



HAL
open science

Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support miniaturisé: mise au point et applications

Jean-François Millau

► To cite this version:

Jean-François Millau. Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support miniaturisé: mise au point et applications. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00126858

HAL Id: tel-00126858

<https://theses.hal.science/tel-00126858>

Submitted on 26 Jan 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée par

Jean-François MILLAU

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1

Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

Discipline : Biotechnologie

**Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de
réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support
miniaturisé : mise au point et applications**

Directeur de thèse : Sylvie Sauvaigo

Date de soutenance : 15 Novembre 2006

Jury :

M. Jaime ANGULO	Directeur de recherche CEA, Fontenay-aux-Roses (Rapporteur)
M. Charles DUMONTET	Professeur à l'Université Claude Bernard, Lyon (Rapporteur)
M. Christian BRAMBILLA	Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble (Examinateur)
M. Alain FAVIER	Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble (Examinateur)
M. Thierry ODDOS	Directeur de recherche Johnson & Johnson, Val de Reuil (Invité)
Mme Sylvie SAUVAIGO	Directeur de recherche CEA, Grenoble (Directeur de thèse)

Thèse préparée au sein du laboratoire Lésions des Acides Nucléiques

SCIB/DRFMC/Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble

« La théorie, c'est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne. La pratique c'est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pas pourquoi. En science on allie la théorie à la pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi. »

Albert Einstein

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le professeur Christian Brambilla, le professeur Charles Dumontet, Jaime Angulo, et Thierry Oddos pour avoir accepté d'être membres de mon jury et d'avoir évalué mon travail de thèse.

Je suis très reconnaissant envers Sylvie Sauvaigo pour m'avoir encadré et permis de réaliser mon stage de DEA ainsi que ma thèse au LAN, et je la remercie pour avoir su être toujours disponible. Je remercie également le professeur Alain Favier pour avoir toujours été présent aux différents tournants de mon cursus universitaire, du magistère au DEA en passant par la thèse. Je remercie Thierry Douki pour avoir réalisé les dosages CLHP-SM/SM des lésions, et pour ses corrections avisées de mon manuscrit de thèse ainsi que pour son aide quant à l'utilisation de Word sur un document dépassant cent pages. Je suis également reconnaissant envers Jean-Luc Ravanat pour son aide précieuse concernant le dosage des lésions, mais aussi pour avoir été de très bon conseil lors de la préparation de mon oral de thèse. Je le remercie aussi pour avoir su dompter les bugs informatiques les plus récalcitrants. Je remercie Jean Breton (le Mangeur Masqué) pour tous ses conseils et contributions qui m'ont beaucoup aidé pour réaliser la partie de ce manuscrit se rapportant à la cancérologie. Je le remercie aussi pour avoir été mon premier auditeur lors de la préparation de mon oral de thèse. Je remercie Jean Cadet pour ses conseils et les discussions toujours enrichissantes que nous avons eues. Je suis reconnaissant envers la société Johnson & Johnson et notamment Thierry Oddos qui, les premiers, ont cru en ce projet et nous ont permis d'avoir les fonds nécessaires à son bon développement.

Je remercie Sylvie Chevillard et Marie-Françoise Olivier du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale du CEA Fontenay-aux-Roses pour avoir accepté de collaborer avec nous et nous avoir permis de réaliser les expériences d'adaptation cellulaire au rayonnement gamma. Je remercie Nicolas Ugolin et Guillaume Arras également du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale pour le fantastique travail qu'ils ont accompli concernant la normalisation des données ainsi que pour la mise au point du logiciel NormelizeIt.

Je remercie Béatrice Schaak et Julien Reboud du Laboratoire des Biopuces du CEA Grenoble pour nous avoir permis de réaliser les dépôts de nos premières biopuces à l'aide de leur robot de dispense.

Je remercie Didier Grunwald du Département de Réponse et Dynamique Cellulaires du CEA Grenoble pour nous avoir permis de réaliser l'étude au microscope confocal de notre support.

Je tenais à dire un grand merci à Sylvain Caillat sans qui tout ce travail n'aurait pu être accompli, je tiens également à le remercier pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble durant ces quatre années. Je remercie Caroline Marie pour nos longues conversations « philosophiques » cela a été un vrai plaisir de partager le bureau en sa compagnie. Je remercie également Peggy Regulus pour sa bonne humeur, pour m'avoir initié aux notions de mode et coordination, mais aussi pour notre soutien mutuel de doctorants. Un merci à Olivier Falletti pour les discussions concernant des sujets scientifiques mais aussi musicaux, ce fut un plaisir de jouer quelques morceaux avec lui. Je tiens aussi à remercier Zorha Termache pour son professionnalisme hors pair qui permet de naviguer dans les méandres administratifs auxquels est enclin le CEA.

Un grand merci également à tous les autres membres du laboratoire avec qui ce fut un réel plaisir de travailler : Stéphane, Anne-Laure, Francette, Christine, Didier, Sandra, Alexia, Karine, Sandrine, Jocelyne...

Pour finir je tiens à remercier mes parents pour leur soutien indéfectible tout au long de mon cursus universitaire ; et je tiens à dire grand merci à Delphine qui m'a supporté au sens propre comme au sens figuré et qui a permis à ce manuscrit de ne pas être entaché par un grand nombre de malencontreuses fautes d'orthographe.

Etude bibliographique 1

I)	Les systèmes de réparation	4
A)	La réparation par excision de nucléotides (REN)	6
1)	Découverte et historique	6
2)	Le fonctionnement mécanistique de la réparation par excision de nucléotides	7
3)	Voie de signalisation et régulation de la REN	12
B)	La réparation par excision de base (REB)	16
1)	Découverte et historique	16
2)	Le mécanisme de la réparation par excision de base	17
3)	La réparation par excision de base couplée à la transcription	21
4)	La régulation de la réparation par excision de base	22
C)	Les autres systèmes de réparation	24
1)	Les systèmes de réparation des cassures de l'ADN	24
2)	Les polymérases translésionelles	26
3)	La réparation des mésappariements et des insertions / délétions	27
4)	Les alkyltransférases	28
D)	Complémentarités et interactions des systèmes de réparation	30
E)	Régulation par translocation nucléaire des protéines de réparation	31
F)	Dommages de l'ADN et cycle cellulaire	32
II)	Les maladies impliquant les systèmes de réparation	34
A)	Implication des systèmes de réparation dans le processus de carcinogenèse et de résistance aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie	34
1)	Implication de la réparation de l'ADN dans le processus de carcinogenèse	34
2)	Implication de la réparation de l'ADN dans le phénomène de résistance au traitement par chimiothérapie et radiothérapie	37
3)	Effets secondaire liés aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie	43
4)	Conclusion	44
B)	Les maladies génétiques liées à des gènes impliqués dans la réparation	45
1)	Xeroderma pigmentosum	45
2)	Le syndrome de Cockayne	48
3)	Trichothiodystrophie (TTD)	51
4)	Le cancer du colon héréditaire non-polyposique (CCHNP)	52
5)	Réparation de l'ADN et polymorphisme génétique	53
C)	Conclusion sur les maladies liées à la réparation de l'ADN	57
III)	Les outils permettant d'étudier la réparation de l'ADN	58
A)	Etude de la réparation : mesure des activités enzymatiques	58
1)	Méthodes indirectes basées sur la mesure des lésions	58
2)	Les méthodes de mesure directe des activités enzymatiques de réparation	64
3)	Conclusion	70
B)	Mesure de la réparation : les biopuces	70
1)	L'étude du transcriptome au moyen de biopuces	70
2)	Les puces à anticorps	73
C)	Conclusion sur les outils permettant d'étudier la réparation	76

