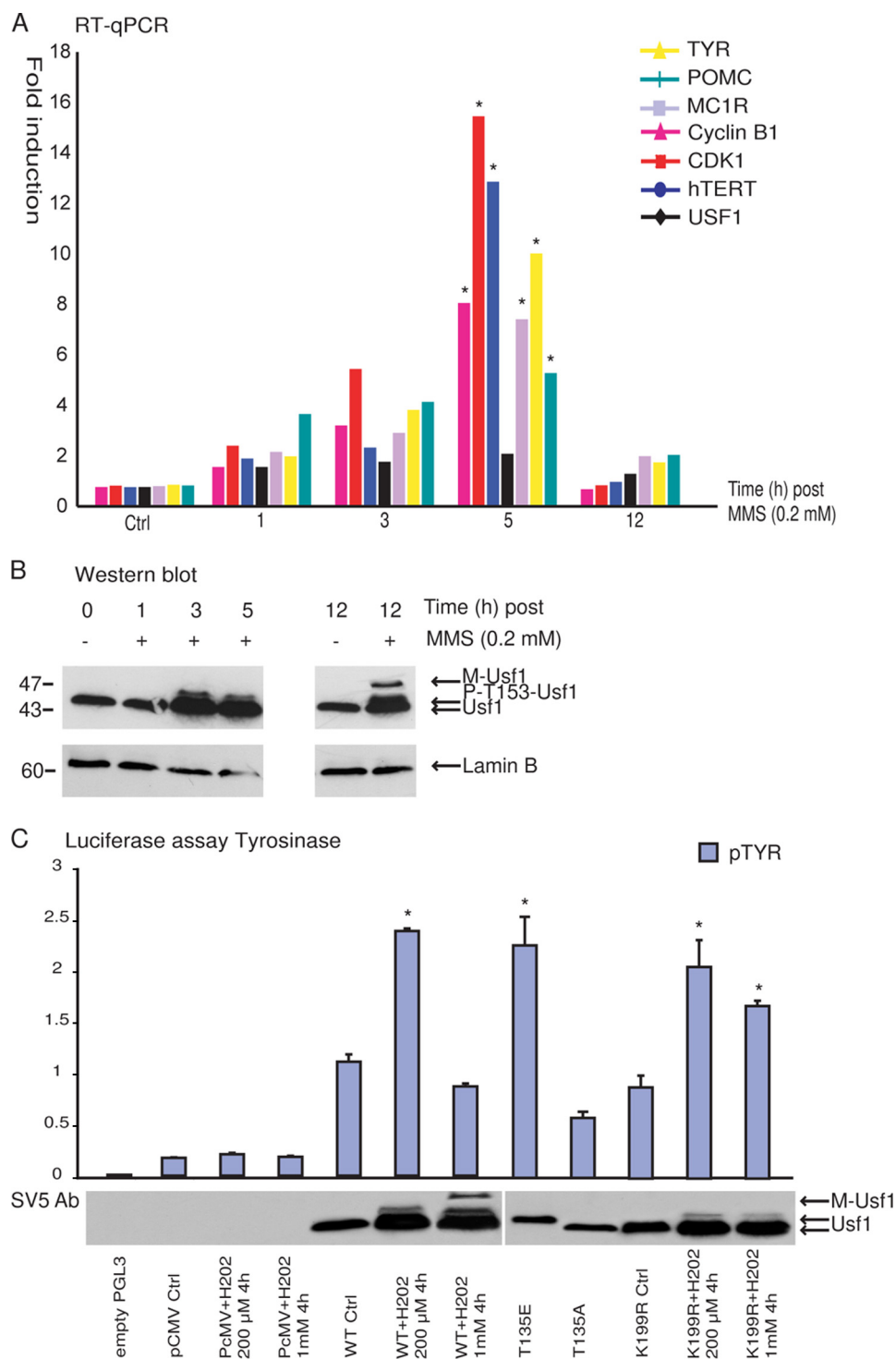


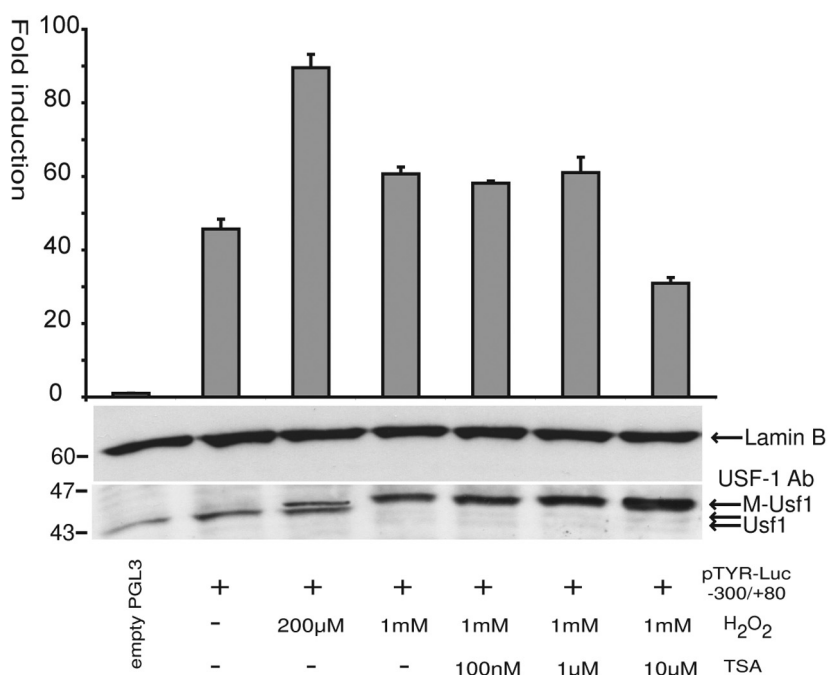
FIGURE 5. Transcriptional activity of the M-USF-1 form. Expression level of USF-1 target genes were analyzed under specific stress conditions, using quantitative reverse transcription-PCR. *A*, gene expression levels of USF-1 target genes (pigmentation genes: *POMC*, *MC1R*, and *TYR* and cell cycle genes: *CCNB1*, *CDC2*, and *TERT*) were analyzed by real-time PCR over a single time course (12 h) using MMS-treated (0.2 mM) 501mel cells. *USF-1* expression level, which remains constant over the 12-h induction, was used as the calibrator gene and the non-induced condition as the reference. *B*, Western blot analysis of USF-1 phosphorylation state (anti-USF-1 Ab, Santa Cruz Biotechnology), was performed on protein samples prepared from 501mel cells, respectively, over the 12-h time course after MMS stimulation. *C*, luciferase assays with PGL3-TYR promoter (−300/+80) in the presence of different constructs for USF-1 after or not treatment by different doses of H₂O₂ (200 μ M and 1 mM), which, respectively, induces activation of USF-1 by phosphorylation of Thr-153 and apparition of M-USF-1, confirmed by Western blot analysis of 501mel cells extracts 48 h after cotransfection, were performed in 501mel cells to analyze the transcriptional activity of USF-1 after modification.

tated 47-kDa USF-1 using antibodies raised against phosphorylated threonine and acetylated lysine, the use of specific inhibitors (SB203580, SB202190, and trichostatin A), and the purification of the 47-kDa USF-1 using a phospho-affinity column. Mutagenesis revealed that Lys-199 is the acetylated target residue and that phosphorylation of Thr-153 is required for Lys-199 acetylation. The appearance of the phospho-acetylated USF-1 form is thus a two-step process in response to a wide range of stress inducers: DNA damage, oxidative stress, heavy metal exposure, and biological infections. However, the kinetics of appearance of USF-1 post-translational modification is largely dependent on stress type, stress level, and cellular context. Indeed, although a stepwise process is necessary to obtain the phospho-acetylated form, under very high stress or prolonged induction the phospho-acetylated form can be the only one present. When mild stress is applied the three forms tend to be in a tight equilibrium that can be disrupted easily, maintaining cell homeostasis.

Acetylation is known to modulate gene expression by affecting directly transcription factors, transcriptional activities, and DNA binding affinities (23, 24), by interfering also with their stability and their interactions with other proteins (25–27), or by modulating their sub-cellular localization and subsequently their transcriptional role (28). Phospho-acetylated USF-1 remains nuclear and binds *in vivo* and *in vitro* to E-box (CANNTG)-containing promoters. However, phospho-acetylated-USF-1 displays distinct binding capacities according to the nature of the E-box sequences (CACGTG or CATGTG), a reduced binding being observed with the latter (M-box). Transcriptional capacity of phospho-acetylated USF-1 is also altered. Indeed, real-time PCR analysis quantifying the endogenous mRNA level of USF-1 target genes, presenting either M-box or E-box cis-acting elements, indicates

Stress-dependent Acetylation of USF-1

A Luciferase assay Tyrosinase



B Luciferase assay Tyrosinase

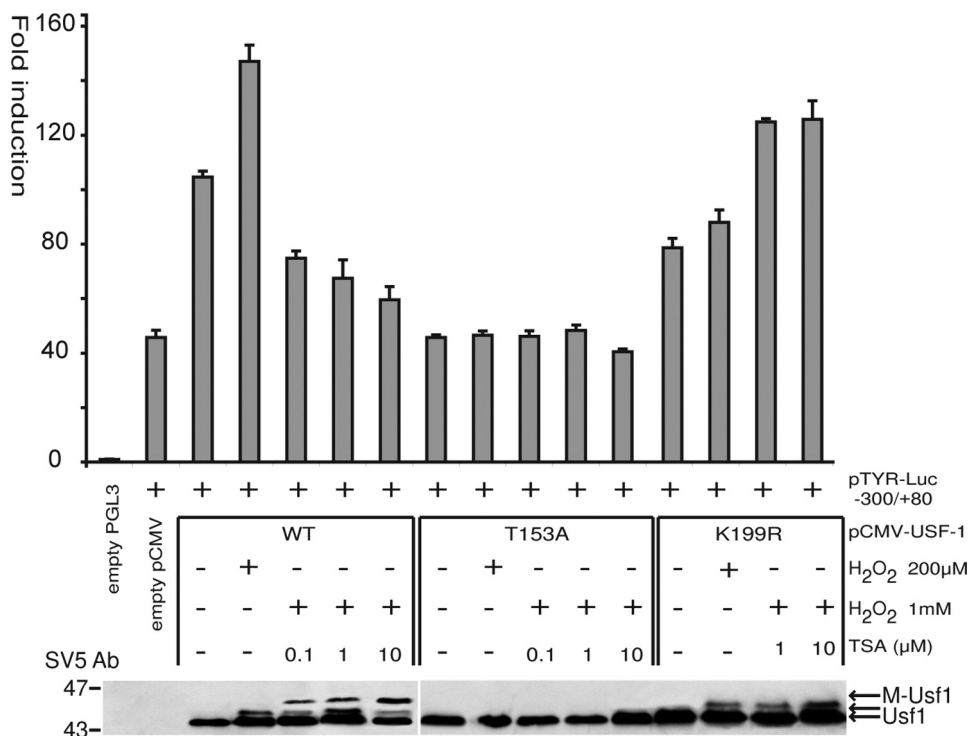


FIGURE 6. Phospho-dependant acetylation of USF-1 is associated with a decrease of transcriptional activity. *A*, luciferase assays with PGL3-TYR promoter (−300/+80) after or not treatment by different doses of H₂O₂ (200 μM and 1 mM), which, respectively, induces activation of USF-1 by phosphorylation of Thr-153 and apparition of M-USF-1 in the presence of different doses of trichostatin A, confirmed by Western blot analysis of 501mel cells extracts 48 h after cotransfection. *B*, luciferase assays with PGL3-TYR promoter (−300/+80) in the presence of different forms of USF-1 after or not treatment by different doses of H₂O₂ and trichostatin A. Phosphorylation and acetylation is confirmed by Western blot analysis.

that the presence of phospho-acetylated-USF-1 correlates with no induction of targets gene mRNA level. P-T153-USF-1 correlates with an increase of mRNA target genes implicated in the

pigmentation pathway (*POMC*, *MC1R*, and *TYR*) (12, 13) and cell cycle regulation (*CCNB1*, *CDC2*, and *TERT*) (8, 29). *In vitro* transcription assays also support these data, linking directly phospho-acetylation of USF-1 modification to gene down-regulation. We believe that, in the case of an M-box-containing promoter (CAT-GTG: *TYR*), acetylation of Lys-199 could also modulate DNA binding affinity and add to the loss of target gene expression. Indeed, the acetylated residue, just upstream from the basic region involved in specific DNA recognition and binding, could affect *de novo* USF-1-DNA interactions in respect to definite target sequence, modulating amino acid and nucleotide-specific contacts (30). However in the case of E-box containing promoters (CACGTG: *CCNB1*, *CDC2*, and *TERT*), where DNA binding is not affected, distinct or complementary mechanisms would occur, including protein-protein interactions.

USF-1 is a master transcriptional regulator, mediating the recruitment of enzymes (histone acetyltransferase and histone methyltransferase) that modify histones allowing chromatin remodeling and opening and maintaining also the chromatin barrier, which subsequently promotes DNA loading of the transcription machinery and transcription activation (31, 32). Transcription is completed by the interaction of USF-1 with members of the Pre-initiation complex (TFIID and TAFs) (33) and with specific transcription factors (SP1 and MTF1) leading to cooperative transcriptional up-regulation (34, 35). Histone acetylations have been known for decades (36), and histone acetyltransferases (PCAF and CREB-binding protein etc.) that do catalyze histone acetylation, are also reported to modify non-histone substrates (p53), including members of the basic-helix-loop-helix families (MyoD and c-Myc) modulating their functions (23, 26, 37, 38). According to cell context, chromatin could be silenced by direct acetylation of the preformed active USF-1-euchromatine complex in a histone

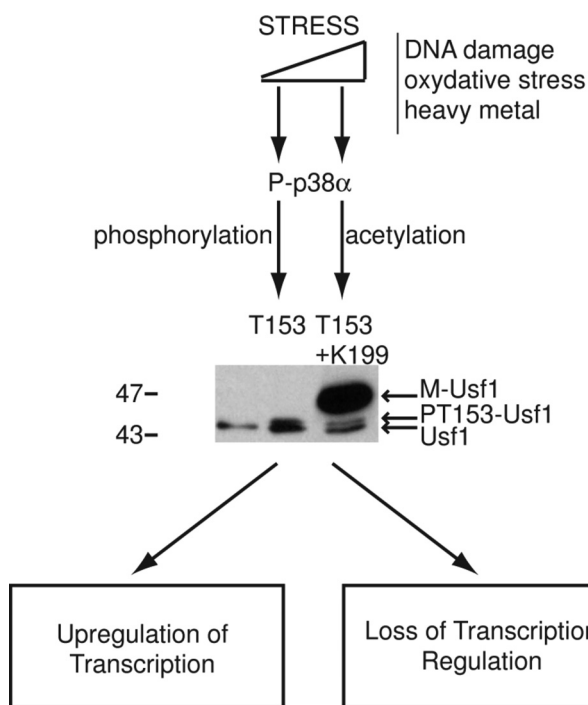


FIGURE 7. USF-1 gene expression regulation model. Following, low levels of stress, the USF-1 transcription factor is activated through phosphorylation of the Thr-153 residue (PT153-USF-1) in a p38-dependent manner, leading to the up-regulation of USF target gene networks allowing the tanning response, cell cycle, and proliferation control. When stress is above a critical threshold (STRESS), the USF-1 transcription factor is acetylated on Lys-199 in a phospho-Thr-153-dependent fashion, leading to the appearance of a 47-kDa form (M-USf1), associated with loss of transcriptional activation.

acetyltransferase-dependent manner, on Lys-199 protruding just out of the CACGTG-DNA binding complex, abrogating then the interaction of USF-1 with transcriptional cofactors (39). In accordance, USF-1 protein is described to lose transcriptional activity in breast cancer cell lines, whereas normal human mammary epithelial cells are not affected (40) and recombinant USF-1 protein lacks transcriptional activity in Saos-2 cells while it remains active in HeLa cells (41). Taken together those biological data support our results and indicate that USF-1 transcriptional activity is regulated and dependent on cell context.

Cell context and environmental signals modulate tightly gene expression for adaptive issues, with sequential up and down-regulation of gene expression. In this context we believe that the USF-1 transcription factor is a key sensor of stress signaling, proceeding in a two-step model (Fig. 7). The USF-1 modifications appears in response to various stimuli, including cadmium and arsenic heavy metals stimulation, oxidative stress, and DNA damage, allowing regulation of specific related target genes, respectively: *COX2*, *HO1*, *TP53*, and *BRCA2* (42–45). Similarly, USF-1 protein is modified upon virus infection, and viral genes are direct USF-1 targets (46). This suggests that stress-induced USF-1 forms participate in stepwise regulation: comprising a first positive step, followed by a second negative one, when stress is above a critical threshold (Fig. 7). The control of post-translational modification of USF-1 is accurately regulated and balanced. Although phosphorylation of USF-1 on Thr-153 occurs tightly after low level of stress and is easily

reversible, phospho-dependent acetylation of USF-1 on Lys-199 requires a high level of stress leading to a massive modification of the transcription factor with serious consequences for transcription regulation and cell issue. Indeed, in normal cells, low levels of stress, compatible with life, results in positive gene regulation as a cell cycle control, tanning response, whereas excess of stress induces gene silencing with subsequent apoptosis of normal cells or uncontrolled proliferation of malignant cells. Tumor progression is reported to present abnormal levels of oxidative stress (14, 47–48), which would favor the appearance of the phospho-acetylated USF-1 form compatible with loss of USF-1 transcriptional activity observed in breast cancer cell lines (40).

The identification of this new phospho-acetylated USF-1 modification in response to critical levels of stress, with new regulatory properties, highlights the dual functions of the USF-1 transcription factor, giving new insight in USF-1 target gene regulation networks in regards to environmental cell conditions, including DNA damage and cancer development.

Acknowledgment—We acknowledge members of the IFR-140 “Oxidative Stress Network” for their support and discussion.