Objectifs de la thèse 77

Partie expérimentale 81

Chapitre I : Mise au point de la fabrication de la biopuce 85

I)	Les différentes lésions présentes sur la biopuce	88
A)	L'ADN portant les lésions	88
B)	Préparation des plasmides portant les lésions	88
1)	La qualité des plasmides	88
2)	La qualité des lésions	89
3)	Choix du nombre de lésions par plasmide	89
C)	Les différents plasmides présents sur la biopuce	90
1)	Plasmide contrôle	90
2)	Plasmide portant les dimères de cyclobutane de pyrimidine et les photoproduits(6-4)	90
3)	Les plasmides portant des produits d'oxydation de bases	92
4)	Plasmide portant des bases alkylées	94
5)	Les plasmides portant des pontages	96
6)	Plasmide portant des sites abasiques	97
D)	Organisation des dépôts sur la biopuce	98
II)	Réalisation des dépôts à l'aide du robot de dispense	100
A)	Le robot de dispense ScieFlexarrayer	100
1)	Présentation du robot et caractéristiques techniques	100
2)	Fonctionnement du robot	100
3)	La technologie de dispense piézoélectrique	102
B)	Mise au point des paramètres de dépôt	103
1)	Le lavage de la buse de dispense	103
2)	Choix du nombre de gouttes par dépôt	105
3)	Choix du volume de prélèvement	107
4)	Conditionnement de la buse de dispense et reproductibilité	109
III)	Le support utilisé pour réaliser la biopuce	109
A)	Lames de Poly-L-Lysine ou lames Hydrogel	110
1)	Morphologie des dépôts	110
2)	Signal de réparation obtenu	111
3)	Conservation des plasmides sur le support	113
4)	Conclusion	116
B)	Analyse par microscopie confocale du support	116
1)	Présentation de la microscopie confocale	117
2)	Localisation des plasmides et de la réparation dans l'Hydrogel	118
3)	Conclusion	120
C)	Fabrication de lames hydrogel	121
1)	Problèmes rencontrés avec les lames Perkin Elmer	121
2)	Mise au point de lames hydrogel	121
IV)	Conclusion	125

Chapitre II : Mise au point de la quantification de la fluorescence, de la normalisation des données et de l'analyse des résultats	127
I) Quantification de la fluorescence	130
A) Lecture des biopuces et reconnaissance des dépôts	130
B) Choix de la méthode de mesure de la fluorescence des dépôts	132
II) Normalisation des données	135
III) Analyse des résultats	138
IV) Conclusion	140
Chapitre III : Mise au point des conditions de réaction du test et de la préparation des extraits cellulaires	141
I) Mise au point des conditions de réaction du test	144
A) La composition de la solution de réparation	144
1) Effets de la concentration en $MgCl_2$	144
2) Effet de la concentration en Dithiothreitol (DTT)	147
3) Effet de la concentration en HEPES	147
4) Effet de la concentration en EDTA	148
5) Effet de la concentration en ATP	148
B) Effet de la concentration en extrait	151
C) Cinétique de réparation	152
D) Conclusion	153
II) Préparation des extraits cellulaires	153
A) Précautions quant à la préparation des extraits cellulaires	154
B) Extraits cellulaires totaux	154
1) Le principe de la préparation des extraits totaux	154
2) Résultats obtenus avec les extraits totaux	156
C) Extraits cellulaires nucléaires	158
1) Le principe de la préparation des extraits nucléaires	158
2) Résultats obtenus avec les extraits nucléaires	159
3) Optimisation de la préparation des extraits	162
III) Conclusion	165
Chapitre IV : Validation du test	167
I) Validation biochimique	169
A) Mise en évidence des activités de la REB et de la REN	169
1) Effet de la concentration en ATP	169
2) Inhibition des polymérases epsilon et delta (ϵ/δ)	173
3) Conclusion	175
B) Inhibition par compétition	175
C) Inhibition des réactions enzymatiques à l'aide d'anticorps	177

II)	Validation biologique du test _____	177
III)	Conclusion _____	179
Chapitre V : Expériences applicatives _____		181
I)	Etude des profils de réparation de différents types cellulaires _____	183
A)	Fonction et localisation des cellules étudiées _____	184
1)	Les cellules de la peau : fibroblastes et kératinocytes _____	184
2)	Les cellules mononuclées du sang périphérique _____	185
B)	Comparaison de profils de réparation cellulaire _____	185
1)	Comparaison des profils de réparation de trois cultures primaires de fibroblastes _____	185
2)	Comparaison des activités de réparation de fibroblastes et de kératinocytes _____	187
3)	Activités de réparation des cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP) _____	189
C)	Conclusion _____	191
II)	Etude de l'effet de doses adaptatives de rayonnement gamma sur les activités de réparation cellulaires _____	191
A)	Le rayonnement gamma et l'adaptation cellulaire _____	191
1)	Le rayonnement gamma (γ) _____	191
2)	Effet du rayonnement gamma sur l'ADN _____	192
3)	L'adaptation cellulaire _____	193
B)	Expérience d'adaptation cellulaire _____	195
4)	Conclusion _____	200
III)	Conclusion _____	201
Conclusion et perspectives _____		203
Matériels et méthodes _____		211
I)	Préparation des plasmides _____	213
A)	Amplification et purification du plasmide contrôle pBluescript _____	213
B)	Préparation des différents plasmides comportant les lésions _____	213
1)	Le plasmide pCPD-64 _____	213
2)	Le plasmide pCPD-64* _____	213
3)	Le plasmids p8oxo _____	214
4)	Le plasmide p8oxo* _____	214
5)	Le plasmide pAlkB _____	214
6)	Le plasmide pCisP _____	214
7)	Le plasmide pPso _____	215
8)	Le plasmide pAbaS _____	215
9)	Le plasmide pThymG _____	215
C)	Purification des plasmides traités _____	216

II)	Quantification des lésions _____	216
A)	Digestion des plasmides _____	216
B)	Dosage des lésions _____	217
1)	Par CLHP-SM/SM _____	217
2)	Dosage CLHP couplé à un détecteur électrochimique _____	218
3)	Dosage des sites abasiques par électrophorèse sur gel d'agarose _____	218
4)	Résultats de la quantification des lésions des différents plasmides _____	218
III)	Réalisation des dépôts de plasmides _____	219
A)	Dispense des solutions de plasmides _____	219
B)	Support utilisés _____	219
1)	Supports commerciaux _____	219
2)	Lame hydrogel mise au point au laboratoire _____	220
IV)	Etude en microscopie confocale du support _____	221
A)	Marquage de plasmides par « nick-translation » (pCy3) _____	221
B)	Réalisation des dépôts _____	221
C)	Réaction de réparation _____	222
D)	Observation au microscope confocal _____	222
V)	Culture cellulaire _____	222
A)	Obtention des cellules _____	222
1)	Fibroblastes et kératinocytes _____	222
2)	CMSP _____	222
B)	Culture des cellules _____	223
1)	Cellules HeLa _____	223
2)	Fibroblastes _____	223
3)	Kératinocytes _____	223
C)	Conservation des cellules _____	223
VI)	Extraits cellulaires _____	224
A)	Extraits totaux _____	224
B)	Extraits nucléaires _____	224
VII)	Test de réparation par excision resynthèse _____	225
VIII)	Lecture biopuces, normalisation et analyse des données _____	226
A)	Lecture des biopuces _____	226
B)	Normalisation des données _____	226
C)	Analyse des données _____	227

Références Bibliographiques _____ **229**

Annexes _____ **251**

Abréviations :

5-OHdC	: 5-hydroxyl-2'-désoxycytosine
5-FordU	: 5-formyl-2'- désoxyuridine
5-HmdU	: 5-(hydroxyméthyle)-2'-désoxyuridine
8-oxoG	: 8-oxo-7,8-dihydro-guanine
ABH1/2/3	: AlkB Homolog 1/2/3
ADN	: Acide DéoxyriboNucléique
ADNc	: ADN codant
ADNnc	: ADN non codant
ANPG	: 3-methyladenine-DNA glycosylase
AP	: APurinique ou Apyrimidinique
APEX1/2	: APurinic/APyrimidinic Endonuclease 1
ARN	: Acide RiboNucléique
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	: Adenosine TriPhosphate
ATR	: Ataxia Telangiectasia and RAD3 related
ATR-IP	: ATR-Interacting Protein
BCNU	: 1,3-bis(2-Chloroethyl)3-Cyclohexyl-1-NitrosUrea
BRCA1/2	: BReast Cancer 1
CCNU	: 1-(2-Chloroethyl)3-Cyclohexyl-1-NitrosUrea
CDDP	: Cis Dichloro Diammine Platinum
CLHP	: Chromatographie Liquide haute Performance
CLHP-SM/SM	: Chromatographie Liquide haute Performance couplée à la Spectrométrie de masse en mode tandem
CMSP	: Cellules Mononuclées du Sang Périphérique
CPD-64	: dommages Dimères Cyclobutane de Pyrimidine et des PhotoProduits(6-4)
CS	: Cockayne Syndrom
CSA/B	: Cockayne Syndrom A/B protein
Cy5/3	: Cyanine 5/3
DCP	: Dimères Cyclobutane de Pyrimidine
DDB1/2	: DNA Damage Binding protein 1/2
DDE	: trans,trans-2,4-DecaDiEnal
DMSO	: DiMéthylSulfOxyde
DNA-PK	: DNA-dependent Protein Kinase
dRp	: 5' desoxyRibose-Phosphate
DTT	: DiThio-1,4-Threitol
<i>E. coli</i>	: Escherichia coli
EDTA	: EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ERCC1	: Excision Repair Cross-Complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
ERO	: Espèces Réactives de l'Oxygène
Fapy Adénosine	: 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
Fapy Guanine	: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

Abréviations

FEN1	: Flap endonuclease 1
Gy	: Gray
HAP	: Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HeLa	: Henrietta Lacks
HEPES	: N-(2-HydroxyEthyl)Piperazine-N'-(2-EthaneSulfonic acid)
HhH	: Helix-Hairpin-Helix
hHR23B	: Human Homolog Rad23 B
hMLH1/2	: human MLH 1/2
HNE	: 4-Hydroxynonenal
hPMS2	: human PMS2
hTERT	: human TElomerase Reverse Transcriptase
MBD4	: Methyl-CpG Binding Domain protein 4
MPG	: 3-methyladenine-DNA glycosylase
MYH	: MutY Homolog DNA glycosylase
NEIL1/2/3	: Nei endonuclease VIII-Like 1/2/3
NF-KB	: Nuclear Factor kB
NTHL1	: NTH endonuclease III-Like 1
O6-MGMT	: O6 - MethylGuanine - DNA MethylTransferase
OGG1	: 8-oxoG DNA Glycosylase
p8oxo	: Plasmide portant des 8-oxoG
pAbaS	: Plasmide portant des sites abasiques
pAlkB	: Plasmide portant des Bases Alkylées
PARP	: Poly(ADP-Ribose) Polymérase
PBS	: Phosphat-Buffered Saline
pCis	: Plasmide portant des adduits Cisplatine
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen
pControl	: Plasmide Contrôle
pCPD-64	: Plasmide portant des Dimères Cyclobutane de Pyrimidine et des PhotoProduits(6-4)
PCR	: Polymérase Chain Reaction
PCR-ML	: PCR médiée par ligation
PIKK	: Phosphoinositide-3-Kinase-Related protein Kinase
PKC	: Protein Kinase C
pp(6-4)	: PhotoProduits(6-4)
pPso	: Plasmide portant des adduits Psoralène
pThymG	: Plasmide portant des Thymines et des Cytosine oxydées
RCT	: Réparation Couplée à la Transcription
REB	: Réparation par Excision de Base
REN	: Réparation par Excision de Nucléotide
RFC	: Reduced Folate Carrier
RGG	: Réparation Globale du Génome
RH	: Recombinaison Homologue
RMA	: Réparation des MésAppariements
RNH	: Recombinaison Non Homologue

Abréviations

RPA	: Replication Protein A
RPL	: Réactivation de Plasmide lésé
SANP	: Synthèse d'ADN Non Programée
SMUG1	: Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase 1
SVF	: Sérum de Veau Foetal
TDG	: Thymine DNA Glycosylase
TFIIH	: Transcription Factor IIIH
TTD	: TrichoThioDystrophie
UNG	: Uracil N-Glycosylase
UV	: Ultra-Violet
XAB2	: XPA Binding protein 2
XP	: <i>Xeroderma pigmentosum</i>
XPA/B/C/D/E/F/G/V	: Xeroderma Pigmentosum group A/B/C/D/E/F/G/V
XRCC1/4	: X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells 1

Etude bibliographique

Introduction :

Qu'est ce que le vivant ? Une définition simple pourrait être : toute entité biologique présentant la capacité de se reproduire. Cette définition très large permet d'englober les procaryotes mais aussi les plus complexes des organismes eucaryotes pluricellulaires. Tous deux, pour se reproduire, ont le même besoin de transmettre de l'information à leur descendance. La nature, à travers l'évolution, a notamment trouvé comme solution à ce problème l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette molécule en double hélice, composée de quatre bases A,T,G et C, est le support de l'information génétique. Son rôle est essentiel car elle contient tout le programme nécessaire au déroulement de la vie cellulaire.