REFERENCES

- Corre, S., and Galibert, M. D. (2005) *Pigment Cell Res.* **18**, 337–348
- Sirito, M., Walker, S., Lin, Q., Kozlowski, M. T., Klein, W. H., and Sawadogo, M. (1992) *Gene Expr.* **2**, 231–240
- Sirito, M., Lin, Q., Maity, T., and Sawadogo, M. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 427–433
- Sirito, M., Lin, Q., Deng, J. M., Behringer, R. R., and Sawadogo, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 3758–3763
- Casado, M., Vallet, V. S., Kahn, A., and Vaulont, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2009–2013
- Galibert, M. D., Boucontet, L., Goding, C. R., and Meo, T. (1997) *J. Immunol.* **159**, 6176–6183
- Roth, U., Jungermann, K., and Kietzmann, T. (2004) *Biol. Chem.* **385**, 239–247
- North, S., Espanel, X., Bantignies, F., Viollet, B., Vallet, V., Jalinot, P., Brun, G., and Gillet, G. (1999) *Oncogene* **18**, 1945–1955
- Pawar, S. A., Szentirmay, M. N., Hermeking, H., and Sawadogo, M. (2004) *Oncogene* **23**, 6125–6135
- Goueli, B. S., and Janknecht, R. (2003) *Oncogene* **22**, 8042–8047
- Kingsley-Kallesen, M. L., Kelly, D., and Rizzino, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34020–34028
- Corre, S., Primot, A., Sviderskaya, E., Bennett, D. C., Vaulont, S., Goding, C. R., and Galibert, M. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 51226–51233
- Galibert, M. D., Carreira, S., and Goding, C. R. (2001) *EMBO J.* **20**, 5022–5031
- Takahashi, K., Nakayama, M., Takeda, K., Fujia, H., and Shibahara, S. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 2356–2361
- Schwahn, D. J., Xu, W., Herrin, A. B., Bales, E. S., and Medrano, E. E. (2001) *Pigment Cell Res.* **14**, 32–39
- Carreira, S., Liu, B., and Goding, C. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 21920–21927
- Rahaus, M., Desloges, N., Yang, M., Ruyechan, W. T., and Wolff, M. H. (2003) *J. Gen. Virol.* **84**, 2957–2967
- Zachos, G., Clements, B., and Conner, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5097–5103
- Nowak, M., Helleboid-Chapman, A., Jakel, H., Martin, G., Duran-Sandoval, D., Staels, B., Rubin, E. M., Pennacchio, L. A., Taskinen, M. R., Fruchart-Najib, J., and Fruchart, J. C. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1537–1548
- Cheung, E., Mayr, P., Coda-Zabetta, F., Woodman, P. G., and Boam, D. S. (1999) *Biochem. J.* **344**, 145–152

Stress-dependent Acetylation of USF-1

21. Xiao, Q., Kenessey, A., and Ojamaa, K. (2002) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H213–219
22. Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guérardel, C., Dejean, A., and Leprince, D. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2661–2675
23. Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Hala-zonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001) *Mol. Cell* **8**, 1243–1254
24. Saha, R. N., Jana, M., and Pahan, K. (2007) *J. Immunol.* **179**, 7101–7109
25. Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 50607–50611
26. Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C. J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P. M., Lane, W. S., Blobel, G. A., and Mc-Mahon, S. B. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10826–10834
27. Kawaguchi, Y., Ito, A., Appella, E., and Yao, T. P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 1394–1400
28. Calnan, D. R., and Brunet, A. (2008) *Oncogene* **27**, 2276–2288
29. Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Bonham, M., Bisi, J., and Babiss, L. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2782–2790
30. Baxevanis, A. D., and Vinson, C. R. (1993) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 278–285
31. West, A. G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M. D., and Felsenfeld, G. (2004) *Mol. Cell* **16**, 453–463
32. Huang, S., Li, X., Yusufzai, T. M., Qiu, Y., and Felsenfeld, G. (2007) *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7991–8002
33. Chiang, C. M., and Roeder, R. G. (1995) *Science* **267**, 531–536
34. Andrews, G. K. (2000) *Biochem. Pharmacol.* **59**, 95–104
35. Liu, M., Whetstine, J. R., Payton, S. G., Ge, Y., Flatley, R. M., and Matherly, L. H. (2004) *Biochem. J.* **383**, 249–257
36. Pogo, B. G., Allfrey, V. G., and Mirsky, A. E. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 805–812
37. Poleskaya, A., Duquet, A., Naguibneva, I., Weise, C., Vervisch, A., Bengal, E., Hucho, F., Robin, P., and Harel-Bellan, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34359–34364
38. Sartorelli, V., Puri, P. L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J. Y., and Kedes, L. (1999) *Mol. Cell* **4**, 725–734
39. Ferré-D'Amaré, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G., and Burley, S. K. (1994) *EMBO J.* **13**, 180–189
40. Ismail, P. M., Lu, T., and Sawadogo, M. (1999) *Oncogene* **18**, 5582–5591
41. Qyang, Y., Luo, X., Lu, T., Ismail, P. M., Krylov, D., Vinson, C., and Sawadogo, M. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1508–1517
42. Davis, P. L., Miron, A., Andersen, L. M., Iglehart, J. D., and Marks, J. R. (1999) *Oncogene* **18**, 6000–6012
43. Hock, T. D., Nick, H. S., and Agarwal, A. (2004) *Biochem. J.* **383**, 209–218
44. Reisman, D., and Rotter, V. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 345–350
45. Wu, Y. L., and Wiltbank, M. C. (2002) *Biol. Reprod.* **66**, 1505–1514
46. Maekawa, T., Sudo, T., Kurimoto, M., and Ishii, S. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 4689–4694
47. Deininger, M. H., Meyermann, R., Trautmann, K., Duffner, F., Grote, E. H., Wickboldt, J., and Schluesener, H. J. (2000) *Brain Res.* **882**, 1–8
48. Meyskens, F. L., Jr., Farmer, P., and Fruehauf, J. P. (2001) *Pigment Cell Res.* **14**, 148–154

Références Bibliographiques

Aboussekhra, A., M. Biggerstaff, M. K. Shivji, J. A. Vilpo, V. Moncollin, V. N. Podust, M. Protic, U. Hubscher, J. M. Egly et R. D. Wood (1995). "Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components." Cell **80**(6): 859-68.

Adimoolam, S. et J. M. Ford (2002). "p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12985-90.

Ahmed, N. U., M. Ueda, O. Nikaido, T. Osawa et M. Ichihashi (1999). "High levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation." Br J Dermatol **140**(2): 226-31.

Aksan, I. et C. R. Goding (1998). "Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo." Mol Cell Biol **18**(12): 6930-8.

Alani, E., R. Thresher, J. D. Griffith et R. D. Kolodner (1992). "Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein." J Mol Biol **227**(1): 54-71.

Allinen, M (2002). "DNA damage response genes and chromosome 11q21-q24 candidate tumor suppressor genes in breast cancer."
<http://herkules.oulu.fi/isbn9514267141/html/index.html>

Andrews, G. K., D. K. Lee, R. Ravindra, P. Lichtlen, M. Siritto, M. Sawadogo et W. Schaffner (2001). "The transcription factors MTF-1 and USF1 cooperate to regulate mouse metallothionein-I expression in response to the essential metal zinc in visceral endoderm cells during early development." Embo J **20**(5): 1114-22.

Aoki, H. et O. Moro (2002). "Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R)." Life Sci **71**(18): 2171-9.

Araki, M., C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugawara, J. Kondoh, Y. Ohkuma et F. Hanaoka (2001). "Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair." J Biol Chem **276**(22): 18665-72.

Ashcroft, M., Y. Taya et K. H. Vousden (2000). "Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53." Mol Cell Biol **20**(9): 3224-33.

Avril, M. F., M. Brodin, P. Dréno, A. Dréno, M. Gotman, M. Jeanmougin, D. Le Maître, G. Mischlich et G. Reuter (2002). Soleil et peaux: bénéfiques, risques et prévention, Masson.

Badano, J. L., T. M. Teslovich et N. Katsanis (2005). "The centrosome in human genetic disease." Nat Rev Genet **6**(3): 194-205.

Baker, S. J., E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, P. vanTuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, R. White et B. Vogelstein (1989).

"Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." Science **244**(4901): 217-21.

Balint, E. E. et K. H. Vousden (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." Br J Cancer **85**(12): 1813-23.

Bang, D. D., V. Timmermans, R. Verhage, A. M. Zeeman, P. van de Putte et J. Brouwer (1995). "Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD16." Nucleic Acids Res **23**(10): 1679-85.

Baxevanis, A. D. et C. R. Vinson (1993). "Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?" Curr Opin Genet Dev **3**(2): 278-85.

Berg, R. J., H. J. Ruven, A. T. Sands, F. R. de Gruijl et L. H. Mullenders (1998). "Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema." J Invest Dermatol **110**(4): 405-9.

Bertrand, P., Y. Saintigny et B. S. Lopez (2004). "p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination." Trends Genet **20**(6): 235-43.

Beukers, R. et W. Berends (1960). "Isolation and identification of the irradiation product of thymine." Biochim Biophys Acta **41**: 550-1.

Bohr, V. A., C. A. Smith, D. S. Okumoto et P. C. Hanawalt (1985). "DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall." Cell **40**(2): 359-69.

Braun, S., K. Matuschewski, M. Rape, S. Thoms et S. Jentsch (2002). "Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates." Embo J **21**(4): 615-21.