Mais l'ADN est constamment endommagé par des agents endogènes (par exemple les espèces réactives de l'oxygène) et exogènes (le rayonnement ultraviolet, les polluants), qui modifient sa structure chimique et par conséquent l'information qu'il contient. Au cours de l'évolution, des systèmes de réparation ont fait leur apparition, permettant aux êtres vivants de maintenir en partie l'intégrité de leur génome. Il faut cependant souligner le fait que la réparation de l'ADN est imparfaite. Cela a permis aux êtres vivants d'évoluer en permettant un certain degré de liberté dans les séquences d'ADN génomiques.

Nous allons aborder dans cette étude bibliographique la description des différents systèmes de réparation présents dans les cellules humaines. Nous aborderons la complexité de ces mécanismes, notamment le fait que certains d'entre eux se recouvrent mais aussi se complètent. Nous parlerons ensuite des maladies génétiques et acquises qui découlent de défauts de la réparation de l'ADN. Enfin seront présentés les outils utilisés pour étudier la réparation de l'ADN.

I) Les systèmes de réparation

Au sein de la cellule, l'ADN peut être endommagé et subir des modifications chimiques. Ces modifications peuvent avoir des origines diverses que l'on peut cependant classer en trois groupes.

- Les modifications de l'ADN créées par des facteurs exogènes :

On trouve dans cette catégorie les rayonnements ionisants qui provoquent principalement des cassures double et simple brin de l'hélice d'ADN, mais aussi les rayonnements UV qui conduisent à la formation de dimères cyclobutane de pyrimidine (DCP) et de la 8-oxoguanine (8-oxoG) par l'action des UVA, et à la formation de DCP et de photoproduits(6-4) (pp(6-4)) par l'action des UVB². Des produits chimiques, dont certains ont été utilisés dans le traitement de cancers, peuvent également être la source de modifications de la structure de l'ADN : les agents alkylants (diméthyle sulfate), les agents pontants (cisplatine, psoralène), et les radiomimétiques (bléomycine) pour ne citer qu'eux³. Enfin des polluants tels que le Benzo[a]pyrène (fumée de diesel, incinérateurs)⁴, les nitrosamines (fumée de cigarette)⁵, peuvent aussi causer des modifications chimiques des bases.

- Les modifications de l'ADN créées par des facteurs endogènes :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) font partie des principales sources endogènes de modification de l'ADN. Elles sont en grande partie générées par le métabolisme aérobie qui a lieu dans les mitochondries. Ces espèces sont nombreuses et comprennent entre autres le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène. Leur caractère électrophile les rend très réactives et elles peuvent notamment oxyder les bases de l'ADN. Ces oxydations conduisent à un nombre très important de bases modifiées, les plus étudiées étant la 8-oxoG, et les diols de thymine⁶.

La seconde source endogène de modification de l'ADN est la peroxydation lipidique. Cette réaction d'oxydation des lipides présents dans les membranes de la cellule conduit à la formation de produits de dégradation aldéhydiques (4-HNE,

trans,trans-2,4-Decadienal (DDE)) qui réagissent préférentiellement avec la guanine et forment des dérivés de type EthenoGuanine⁷.

- L'altération spontanée de base :

Elle est due aux propriétés intrinsèques de la molécule d'ADN qui présente la particularité de se dépuriner de manière spontanée, conduisant ainsi à la formation de sites abasiques. A ce phénomène s'ajoute le fait que la cytosine possède la caractéristique de se désaminer spontanément, conduisant à la formation d'uracile¹. Toutefois, certaines cellules comme les lymphocytes possèdent des désaminases (adénosine désaminase, cytosine désaminase) qui jouent un rôle important dans les réarrangements des gènes des immunoglobulines

La cellule a donc à faire face à une grande diversité de dommages de l'ADN : modifications de bases, pontages de bases, pontages de brins, cassures de chaînes, perte de base dont nous avons regroupé, en fonction de leur taille, les principaux représentants dans la **Figure 1**. Nous allons, dans la partie qui suit, présenter les mécanismes que possèdent les cellules eucaryotes humaines afin de réparer les lésions de l'ADN ; nous verrons que le type et la taille du dommage joue un rôle important dans ce processus.

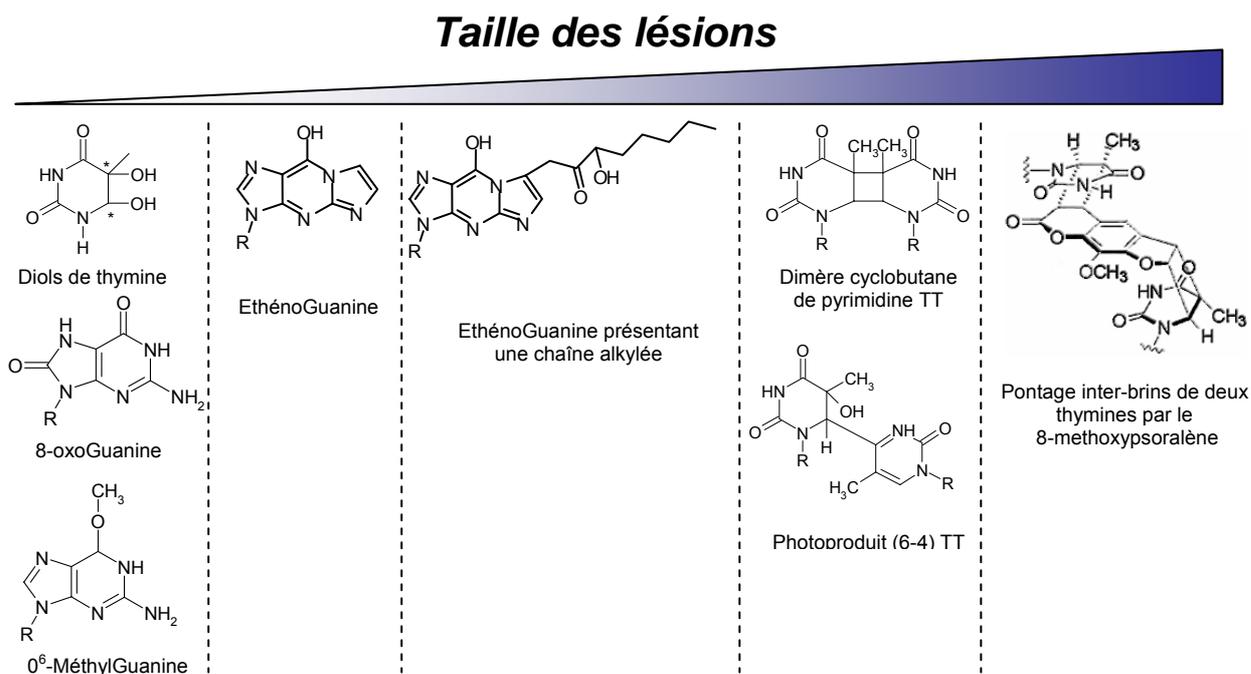


Figure 1 : Figure présentant quelques lésions de l'ADN classées en fonction de leur taille.

A) La réparation par excision de nucléotides (REN)

1) Découverte et historique

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation versatile qui est très largement répandu dans le monde vivant. En effet, il est aussi bien présent dans les mycoplasmes que dans les cellules eucaryotes, ce qui indique qu'il a été très conservé au cours de l'évolution. Les premières publications scientifiques décrivant ce système de réparation remontent à l'année 1964, au cours de laquelle trois articles mirent en évidence ce mécanisme à la fois chez les mammifères⁸ mais aussi chez les bactéries^{9, 10}.

Quatre ans plus tard, la découverte de l'implication de la REN dans la prévention du processus de carcinogenèse fut possible grâce aux travaux de J.E. Cleaver menés sur les cellules de patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* (XP), une maladie génétique provoquant l'apparition précoce de cancers cutanés. Il fut notamment démontré que les cellules de patients XP étaient déficientes en réparation par excision de nucléotides¹¹. Les recherches sur la REN progressèrent alors formidablement grâce aux puissants outils que sont les cellules XP. Elles permirent d'identifier les gènes responsables du *Xeroderma pigmentosum*, et de remonter jusqu'aux protéines impliquées dans la réparation par excision de nucléotides. Les protéines ainsi découvertes portent le nom de XP suivi d'une lettre de l'alphabet correspondant au groupe de complémentation auquel elles appartiennent.

Il restait alors à déterminer le mécanisme biochimique de la REN, la fonction des protéines impliquées et la manière dont elles s'assemblent. En 1986, I. Mellon et P.C. Hanawalt¹² démontrèrent que la REN peut être divisée en deux voies : la réparation couplée à la transcription (RCT) et la réparation globale du génome (GGR). Il faudra attendre les travaux de R. Wood pour voir apparaître en 1988 le premier test *in-vitro* permettant de mesurer la réparation par excision de nucléotides¹³, puis, en 1995, la première reconstitution *in-vitro* de ce mécanisme avec des protéines purifiées¹⁴.

Toutes ces avancées ainsi que les plus récentes ont permis de mieux appréhender les bases génétiques et biochimiques de la réparation par excision de nucléotides.

2) Le fonctionnement mécanistique de la réparation par excision de nucléotides

La REN est un mécanisme que l'on peut décomposer simplement en cinq étapes : la reconnaissance du dommage, l'incision du brin d'ADN contenant le dommage, son excision, la re-synthèse du brin excisé, et enfin la ligation du brin néoformé.

a) La reconnaissance de la lésion

- Les types de dommages reconnus par la REN :

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation très versatile car elle permet d'éliminer une grande variété de dommages tels que :

- Les lésions induites par les ultraviolets (UV) : les dimères cyclobutane de pyrimidine, les pp(6-4).
- Les pontages intra-brin
- Les gros adduits de l'ADN comme par exemple ceux des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)¹⁵.

Cette versatilité réside dans le mode de reconnaissance du dommage, qui est basé sur la déformation de la structure de l'ADN générée par la lésion, et non sur la modification chimique de la base elle-même. Mécanismes de reconnaissance des lésions

La REN est divisée en deux voies, la réparation couplée à la transcription et la réparation globale du génome. Ces deux voies ne diffèrent que par les processus de reconnaissance du dommage que nous allons présenter ici.

- La reconnaissance de dommages lors de la réparation couplée à la transcription (RCT) :

La réparation couplée à la transcription est un système puissant car il permet à la cellule de réparer en priorité les gènes qui sont transcrits et donc importants pour la vie cellulaire. Lors de la RCT, c'est le blocage de l'ARN polymérase au niveau du site

lésé qui permet de recruter alors le complexe d'incision de la REN. Trois protéines semblent impliquées dans cette étape, ce sont : les protéines CSA et CSB, déficientes chez les patients atteints du syndrome de Cockayne, ainsi que la protéine XAB2¹⁶. Ces protéines permettent au complexe d'incision de la REN de venir se positionner au niveau du site lésé, notamment en permettant le retrait de l'ARN polymérase. Cependant le mécanisme d'action précis de ce processus n'a pas encore été clairement élucidé¹⁷.

- La reconnaissance des dommages lors de la réparation globale du génome (RGG) :

La réparation globale du génome, contrairement à la RCT, ne répare pas l'ADN en fonction de son niveau de transcription. Elle répare aussi bien les zones non codantes que codantes, ainsi que les brins transcrits et non transcrits. La RGG est donc très importante pour les cellules qui se divisent et se différencient, car elles ont besoin de transmettre à leur descendance un génome exempt de toute erreur.

Lors de la RGG, plusieurs protéines sont impliquées dans la reconnaissance des dommages. Tout d'abord, le complexe protéique XPC / hHR23B, qui est l'élément essentiel de ce processus. Il a la capacité de fixer sur l'ADN, avec une affinité d'autant plus importante si des dommages comme les dimères de pyrimidine, les photoproduits(6-4), ou bien des adduits cisplatine (CDDP) sont présents. Cependant, ce complexe ne se limite pas à la reconnaissance du dommage dans le sens où il est aussi nécessaire au recrutement des protéines permettant de réaliser les étapes suivantes de la REN.

Il a aussi été montré que l'étape de reconnaissance peut passer par le complexe DDB1 / DDB2 (XPE) qui a une affinité très forte pour les dimères de pyrimidine. Néanmoins, si XPC / hHR23B n'est pas présent, le complexe DDB1 / DDB2 à lui seul ne permet pas à la REN d'avoir lieu. Deux hypothèses s'opposent quant au mécanisme impliqué. La première suggère que DDB1 / DDB2 fixe le dommage puis recrute alors directement le complexe XPC / hHR23B¹⁸. La seconde, quant à elle, confère à DDB1 / DDB2 un rôle dans le remaniement de la chromatine permettant ainsi à XPC / hHR23B d'avoir accès au site lésé¹⁹.

Pour finir, la protéine XPA a longtemps été considérée comme la protéine présente dans les toutes premières étapes de reconnaissance des dommages. Le fait

que cette protéine présente une certaine affinité pour l'ADN endommagé, ainsi que la sévérité des cas de *Xeroderma pigmentosum* qu'elle engendre lorsqu'elle est mutée, en faisait une candidate idéale. Aujourd'hui son rôle semble plus clair, elle n'interviendrait pas dans l'étape précoce de reconnaissance, mais jouerait plutôt un rôle dans la stabilisation du complexe d'incision, et ce, de concert avec la protéine RPA²⁰. Cette stabilisation passerait par une reconnaissance du dommage, XPA / RPA aurait une fonction de vérificateur de la présence effective d'une lésion afin de ne pas réaliser d'incision dans un brin d'ADN non lésé (**Figure 2**).