Bregman, D. B., R. Halaban, A. J. van Gool, K. A. Henning, E. C. Friedberg et S. L. Warren (1996). "UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11586-90.

Brignone, C., K. E. Bradley, A. F. Kisselev et S. R. Grossman (2004). "A post-ubiquitination role for MDM2 and hHR23A in the p53 degradation pathway." Oncogene **23**(23): 4121-9.

Brooks, C. L. et W. Gu (2006). "p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond." Mol Cell **21**(3): 307-15.

Bruls, W. A., H. Slaper, J. C. van der Leun et L. Berrens (1984). "Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths." Photochem Photobiol **40**(4): 485-94.

Busso, D., A. Keriel, B. Sandroock, A. Poterszman, O. Gileadi et J. M. Egly (2000). "Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIH transcription activities." J Biol Chem **275**(30): 22815-23.

Bustamante, J., L. Bredeston, G. Malanga et J. Mordoh (1993). "Role of melanin as a scavenger of active oxygen species." Pigment Cell Res **6**(5): 348-53.

Casado, M., V. S. Vallet, A. Kahn et S. Vaulont (1999). "Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver." J Biol Chem **274**(4): 2009-13.

Césarini, J. P. (1990). La peau, presses universitaires de France.

Chen, J., S. Larochelle, X. Li et B. Suter (2003). "Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression." Nature **424**(6945): 228-32.

Chen, L., U. Shinde, T. G. Ortolan et K. Madura (2001). "Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly." EMBO Rep **2**(10): 933-8.

Chen, X., J. Zhang, J. Lee, P. S. Lin, J. M. Ford, N. Zheng et P. Zhou (2006). "A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged DNA binding proteins." Mol Cell **22**(4): 489-99.

Ciechanover, A. et R. Ben-Saadon (2004). "N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in." Trends Cell Biol **14**(3): 103-6.

Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, M. Bonham, J. Bisi et L. Babiss (1995). "Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter." Mol Cell Biol **15**(5): 2782-90.

Coin, F., J. Auriol, A. Tapias, P. Clivio, W. Vermeulen et J. M. Egly (2004). "Phosphorylation of XPB helicase regulates TFIIH nucleotide excision repair activity." Embo J **23**(24): 4835-46.

Coin, F., V. Oksenysh et J. M. Egly (2007). "Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair." Mol Cell **26**(2): 245-56.

Collings, A., S. Hoyssa, M. Fan, M. Kahonen, N. Hutri-Kahonen, J. Marniemi, M. Juonala, J. S. Viikari, O. T. Raitakari et T. J. Lehtimäki (2008). "Allelic variants of upstream transcription factor 1 associate with carotid artery intima-media thickness: the Cardiovascular Risk in Young Finns study." Circ J **72**(7): 1158-64.

Compe, E., M. Malerba, L. Soler, J. Marescaux, E. Borrelli et J. M. Egly (2007). "Neurological defects in trichothiodystrophy reveal a coactivator function of TFIIH." Nat Neurosci **10**(11): 1414-22.

Corre, S. et M. D. Galibert (2005). "Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors." Pigment Cell Res **18**(5): 337-48.

Corre, S., K. Mekideche, H. Adamski, J. Mosser, E. Watier et M. D. Galibert (2006). "In vivo and ex vivo UV-induced analysis of pigmentation gene expressions." J Invest Dermatol **126**(4): 916-8.

Corre, S., A. Primot, Y. Baron, J. Le Seyec, C. Goding et M. D. Galibert (2009). "Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation." J Biol Chem **284**(28): 18851-62.

Corre, S., A. Primot, E. Sviderskaya, D. C. Bennett, S. Vaulont, C. R. Goding et M. D. Galibert (2004). "UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1)." J Biol Chem **279**(49): 51226-33.

Costa, R. M., V. Chigancas, S. Galhardo Rda, H. Carvalho et C. F. Menck (2003). "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway." Biochimie **85**(11): 1083-99.

Coutts, A. S., C. J. Adams et N. B. La Thangue (2009). "p53 ubiquitination by Mdm2: a never ending tail?" DNA Repair (Amst) **8**(4): 483-90.

D'Amours, D. et S. P. Jackson (2001). "The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation." Genes Dev **15**(17): 2238-49.

Dantuma, N. P., C. Heinen et D. Hoogstraten (2009). "The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation." DNA Repair (Amst) **8**(4): 449-60.

Davies, O. R. et L. Pellegrini (2007). "Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 475-83.

Davis, P. L., A. Miron, L. M. Andersen, J. D. Iglehart et J. R. Marks (1999). "Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter." Oncogene **18**(44): 6000-12.

de Boer, J. et J. H. Hoeijmakers (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes." Carcinogenesis **21**(3): 453-60.

de Laat, W. L., A. M. Sijbers, H. Odijk, N. G. Jaspers et J. H. Hoeijmakers (1998). "Mapping of interaction domains between human repair proteins ERCC1 and XPF." Nucleic Acids Res **26**(18): 4146-52.

DeLeo, A. B., G. Jay, E. Appella, G. C. Dubois, L. W. Law et L. J. Old (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2420-4.

Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart et M. Rechsteiner (1994). "A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates." J Biol Chem **269**(10): 7059-61.

Diffey, B. L. (2002). "Sources and measurement of ultraviolet radiation." Methods **28**(1): 4-13.

Eker, A. P., C. Quayle, I. Chaves et G. T. van der Horst (2009). "DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems." Cell Mol Life Sci **66**(6): 968-80.

el-Deiry, W. S. (1998). "Regulation of p53 downstream genes." Semin Cancer Biol **8**(5): 345-57.

Esashi, F., V. E. Galkin, X. Yu, E. H. Egelman et S. C. West (2007). "Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2." Nat Struct Mol Biol **14**(6): 468-74.

Evans, E., J. G. Moggs, J. R. Hwang, J. M. Egly et R. D. Wood (1997). "Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors." Embo J **16**(21): 6559-73.

Farras, R., G. Bossis, E. Andermarcher, I. Jariel-Encontre et M. Piechaczyk (2005). "Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy?" Crit Rev Oncol Hematol **54**(1): 31-51.

Finlay, C. A., P. W. Hinds et A. J. Levine (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." Cell **57**(7): 1083-93.

Finley, D., B. Bartel et A. Varshavsky (1989). "The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis." Nature **338**(6214): 394-401.

Firlej, V., B. Bocquet, X. Desbiens, Y. de Launoit et A. Chotteau-Lelievre (2005). "Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site." J Biol Chem **280**(2): 887-98.

Fitch, M. E., I. V. Cross, S. J. Turner, S. Adimoolam, C. X. Lin, K. G. Williams et J. M. Ford (2003). "The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts." DNA Repair (Amst) **2**(7): 819-26.

Ford, J. M. (2005). "Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53." Mutat Res **577**(1-2): 195-202.

Fousteri, M., W. Vermeulen, A. A. van Zeeland et L. H. Mullenders (2006). "Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo." Mol Cell **23**(4): 471-82.

Galibert, M. D., L. Boucontet, C. R. Goding et T. Meo (1997). "Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor." J Immunol **159**(12): 6176-83.

Galibert, M. D., S. Carreira et C. R. Goding (2001). "The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression." Embo J **20**(17): 5022-31.

Ge, Y., T. L. Jensen, L. H. Matherly et J. W. Taub (2003). "Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity." J Biol Chem **278**(50): 49901-10.

Giglia-Mari, G., F. Coin, J. A. Ranish, D. Hoogstraten, A. Theil, N. Wijgers, N. G. Jaspers, A. Raams, M. Argentini, P. J. van der Spek, E. Botta, M. Stefanini, J. M. Egly, R. Aebersold, J. H. Hoeijmakers et W. Vermeulen (2004). "A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A." Nat Genet **36**(7): 714-9.

Gillette, T. G., S. Yu, Z. Zhou, R. Waters, S. A. Johnston et S. H. Reed (2006). "Distinct functions of the ubiquitin-proteasome pathway influence nucleotide excision repair." Embo J **25**(11): 2529-38.

Glockzin, S., F. X. Ogi, A. Hengstermann, M. Scheffner et C. Blattner (2003). "Involvement of the DNA repair protein hHR23 in p53 degradation." Mol Cell Biol **23**(24): 8960-9.

Goding, C. R. (2000). "Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage." Genes Dev **14**(14): 1712-28.

Goldstein, G. (1974). "Isolation of bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus." Nature **247**(5435): 11-4.

Goldstein, G., M. Scheid, U. Hammerling, D. H. Schlesinger, H. D. Niall et E. A. Boyse (1975). "Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(1): 11-5.

Gottlieb, T. M. et S. P. Jackson (1993). "The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen." Cell **72**(1): 131-42.

Goueli, B. S. et R. Janknecht (2003). "Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor." Oncogene **22**(39): 8042-7.

Graham-Brown, R. et T. Burns (1991). Cours de dermatologie, Arnette.

Groenen, P. M., E. Garcia, P. Debeer, K. Devriendt, J. P. Fryns et W. J. Van de Ven (1996). "Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia." Genomics **38**(2): 141-8.

Groisman, R., I. Kuraoka, O. Chevallier, N. Gaye, T. Magnaldo, K. Tanaka, A. F. Kisselev, A. Harel-Bellan et Y. Nakatani (2006). "CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome." Genes Dev **20**(11): 1429-34.

Groisman, R., J. Polanowska, I. Kuraoka, J. Sawada, M. Saijo, R. Drapkin, A. F. Kisselev, K. Tanaka et Y. Nakatani (2003). "The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA

complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage." Cell **113**(3): 357-67.

Groll, M., W. Heinemeyer, S. Jager, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf et R. Huber (1999). "The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10976-83.

Hachiya, A., A. Kobayashi, A. Ohuchi, Y. Takema et G. Imokawa (2001). "The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation." J Invest Dermatol **116**(4): 578-86.

Hale, T. K. et A. W. Braithwaite (1995). "Identification of an upstream region of the mouse p53 promoter critical for transcriptional expression." Nucleic Acids Res **23**(4): 663-9.

Hanawalt, P. C. (2002). "Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation." Oncogene **21**(58): 8949-56.

Hartmann-Petersen, R. et C. Gordon (2004). "Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins." Semin Cell Dev Biol **15**(2): 247-59.

He, Q., H. Peng, S. J. Collins, T. J. Triche et L. Wu (2004). "Retinoid-modulated MAT1 ubiquitination and CAK activity." Faseb J **18**(14): 1734-6.

He, Y. Y., J. Pi, J. L. Huang, B. A. Diwan, M. P. Waalkes et C. F. Chignell (2006). "Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance." Oncogene **25**(26): 3680-8.

Hemesath, T. J., E. R. Price, C. Takemoto, T. Badalian et D. E. Fisher (1998). "MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes." Nature **391**(6664): 298-301.

Henning, K. A., L. Li, N. Iyer, L. D. McDaniel, M. S. Reagan, R. Legerski, R. A. Schultz, M. Stefanini, A. R. Lehmann, L. V. Mayne et E. C. Friedberg (1995). "The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF." Cell **82**(4): 555-64.

Henrion, A. A., S. Vaulont, M. Raymondjean et A. Kahn (1996). "Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family." Mamm Genome **7**(11): 803-9.

Heshmati, F. (2003). "Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy." Transfus Apher Sci **29**(1): 61-70.

Hess, M. T., U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese et H. Naegeli (1997). "Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6664-9.

Hey, T., G. Lipps, K. Sugawara, S. Iwai, F. Hanaoka et G. Krauss (2002). "The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay." Biochemistry **41**(21): 6583-7.

- Hicke, L. (2001). "A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin." Cell **106**(5): 527-30.
- Hicke, L., H. L. Schubert et C. P. Hill (2005). "Ubiquitin-binding domains." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 610-21.
- Hill, R. F. (1958). "A radiation-sensitive mutant of Escherichia coli." Biochim Biophys Acta **30**(3): 636-7.
- Hirose, Y. et Y. Ohkuma (2007). "Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression." J Biochem **141**(5): 601-8.
- Holzappel, C., J. Baumert, H. Grallert, A. M. Muller, B. Thorand, N. Khuseyinova, C. Herder, C. Meisinger, H. Hauner, H. E. Wichmann, W. Koenig, T. Illig et N. Klopp (2008). "Genetic variants in the USF1 gene are associated with low-density lipoprotein cholesterol levels and incident type 2 diabetes mellitus in women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002." Eur J Endocrinol **159**(4): 407-16.
- Hopfner, K. P., L. Craig, G. Moncalian, R. A. Zinkel, T. Usui, B. A. Owen, A. Karcher, B. Henderson, J. L. Bodmer, C. T. McMurray, J. P. Carney, J. H. Petrini et J. A. Tainer (2002). "The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair." Nature **418**(6897): 562-6.
- Hoppe, T. (2005). "Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all." Trends Biochem Sci **30**(4): 183-7.
- Houtsmuller, A. B., S. Rademakers, A. L. Nigg, D. Hoogstraten, J. H. Hoeijmakers et W. Vermeulen (1999). "Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells." Science **284**(5416): 958-61.
- Howard-Flanders, P., R. P. Boyce et L. Theriot (1966). "Three loci in Escherichia coli K-12 that control the excision of pyrimidine dimers and certain other mutagen products from DNA." Genetics **53**(6): 1119-36.
- Hsieh, P. et K. Yamane (2008). "DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing." Mech Ageing Dev **129**(7-8): 391-407.
- Hunt, G., S. Kyne, S. Ito, K. Wakamatsu, C. Todd et A. Thody (1995). "Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes." Pigment Cell Res **8**(4): 202-8.
- Hwang, B. J., J. M. Ford, P. C. Hanawalt et G. Chu (1999). "Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 424-8.

Imokawa, G., T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi et Y. Yada (1997). "The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis." Pigment Cell Res **10**(4): 218-28.

Ito, S., I. Kuraoka, P. Chymkowitch, E. Compe, A. Takedachi, C. Ishigami, F. Coin, J. M. Egly et K. Tanaka (2007). "XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients." Mol Cell **26**(2): 231-43.

Jaiswal, A. S. et S. Narayan (2001). "Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene." J Cell Biochem **81**(2): 262-77.

Janion, C. (2008). "Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*." Int J Biol Sci **4**(6): 338-44.

Jin, J., X. Li, S. P. Gygi et J. W. Harper (2007). "Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging." Nature **447**(7148): 1135-8.

Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-46.

Jones, C. J. et R. D. Wood (1993). "Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA." Biochemistry **32**(45): 12096-104.

Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, K. Wakamatsu, S. Ito, M. A. Pipitone et Z. A. Abdel-Malek (2003). "Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round?" Pigment Cell Res **16**(5): 434-47.

Kamiuchi, S., M. Saijo, E. Citterio, M. de Jager, J. H. Hoeijmakers et K. Tanaka (2002). "Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 201-6.

Kaur, M., M. Pop, D. Shi, C. Brignone et S. R. Grossman (2007). "hHR23B is required for genotoxic-specific activation of p53 and apoptosis." Oncogene **26**(8): 1231-7.

Kawanishi, S., Y. Hiraku et S. Oikawa (2001). "Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging." Mutat Res **488**(1): 65-76.

Kelfkens, G., F. R. de Gruijl et J. C. van der Leun (1990). "Ozone depletion and increase in annual carcinogenic ultraviolet dose." Photochem Photobiol **52**(4): 819-23.

Kenyon, C. J. et G. C. Walker (1981). "Expression of the *E. coli* *uvrA* gene is inducible." Nature **289**(5800): 808-10.

Keriel, A (2002). " Implications de la kinase de TFIIH dans les mécanismes de régulation de la transcription." <http://eprints-scd-ulp.u-strasbg.fr:8080/126/02/KERIEL2002.pdf>

Kim, J. K., D. Patel et B. S. Choi (1995). "Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity." Photochem Photobiol **62**(1): 44-50.

Kobayashi, N., T. Muramatsu, Y. Yamashina, T. Shirai, T. Ohnishi et T. Mori (1993). "Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells." J Invest Dermatol **101**(5): 685-9.

Kobayashi, T., G. Imokawa, D. C. Bennett et V. J. Hearing (1998). "Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein)." J Biol Chem **273**(48): 31801-5.

Kobayashi, T., K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia-Borron et V. J. Hearing (1994). "Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis." Embo J **13**(24): 5818-25.

Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer et S. Jentsch (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." Cell **96**(5): 635-44.

Kolpashchikov, D. M., S. N. Khodyreva, D. Y. Khlimankov, M. S. Wold, A. Favre et O. I. Lavrik (2001). "Polarity of human replication protein A binding to DNA." Nucleic Acids Res **29**(2): 373-9.

Kraemer, K. H. (1997). "Sunlight and skin cancer: another link revealed." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 11-4.

Kraemer, K. H., M. M. Lee et J. Scotto (1984). "DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum." Carcinogenesis **5**(4): 511-4.

Kraemer, K. H., M. M. Lee et J. Scotto (1987). "Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases." Arch Dermatol **123**(2): 241-50.

Kruse, J. P. et W. Gu (2008). "SnapShot: p53 posttranslational modifications." Cell **133**(5): 930-30 e1.

Kusumoto, R., C. Masutani, K. Sugawara, S. Iwai, M. Araki, A. Uchida, T. Mizukoshi et F. Hanaoka (2001). "Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro." Mutat Res **485**(3): 219-27.

Laine, J. P. et J. M. Egly (2006). "Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II." Embo J **25**(2): 387-97.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-6.

Lane, D. P. et L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-3.

Larochelle, S., J. Chen, R. Knights, J. Pandur, P. Morcillo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, B. Suter et R. P. Fisher (2001). "T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity." Embo J **20**(14): 3749-59.

Larsen, E., K. Kwon, F. Coin, J. M. Egly et A. Klungland (2004). "Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA." DNA Repair (Amst) **3**(11): 1457-68.

Levy, C., M. Khaled et D. E. Fisher (2006). "MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene." Trends Mol Med **12**(9): 406-14.

Li, G. M. (2008). "Mechanisms and functions of DNA mismatch repair." Cell Res **18**(1): 85-98.

Li, L., X. Lu, C. Peterson et R. Legerski (1997). "XPC interacts with both HHR23B and HHR23A in vivo." Mutat Res **383**(3): 197-203.