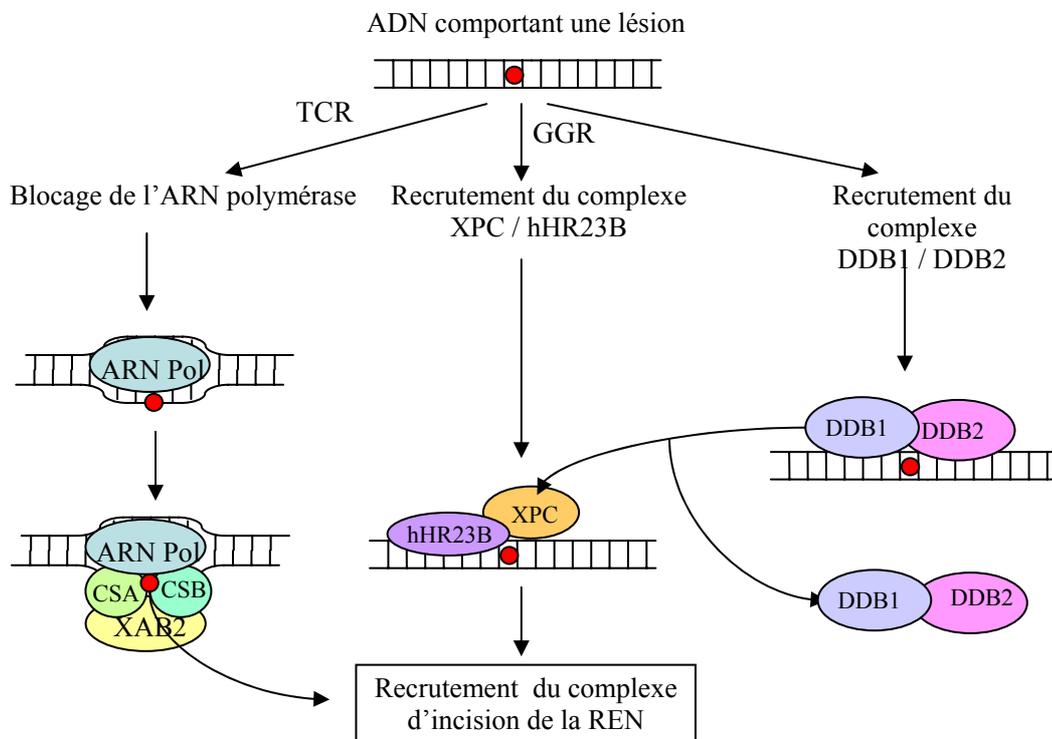


Figure 2 : Schéma représentant les différentes voies de reconnaissance du dommage au cours de la réparation par excision de nucléotides.

b) L'étape d'incision et d'excision

Une fois que le dommage est reconnu, le complexe d'incision est alors formé afin d'éliminer la lésion. Le facteur TFIIH est tout d'abord recruté, il est composé notamment de deux hélicases XPB et XPD qui, en présence d'ATP, vont permettre de dérouler la double hélice d'ADN. Cette ouverture de la double hélice permet le recrutement des protéines nécessaires à la suite du processus de réparation. Il est intéressant de noter que TFIIH est aussi nécessaire lors de la transcription, et que son rôle dans la REN doit être proche de celui qu'il joue lors de l'initiation de la transcription.

La protéine XPA rejoint alors le complexe. La suite du processus d'incision se déroule avec le recrutement de la protéine RPA qui se fixe à XPA, et de l'endonucléase XPG qui se positionne en 3' de la lésion. XPC et hHR23B quittent alors le complexe de réparation. Le duplex ERCC1 / XPF, qui tout comme XPG a une activité endonucléase, se positionne en 5' de la lésion. La double incision en 5' et 3' du dommage a ensuite lieu²¹ ; cette étape est dépendante de Mg^{2+} , cation nécessaire à l'activité endonucléase de XPG. Le brin d'ADN contenant le dommage, d'une taille d'environ trente nucléotides, est alors excisé (**Figure 3**).

c) L'étape de resynthèse et de ligation

Le complexe de resynthèse est composé de la polymérase répllicative ϵ ou δ , du facteur de processivité PCNA, et de RFC. Le facteur RFC permet de charger PCNA sur l'ADN qui va permettre à la polymérase de resynthétiser l'ADN excisé en prenant comme modèle le brin complémentaire. Pour finir, la ligase I vient ligaturer la double hélice d'ADN (**Figure 2**).

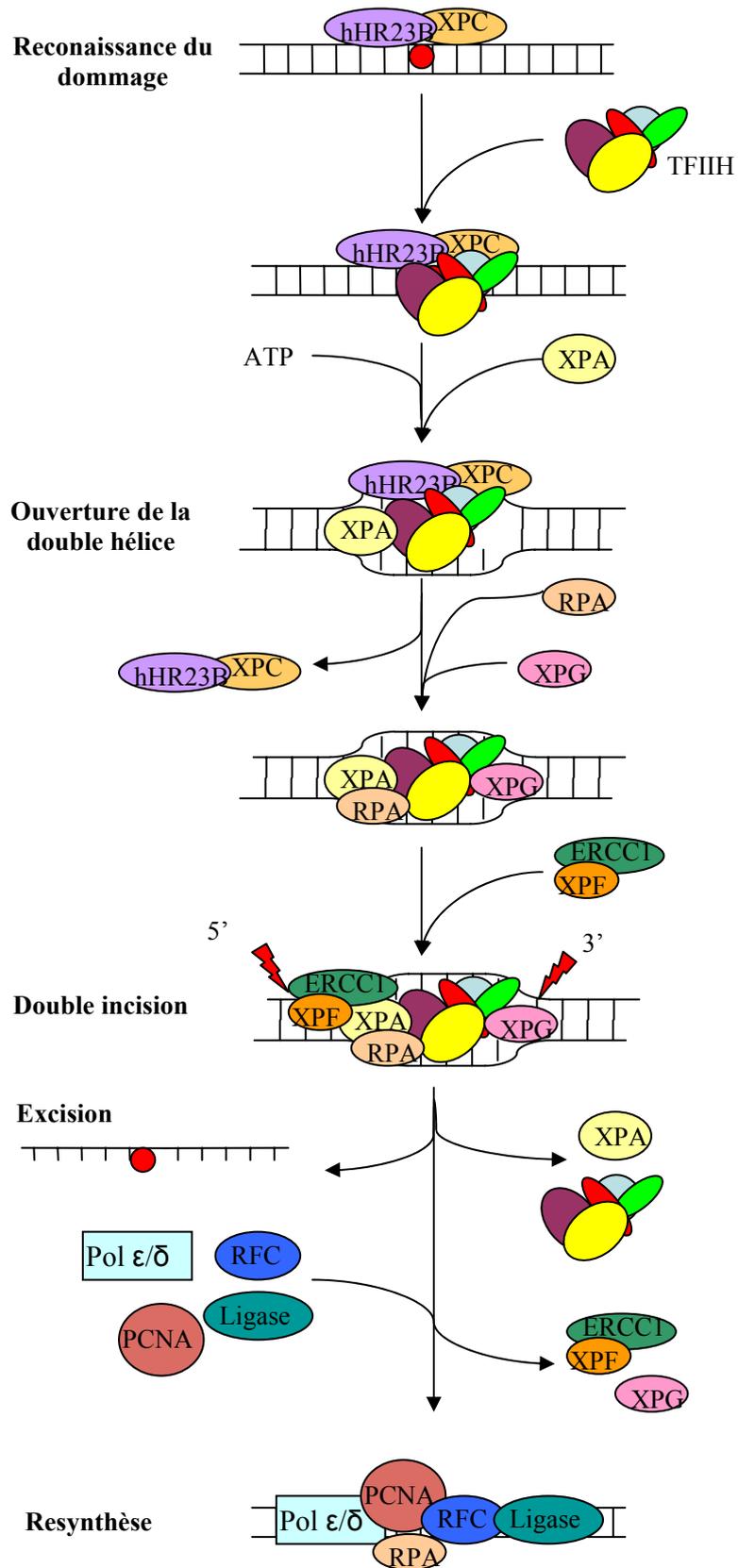


Figure 3 : Schéma présentant les différentes étapes lors de la réparation par excision de nucléotides.