Lin, Q., X. Luo et M. Sawadogo (1994). "Archaic structure of the gene encoding transcription factor USF." J Biol Chem **269**(39): 23894-903.

Linzer, D. I. et A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." Cell **17**(1): 43-52.

Lipsker et Cribier (2005). CANCERS CUTANES EPITHELIAUX. EPIDEMIOLOGIE, ETIOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE, DIAGNOSTIC, PRINCIPES DE TRAITEMENT. Faculte de medecine de Strasbourg, module 10 de cancerologie clinique onco-hematologie.

Lisby, M., J. H. Barlow, R. C. Burgess et R. Rothstein (2004). "Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins." Cell **118**(6): 699-713.

Ljungman, M. et D. P. Lane (2004). "Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage." Nat Rev Cancer **4**(9): 727-37.

Madura, K. et S. Prakash (1990). "Transcript levels of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 increase in response to UV light and in meiosis but remain constant in the mitotic cell cycle." Nucleic Acids Res **18**(16): 4737-42.

Maillard, O., S. Solyom et H. Naegeli (2007). "An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair." PLoS Biol **5**(4): e79.

Masutani, C., M. Araki, K. Sugawara, P. J. van der Spek, A. Yamada, A. Uchida, T. Maekawa, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers et F. Hanaoka (1997). "Identification and characterization of XPC-binding domain of hHR23B." Mol Cell Biol **17**(12): 6915-23.

Masutani, C., R. Kusumoto, A. Yamada, N. Dohmae, M. Yokoi, M. Yuasa, M. Araki, S. Iwai, K. Takio et F. Hanaoka (1999). "The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta." Nature **399**(6737): 700-4.

Masutani, C., K. Sugasawa, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P. J. van der Spek, D. Bootsma et al. (1994). "Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23." Embo J **13**(8): 1831-43.

Matsuda, T., M. Saijo, I. Kuraoka, T. Kobayashi, Y. Nakatsu, A. Nagai, T. Enjoji, C. Masutani, K. Sugasawa, F. Hanaoka et al. (1995). "DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA)." J Biol Chem **270**(8): 4152-7.

Matsukawa, T., Y. Inoue, Y. Oishi, H. Kato et T. Noguchi (2001). "Up-regulation of upstream stimulatory factors by protein malnutrition and its possible role in regulation of the IGF-binding protein-1 gene." Endocrinology **142**(11): 4643-51.

Matsunaga, T., D. Mu, C. H. Park, J. T. Reardon et A. Sancar (1995). "Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies." J Biol Chem **270**(35): 20862-9.

May, P. et E. May (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein." Oncogene **18**(53): 7621-36.

Meek, D. W. (2004). "The p53 response to DNA damage." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1049-56.

Méllissopoulos, A. et C. Levacher (1998). La peau, structure et physiologie, Tec & Doc Lavoisier.

Mellon, I., G. Spivak et P. C. Hanawalt (1987). "Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene." Cell **51**(2): 241-9.

Moggs, J. G., K. J. Yarema, J. M. Essigmann et R. D. Wood (1996). "Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct." J Biol Chem **271**(12): 7177-86.

Mortensen, U. H., C. Bendixen, I. Sunjevaric et R. Rothstein (1996). "DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10729-34.

Moser, J., H. Kool, I. Giakzidis, K. Caldecott, L. H. Mullenders et M. I. Fousteri (2007). "Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner." Mol Cell **27**(2): 311-23.

Mu, D., D. S. Hsu et A. Sancar (1996). "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease." J Biol Chem **271**(14): 8285-94.

Murray-Zmijewski, F., E. A. Slee et X. Lu (2008). "A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(9): 702-12.

Nandi, D., P. Tahiliani, A. Kumar et D. Chandu (2006). "The ubiquitin-proteasome system." J Biosci **31**(1): 137-55.

Nassif, N., J. Penney, S. Pal, W. R. Engels et G. B. Gloor (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." Mol Cell Biol **14**(3): 1613-25.

Ng, J. M., W. Vermeulen, G. T. van der Horst, S. Bergink, K. Sugasawa, H. Vrieling et J. H. Hoeijmakers (2003). "A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein." Genes Dev **17**(13): 1630-45.

Ng, J. M., H. Vrieling, K. Sugasawa, M. P. Ooms, J. A. Grootegoed, J. T. Vreeburg, P. Visser, R. B. Beems, T. G. Gorgels, F. Hanaoka, J. H. Hoeijmakers et G. T. van der Horst (2002). "Developmental defects and male sterility in mice lacking the ubiquitin-like DNA repair gene mHR23B." Mol Cell Biol **22**(4): 1233-45.

Nichols, A. F., T. Itoh, J. A. Graham, W. Liu, M. Yamaizumi et S. Linn (2000). "Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation." J Biol Chem **275**(28): 21422-8.

Nichols, A. F., P. Ong et S. Linn (1996). "Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype." J Biol Chem **271**(40): 24317-20.

North, S., X. Espanel, F. Bantignies, B. Viollet, V. Vallet, P. Jalinot, G. Brun et G. Gillet (1999). "Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs)." Oncogene **18**(11): 1945-55.

Nouspikel, T. (2009). "DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility." Cell Mol Life Sci **66**(6): 994-1009.

Nouspikel, T. et P. C. Hanawalt (2006). "Impaired nucleotide excision repair upon macrophage differentiation is corrected by E1 ubiquitin-activating enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16188-93.

O'Donovan, A., A. A. Davies, J. G. Moggs, S. C. West et R. D. Wood (1994). "XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair." Nature **371**(6496): 432-5.

Okuda, Y., R. Nishi, J. M. Ng, W. Vermeulen, G. T. van der Horst, T. Mori, J. H. Hoeijmakers, F. Hanaoka et K. Sugasawa (2004). "Relative levels of the two mammalian Rad23 homologs determine composition and stability of the xeroderma pigmentosum group C protein complex." DNA Repair (Amst) **3**(10): 1285-95.

Ortolan, T. G., L. Chen, P. Tongaonkar et K. Madura (2004). "Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway." Nucleic Acids Res **32**(22): 6490-500.

Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez et A. Aguilera (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." Cell Mol Life Sci **66**(6): 1039-56.

- Park, J. S., M. T. Marr et J. W. Roberts (2002). "E. coli Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation." Cell **109**(6): 757-67.
- Pastoriza-Gallego, M., J. Armier et A. Sarasin (2007). "Transcription through 8-oxoguanine in DNA repair-proficient and Csb(-)/Ogg1(-) DNA repair-deficient mouse embryonic fibroblasts is dependent upon promoter strength and sequence context." Mutagenesis **22**(5): 343-51.
- Payne, A. et G. Chu (1994). "Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage." Mutat Res **310**(1): 89-102.
- Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley et S. P. Gygi (2003). "A proteomics approach to understanding protein ubiquitination." Nat Biotechnol **21**(8): 921-6.
- Perdiz, D., P. Grof, M. Mezzina, O. Nikaido, E. Moustacchi et E. Sage (2000). "Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis." J Biol Chem **275**(35): 26732-42.
- Petermann, E., M. Ziegler et S. L. Oei (2003). "ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair." DNA Repair (Amst) **2**(10): 1101-14.
- Pettijohn, D. et P. Hanawalt (1964). "Evidence for Repair-Replication of Ultraviolet Damaged DNA in Bacteria." J Mol Biol **9**: 395-410.
- Pfeifer, G. P., Y. H. You et A. Besaratinia (2005). "Mutations induced by ultraviolet light." Mutat Res **571**(1-2): 19-31.
- Pickart, C. M. (2000). "Ubiquitin in chains." Trends Biochem Sci **25**(11): 544-8.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-33.
- Pickart, C. M. et R. E. Cohen (2004). "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(3): 177-87.
- Pollitt, R. J., F. A. Jenner et M. Davies (1968). "Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair." Arch Dis Child **43**(228): 211-6.
- Popanda, O. et H. W. Thielmann (1992). "The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1129**(2): 155-60.
- R**aasi, S. et C. M. Pickart (2003). "Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains." J Biol Chem **278**(11): 8951-9.

- Rapic-Otrin, V., M. P. McLenigan, D. C. Bisi, M. Gonzalez et A. S. Levine (2002). "Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation." Nucleic Acids Res **30**(11): 2588-98.
- Rapic-Otrin, V., V. Navazza, T. Nardo, E. Botta, M. McLenigan, D. C. Bisi, A. S. Levine et M. Stefanini (2003). "True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product." Hum Mol Genet **12**(13): 1507-22.
- Ravanat, J. L., T. Douki et J. Cadet (2001). "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 88-102.
- Read, M. L., A. R. Clark et K. Docherty (1993). "The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer." Biochem J **295** (Pt 1): 233-7.
- Reardon, J. T., T. Bessho, H. C. Kung, P. H. Bolton et A. Sancar (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9463-8.
- Reisman, D., N. B. Elkind, B. Roy, J. Beamon et V. Rotter (1993). "c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif." Cell Growth Differ **4**(2): 57-65.
- Reisman, D. et V. Rotter (1993). "The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene." Nucleic Acids Res **21**(2): 345-50.
- Ribes-Zamora, A., I. Mihalek, O. Lichtarge et A. A. Bertuch (2007). "Distinct faces of the Ku heterodimer mediate DNA repair and telomeric functions." Nat Struct Mol Biol **14**(4): 301-7.
- Ridley, A. J., J. R. Whiteside, T. J. McMillan et S. L. Allinson (2009). "Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis." Int J Radiat Biol **85**(3): 177-95.
- Riedl, T., F. Hanaoka et J. M. Egly (2003). "The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA." Embo J **22**(19): 5293-303.
- Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes et I. Leiros (2009). "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." Cell Mol Life Sci **66**(6): 981-93.
- Robinson, G. W., C. M. Nicolet, D. Kalainov et E. C. Friedberg (1986). "A yeast excision-repair gene is inducible by DNA damaging agents." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(6): 1842-6.
- Ronen, D., V. Rotter et D. Reisman (1991). "Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4128-32.