3) Voie de signalisation et régulation de la REN

Nous allons aborder maintenant la manière dont la cellule régule le système de réparation par excision de nucléotides et présenter les différents mécanismes que possède la cellule pour contrôler ce formidable outil de réparation.

a) ATR : senseur des dommages

Au cours de sa vie, la cellule fait face à un nombre variable de dommages. En effet, les dommages que subit son ADN sont en grande partie liés à des événements exogènes imprévisibles comme l'exposition au rayonnement solaire, la pollution. La cellule a donc besoin de senseurs capables d'activer des effecteurs lui permettant d'adapter son niveau de réparation.

La protéine ATR est un des principaux senseurs qui permettent de réguler la REN, c'est une kinase qui appartient à la famille des PIKK. Cette protéine est présente dans le noyau sous forme de dimère avec ATRIP, et peut se fixer sur les fourches de réplication bloquées, ainsi que sur les dommages UV induits. Dans l'un ou l'autre de ces cas, ATR s'autophosphoryle, et déclenche alors une cascade de signalisation par phosphorylations successives qui aboutissent à l'activation de différents effecteurs tels que²² :

- p53 qui est un des principaux effecteurs agissant sur la REN et le cycle cellulaire.
- BRCA1 qui est impliqué dans la recombinaison homologue.
- Chk1 qui va permettre de bloquer le cycle cellulaire.

Tous ces effecteurs sont essentiels quant à l'adaptation de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Comme nous allons le voir, la protéine p53 est impliquée fortement et à plusieurs niveaux dans la régulation de la REN.

Il est à noter qu'une voie de signalisation très similaire existe, elle a pour senseur ATM qui est aussi une protéine de la famille des PIKK. Cette voie est décrite comme pouvant être activée par la présence de cassures dans l'ADN, elle a aussi p53 comme effecteur central. Elle pourrait donc par l'intermédiaire de p53 réguler aussi la REN.

b) p53 : un effecteur important régulant la REN

La protéine p53, aussi appelée protéine gardienne du génome, est impliquée dans beaucoup de processus cellulaires, comme notamment l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, mais aussi la réparation de l'ADN²³. Elle est très fortement impliquée dans la régulation de la réparation par excision de nucléotides et ce à deux niveaux :

Premièrement au niveau transcriptionnel : une fois activée par phosphorylation (par exemple par la voie de signalisation ATR), p53 peut directement induire la transcription des gènes codant pour les deux protéines de reconnaissance de dommage de la RGG, à savoir XPC et DDB2. Cette induction est rendue possible grâce au rôle de facteur de transcription que joue alors p53 en se fixant à son élément de réponse qui est présent au niveau des promoteurs respectifs des gènes *XPC* et *DDB2*^{24, 25}.

Le deuxième niveau de régulation, controversé, se ferait par une interaction directe de p53 avec XPB et XPD du complexe TFIIH. Cependant les conséquences de cette interaction ne sont pas claires et pourraient jouer un rôle plus important dans la régulation de l'apoptose que dans celle de la REN²⁶.

c) L'ubiquitination des protéines de reconnaissance de la REN

L'ubiquitination est un mécanisme impliqué dans la régulation et la dégradation des protéines. L'ubiquitination consiste en l'ajout d'un peptide d'ubiquitine sur une protéine ; le degré d'ubiquitination peut varier et conduire à des conséquences diverses. La polyubiquitination a comme principale conséquence la dégradation de la protéine par le complexe du protéasome, la monoubiquitination quant à elle semblerait moduler l'activité des protéines, leur localisation, ainsi que leurs interactions.

- **L'ubiquitination de DDB2**

Il a été montré que, bien qu'étant induite après une irradiation UV, DDB2 est rapidement dégradée. Or cette dégradation est empêchée par des inhibiteurs du protéasome, confortant ainsi l'idée que cette régulation passe par une ubiquitination de DDB2²⁷. Une hypothèse pour expliquer cette dégradation serait l'élimination de DDB2 permettant ainsi l'accès de la protéine XPC au dommage. Cette régulation par ubiquitination rajoute un niveau de complexité à la régulation de DDB2 qui est aussi dépendante de p53²⁸.

- **L'ubiquitination de XPC**

La protéine XPC est elle aussi régulée par ubiquitination car, tout comme DDB2, sa dégradation est stoppée par les inhibiteurs du protéasome. La protéine hHR23B régulerait cette dégradation en masquant le site d'ubiquitination d'XPC lorsque ces deux protéines sont sous forme de complexe²⁹.

d) Conclusion

La régulation de la REN est donc un phénomène très complexe (**Figure 4**) qui permet à la cellule d'ajuster finement l'activité de la réparation par excision de nucléotides et ainsi s'adapter à son environnement. Elle peut avoir lieu à différents niveaux : du senseur à l'effecteur en passant par les protéines de reconnaissance des dommages. A cela s'ajoute un second niveau de régulation par ubiquitination.