Rosenstein, B. S. et D. L. Mitchell (1987). "Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts." Photochem Photobiol **45**(6): 775-80.

Rossignol, M., I. Kolb-Cheynel et J. M. Egly (1997). "Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIF." Embo J **16**(7): 1628-37.

Roy, A. L., M. Meisterernst, P. Pognonec et R. G. Roeder (1991). "Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF." Nature **354**(6350): 245-8.

Runger, T. M. et U. P. Kappes (2008). "Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA)." Photodermatol Photoimmunol Photomed **24**(1): 2-10.

Sakata, E., Y. Yamaguchi, E. Kurimoto, J. Kikuchi, S. Yokoyama, S. Yamada, H. Kawahara, H. Yokosawa, N. Hattori, Y. Mizuno, K. Tanaka et K. Kato (2003). "Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain." EMBO Rep **4**(3): 301-6.

Sargent, R. G., J. L. Meservy, B. D. Perkins, A. E. Kilburn, Z. Intody, G. M. Adair, R. S. Nairn et J. H. Wilson (2000). "Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells." Nucleic Acids Res **28**(19): 3771-8.

Sarker, A. H., S. E. Tsutakawa, S. Kostek, C. Ng, D. S. Shin, M. Peris, E. Campeau, J. A. Tainer, E. Nogales et P. K. Cooper (2005). "Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIF: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome." Mol Cell **20**(2): 187-98.

Sawadogo, M. (1988). "Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF." J Biol Chem **263**(24): 11994-2001.

Sawadogo, M. et R. G. Roeder (1985). "Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region." Cell **43**(1): 165-75.

Sawadogo, M., M. W. Van Dyke, P. D. Gregor et R. G. Roeder (1988). "Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei." J Biol Chem **263**(24): 11985-93.

Schauer, E., F. Trautinger, A. Kock, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J. C. Ansel, T. Schwarz et T. A. Luger (1994). "Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes." J Clin Invest **93**(5): 2258-62.

Schultz, P., S. Fribourg, A. Poterszman, V. Mallouh, D. Moras et J. M. Egly (2000). "Molecular structure of human TFIIF." Cell **102**(5): 599-607.

Schwahn, D. J., N. A. Timchenko, S. Shibahara et E. E. Medrano (2005). "Dynamic regulation of the human dopachrome tautomerase promoter by MITF, ER-alpha and

chromatin remodelers during proliferation and senescence of human melanocytes." Pigment Cell Res **18**(3): 203-13.

Scott, A. D. et R. Waters (1997). "The *Saccharomyces cerevisiae* RAD7 and RAD16 genes are required for inducible excision of endonuclease III sensitive-sites, yet are not needed for the repair of these lesions following a single UV dose." Mutat Res **383**(1): 39-48.

Scott, M. C., I. Suzuki et Z. A. Abdel-Malek (2002). "Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation." Pigment Cell Res **15**(6): 433-9.

Seemuller, E., A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber et W. Baumeister (1995). "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease." Science **268**(5210): 579-82.

Selby, C. P., R. Drapkin, D. Reinberg et A. Sancar (1997). "RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair." Nucleic Acids Res **25**(4): 787-93.

Semple, C. A. (2003). "The comparative proteomics of ubiquitination in mouse." Genome Res **13**(6B): 1389-94.

Shibutani, S., M. Takeshita et A. P. Grollman (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." Nature **349**(6308): 431-4.

Shivji, K. K., M. K. Kenny et R. D. Wood (1992). "Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair." Cell **69**(2): 367-74.

Shivji, M. K., V. N. Podust, U. Hubscher et R. D. Wood (1995). "Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA." Biochemistry **34**(15): 5011-7.

Sirito, M., Q. Lin, J. M. Deng, R. R. Behringer et M. Sawadogo (1998). "Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3758-63.

Sirito, M., S. Walker, Q. Lin, M. T. Kozlowski, W. H. Klein et M. Sawadogo (1992). "Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers." Gene Expr **2**(3): 231-40.

Smit, N. P., A. A. Vink, R. M. Kolb, M. J. Steenwinkel, P. T. van den Berg, F. van Nieuwpoort, L. Roza et S. Pavel (2001). "Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes." Photochem Photobiol **74**(3): 424-30.

Song, B. et P. Sung (2000). "Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange." J Biol Chem **275**(21): 15895-904.

Spagnolo, L., A. Rivera-Calzada, L. H. Pearl et O. Llorca (2006). "Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair." Mol Cell **22**(4): 511-9.

Stefanini, M., P. Lagomarsini, C. F. Arlett, S. Marinoni, C. Borrone, F. Crovato, G. Trevisan, G. Cordone et F. Nuzzo (1986). "Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity." Hum Genet **74**(2): 107-12.

Steingrimsson, E., H. Arnheiter, J. H. Hallsson, M. L. Lamoreux, N. G. Copeland et N. A. Jenkins (2003). "Interallelic complementation at the mouse *Mitf* locus." Genetics **163**(1): 267-76.

Sugasawa, K. (2006). "UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair." J Mol Histol **37**(5-7): 189-202.

Sugasawa, K. (2009). "Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair." Mutat Res.

Sugasawa, K., J. M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma et J. H. Hoeijmakers (1998). "Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair." Mol Cell **2**(2): 223-32.

Sugasawa, K., J. M. Ng, C. Masutani, T. Maekawa, A. Uchida, P. J. van der Spek, A. P. Eker, S. Rademakers, C. Visser, A. Aboussekhra, R. D. Wood, F. Hanaoka, D. Bootsma et J. H. Hoeijmakers (1997). "Two human homologs of Rad23 are functionally interchangeable in complex formation and stimulation of XPC repair activity." Mol Cell Biol **17**(12): 6924-31.

Sugasawa, K., T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai et F. Hanaoka (2001). "A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair." Genes Dev **15**(5): 507-21.

Sugasawa, K., Y. Okuda, M. Saijo, R. Nishi, N. Matsuda, G. Chu, T. Mori, S. Iwai, K. Tanaka et F. Hanaoka (2005). "UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex." Cell **121**(3): 387-400.

Sugawara, N., X. Wang et J. E. Haber (2003). "In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination." Mol Cell **12**(1): 209-19.

Sung, P. (1997). "Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase." Genes Dev **11**(9): 1111-21.

Svoboda, D. L., J. S. Taylor, J. E. Hearst et A. Sancar (1993). "DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes." J Biol Chem **268**(3): 1931-6.

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein et F. W. Stahl (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." Cell **33**(1): 25-35.

Takagi, Y., C. A. Masuda, W. H. Chang, H. Komori, D. Wang, T. Hunter, C. A. Joazeiro et R. D. Kornberg (2005). "Ubiquitin ligase activity of TFIIH and the transcriptional response to DNA damage." Mol Cell **18**(2): 237-43.

Tan, T. et G. Chu (2002). "p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice." Mol Cell Biol **22**(10): 3247-54.

Tanaka, K., T. Suzuki, N. Hattori et Y. Mizuno (2004). "Ubiquitin, proteasome and parkin." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 235-47.

Tang, J. et G. Chu (2002). "Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein." DNA Repair (Amst) **1**(8): 601-16.

Tassabehji, M., V. E. Newton et A. P. Read (1994). "Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene." Nat Genet **8**(3): 251-5.

Taylor, J. S., D. S. Garrett et M. P. Cohrs (1988). "Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl-(3'----5')-thymidine." Biochemistry **27**(19): 7206-15.

Thorslund, T., M. Sunesen, V. A. Bohr et T. Stevnsner (2002). "Repair of 8-oxoG is slower in endogenous nuclear genes than in mitochondrial DNA and is without strand bias." DNA Repair (Amst) **1**(4): 261-73.

Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner et C. M. Pickart (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." Embo J **19**(1): 94-102.

Tornaletti, S. et G. P. Pfeifer (1996). "UV damage and repair mechanisms in mammalian cells." Bioessays **18**(3): 221-8.

Tremeau-Bravard, A., C. Perez et J. M. Egly (2001). "A role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of transcription factor IIIH." J Biol Chem **276**(29): 27693-7.

Troelstra, C., A. van Gool, J. de Wit, W. Vermeulen, D. Bootsma et J. H. Hoeijmakers (1992). "ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes." Cell **71**(6): 939-53.

Trujillo, K. M., S. S. Yuan, E. Y. Lee et P. Sung (1998). "Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95." J Biol Chem **273**(34): 21447-50.

Tsujimura, T., E. Morii, M. Nozaki, K. Hashimoto, Y. Moriyama, K. Takebayashi, T. Kondo, Y. Kanakura et Y. Kitamura (1996). "Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice." Blood **88**(4): 1225-33.

- Van den Berg, E. A., R. H. Geerse, H. Pannekoek et P. van de Putte (1983). "In vivo transcription of the E. coli uvrB gene: both promoters are inducible by UV." Nucleic Acids Res **11**(13): 4355-63.
- van der Spek, P. J., C. E. Visser, F. Hanaoka, B. Smit, A. Hagemeyer, D. Bootsma et J. H. Hoeijmakers (1996). "Cloning, comparative mapping, and RNA expression of the mouse homologues of the Saccharomyces cerevisiae nucleotide excision repair gene RAD23." Genomics **31**(1): 20-7.
- van Hoffen, A., A. T. Natarajan, L. V. Mayne, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders et J. Venema (1993). "Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells." Nucleic Acids Res **21**(25): 5890-5.
- Van Houten, B. (1990). "Nucleotide excision repair in Escherichia coli." Microbiol Rev **54**(1): 18-51.
- Van Houten, B., D. L. Croteau, M. J. DellaVecchia, H. Wang et C. Kisker (2005). "'Close-fitting sleeves': DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system." Mutat Res **577**(1-2): 92-117.
- Van Keymeulen, A., G. Mascre, K. K. Youseff, I. Harel, C. Michaux, N. De Geest, C. Szpalski, Y. Achouri, W. Bloch, B. A. Hassan et C. Blanpain (2009). "Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis." J Cell Biol **187**(1): 91-100.
- van Vuuren, A. J., W. Vermeulen, L. Ma, G. Weeda, E. Appeldoorn, N. G. Jaspers, A. J. van der Eb, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, S. Humbert et et al. (1994). "Correction of xeroderma pigmentosum repair defect by basal transcription factor BTF2 (TFIIH)." Embo J **13**(7): 1645-53.
- Verhage, R. A., A. M. Zeeman, M. Lombaerts, P. van de Putte et J. Brouwer (1996). "Analysis of gene- and strand-specific repair in the moderately UV-sensitive Saccharomyces cerevisiae rad23 mutant." Mutat Res **362**(2): 155-65.
- Verma, R., R. Oania, J. Graumann et R. J. Deshaies (2004). "Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system." Cell **118**(1): 99-110.
- Vogelstein, B., D. Lane et A. J. Levine (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.
- Volker, M., M. J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. van Driel, A. A. van Zeeland et L. H. Mullenders (2001). "Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo." Mol Cell **8**(1): 213-24.
- Vousden, K. H. et X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.

Vu, P. K. et K. M. Sakamoto (2000). "Ubiquitin-mediated proteolysis and human disease." Mol Genet Metab **71**(1-2): 261-6.

Wakasugi, M., J. T. Reardon et A. Sancar (1997). "The non-catalytic function of XPG protein during dual incision in human nucleotide excision repair." J Biol Chem **272**(25): 16030-4.

Wang, H., P. D. Hoffman, C. Lawrence et J. B. Hays (2006). "Testing excision models for responses of mismatch-repair systems to UV photoproducts in DNA." Environ Mol Mutagen **47**(4): 296-306.

Watkins, J. F., P. Sung, L. Prakash et S. Prakash (1993). "The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function." Mol Cell Biol **13**(12): 7757-65.

Weeda, G., E. Eveno, I. Donker, W. Vermeulen, O. Chevallier-Lagente, A. Taieb, A. Stary, J. H. Hoeijmakers, M. Mezzina et A. Sarasin (1997). "A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy." Am J Hum Genet **60**(2): 320-9.

Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 169-78.

Welchman, R. L., C. Gordon et R. J. Mayer (2005). "Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(8): 599-609.

Widlund, H. R. et D. E. Fisher (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." Oncogene **22**(20): 3035-41.

Wierzbicki, A. S., C. A. Graham, I. S. Young et D. P. Nicholls (2008). "Familial combined hyperlipidaemia: under - defined and under - diagnosed?" Curr Vasc Pharmacol **6**(1): 13-22.

Wilkinson, C. R., M. Seeger, R. Hartmann-Petersen, M. Stone, M. Wallace, C. Semple et C. Gordon (2001). "Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains." Nat Cell Biol **3**(10): 939-43.

Wing, S. S. (2003). "Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 590-605.

Winkler, G. S., K. Sugasawa, A. P. Eker, W. L. de Laat et J. H. Hoeijmakers (2001). "Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF." Biochemistry **40**(1): 160-5.

Winkler, G. S., W. Vermeulen, F. Coin, J. M. Egly, J. H. Hoeijmakers et G. Weeda (1998). "Affinity purification of human DNA repair/transcription factor TFIIH using epitope-tagged xeroderma pigmentosum B protein." J Biol Chem **273**(2): 1092-8.

Wintzen, M. et B. A. Gilchrist (1996). "Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin." J Invest Dermatol **106**(1): 3-10.

Wojcik, C. et G. N. DeMartino (2003). "Intracellular localization of proteasomes." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 579-89.

Wu, L., C. Z. Bachrati, J. Ou, C. Xu, J. Yin, M. Chang, W. Wang, L. Li, G. W. Brown et I. D. Hickson (2006). "BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4068-73.

Wu, X., J. H. Bayle, D. Olson et A. J. Levine (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." Genes Dev **7**(7A): 1126-32.

Wyman, C., D. Ristic et R. Kanaar (2004). "Homologous recombination-mediated double-strand break repair." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 827-33.

Yang, Y., C. C. Li et A. M. Weissman (2004). "Regulating the p53 system through ubiquitination." Oncogene **23**(11): 2096-106.

Yao, T. et R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." Nature **419**(6905): 403-7.

Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Shibata, Y. Tomita et S. Shibahara (1994). "Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene." Mol Cell Biol **14**(12): 8058-70.

Yasumoto, K., K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita et S. Shibahara (1997). "Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes." J Biol Chem **272**(1): 503-9.

Yohn, J. J., J. G. Morelli, S. J. Walchak, K. B. Rundell, D. A. Norris et M. R. Zamora (1993). "Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1." J Invest Dermatol **100**(1): 23-6.

You, Y. H., D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui et G. P. Pfeifer (2001). "Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells." J Biol Chem **276**(48): 44688-94.

Yu, Z., J. Chen, B. N. Ford, M. E. Brackley et B. W. Glickman (1999). "Human DNA repair systems: an overview." Environ Mol Mutagen **33**(1): 3-20.

Résumé : La peau est la première barrière de protection de l'organisme face aux agressions de l'environnement incluant notamment les radiations UV solaires, responsables de nombreux dommages sur l'ADN. Afin de prévenir l'apparition de lésions et de maintenir l'intégrité du génome, la cellule a mis en place des systèmes de protection avec la réponse pigmentaire, et de réparation avec le mécanisme du NER (nucleotide excision repair). Le NER est un mécanisme complexe et versatile, conservé au cours de l'évolution, qui repose sur l'action coordonnée d'acteurs protéiques dont les mutations conduisent à l'apparition de syndromes d'hyper-sensibilité aux UV. Ainsi, parallèlement à la régulation transcriptionnelle UV induite dépendante du facteur USF-1 (Upstream Stimulating Factor 1) des gènes clés de la pigmentation, nous avons étudié l'induction transcriptionnelle potentielle de gènes codant pour les acteurs du NER. Par une approche combinant expériences *in-vivo* (RT-QPCR et CHIP) et *in-vitro* (EMSA, luciférase essais), nous impliquons le facteur USF-1 dans l'induction transcriptionnelle de gènes codant deux acteurs des étapes de reconnaissance des lésions UV-induites par le NER. L'utilisation de souris invalidées pour le gène USF-1 confirme le modèle observé. L'ensemble de ces données obtenues au cours de ma thèse vient compléter la liste des gènes cibles du facteur de transcription USF-1 et élargit son réseau d'implication en réponse aux UV. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel du facteur USF-1 dans le processus tumoral des cancers cutanés UV-induits.

Mots clés: Réparation par excision de nucléotide, Régulation transcriptionnelle, UV, USF-1

Abstract: Skin is the first body barrier exposed to various environmental hazardous including solar UV irradiations which can alter DNA structure. To protect and maintain the integrity of the genome, cells are equipped with the UV-inducible skin pigmentation pathway and specific defense machinery including Nucleotide Excision Repair (NER). NER is one of the most complex and versatile DNA repair system, highly conserved during evolution, which requires several actors whose mutations lead to extreme cutaneous photosensitivity. In parallel of the UV-inducible and USF-1 (Upstream Stimulating Factor 1) dependant transcriptional regulation of actors of the pigmentation pathway, we have investigated transcriptional induction of genes encoding NER actors. Using an approach of combined *in-vivo* (RT-QPCR and CHIP) and *in-vitro* (EMSA, luciferase assay) experiments, we show that USF-1 is directly implicated in transcriptional induction of UV induced DNA damages recognition step of NER. This model is confirmed by using USF-1 KO mice. Data obtained during my PhD complete the listing of USF-1 target genes and expand implicated pathways. These results suggest a potential role of this transcription factor in skin cancer processes.

Key words: Nucleotide Excision Repair, Transcriptional Regulation, UV, USF-1