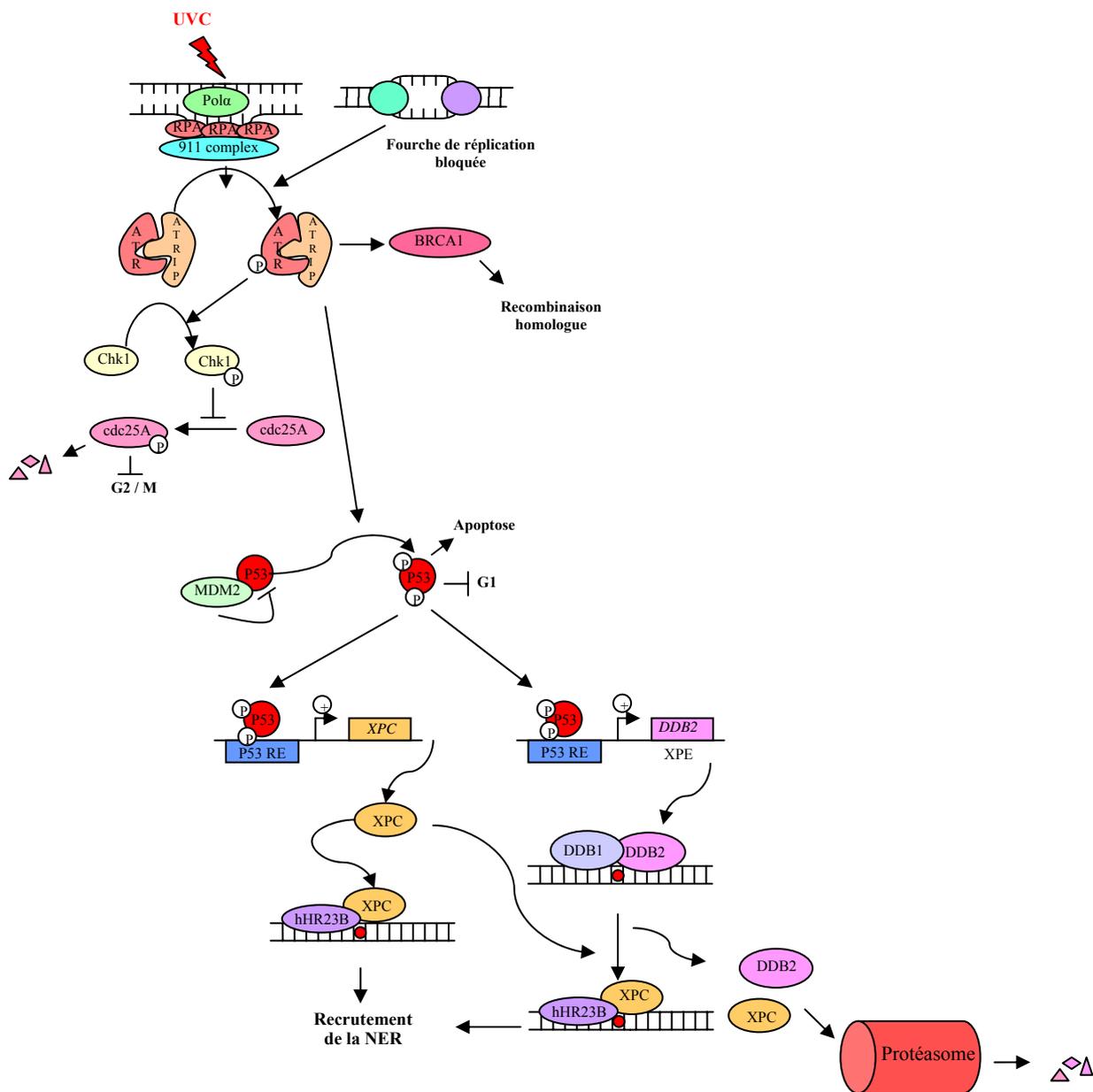


Figure 4 : Figure représentant le système de régulation de la REN. Le senseur de dommage ATR active l'effecteur p53, qui régule la transcription des gènes *XPC* et *DDB2*. Le protéasome dégrade les protéines *XPC* et *DDB2* dans le cas où elles sont ubiquitinylées

B) La réparation par excision de base (REB)

1) Découverte et historique

Tout comme la réparation par excision de nucléotides, la réparation par excision de base est très largement représentée chez les êtres vivants. Cependant sa découverte a été beaucoup plus tardive, et ceci peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Premièrement, aucune maladie génétique liée à la REB n'a été découverte, l'attention des chercheurs n'a donc pas pu être focalisée par l'existence d'un phénotype particulier. Deuxièmement, son observation *in vitro* a longtemps été masquée et/ou confondue avec des activités de dégradation de l'ADN de type nucléase¹.

En effet, la première découverte d'une activité enzymatique impliquée dans la REB remonte à 1972, date à laquelle est décrite chez *E.coli* une activité endonucléase spécifique des sites dépurinés³⁰. Les auteurs de l'article émettent l'hypothèse que cette enzyme permet de réparer les sites dépurinés. Toujours chez *E.coli*, T. Lindahl mettra en évidence en 1974 une activité glycosylase capable d'éliminer les uraciles de l'ADN³¹. En 1979, c'est T. Lindahl encore qui posera les bases de la REB³², à savoir : une glycosylase coupe la base lésée formant ainsi un site abasique, puis une endonucléase coupe l'hélice d'ADN permettant la resynthèse de la partie lésée. Un grand nombre de glycosylases seront alors découvertes et étudiées, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

La compréhension mécanistique de la REB sera approfondie quand, en 1994, D.F. Bogenhagen démontre chez *Xenopus laevis* que deux voies de resynthèse du brin réparé existent. Une non dépendante de PCNA où la taille du brin synthétisé est de 1 à 2 nucléotides (voie de resynthèse courte), et l'autre dépendante de PCNA présentant une resynthèse de cinq à sept nucléotides³³ (voie de resynthèse longue). Un an plus tard, E. Dogliotti et A. Abbondandolo mettront en évidence que ces deux voies de resynthèse existent aussi dans les cellules des mammifères³⁴.

A l'heure actuelle, des questions restent encore en suspens :

- Comment se fait la sélection entre la voie de resynthèse longue et courte ?
- Existe-t-il une réparation par excision de base couplée à la transcription ?

Nous le verrons un peu plus loin dans ce chapitre, des théories s'opposent concernant l'une ou l'autre de ces deux questions.

2) Le mécanisme de la réparation par excision de base

a) La reconnaissance de la base lésée

- Les types de dommages reconnus par la REB

Contrairement à la réparation par excision de nucléotides, la REB répare les petits dommages de l'ADN, à savoir les modifications de bases. Il existe plusieurs facteurs pouvant modifier la chimie des bases :

- La désamination spontanée de la cytosine qui conduit à la formation de l'uracile.
- Les espèces réactives de l'oxygène qui peuvent, en réagissant avec l'ADN, conduire à la formation de toute une famille de bases oxydées dont la plus étudiée est la 8-oxoG.
- Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique qui peuvent induire par l'intermédiaire du 4-Hydroxynonenal (HNE) des adduits exocycliques.
- Les agents chimiques qui peuvent alkyler les bases en ajoutant par exemple un groupement méthyle.

Comme nous le constatons, l'éventail des dommages auxquels fait face la réparation par excision de base est donc large et très varié et suppose une stratégie de reconnaissance adaptée.

- Le mécanisme de reconnaissance de la base modifiée et son excision

Au cours de la réparation par excision de base, c'est une ADN *N*-Glycosylase qui réalise l'étape de reconnaissance de la base modifiée et procède alors à son excision. Après sa fixation sur la base lésée, l'ADN *N*-Glycosylase coupe la lésion *N*-glycosidique qui relie la base au sucre, il en résulte alors un site abasique.

Face au nombre important de bases modifiées, la cellule a acquis un nombre important d'ADN *N*-Glycosylases, chacune plus ou moins spécifique d'un dommage. Cette stratégie, à l'opposée de celle de la réparation par excision de nucléotides, permet

d'avoir une reconnaissance très fine et précise de modifications chimiques parfois minimes.

Cette reconnaissance passe par la conformation spatiale bien particulière des ADN *N*-Glycosylases. En effet, la plupart d'entre elles partagent une conformation tridimensionnelle très proche bien qu'ayant des séquences peptidiques totalement différentes. Elles ont aussi en commun un domaine de fixation à l'ADN de type hélice-boucle-hélice (HbH). Ces similarités ont permis de les regrouper dans une superfamille d'ADN *N*-Glycosylase.

Le **Tableau 1** ci-dessous présente quelques ADN *N*-Glycosylases humaines ainsi que les bases modifiées qu'elles peuvent reconnaître et exciser.

<i>Glycosylase</i>	<i>Bases reconnues et excisées</i>	<i>Activité AP lyase</i>
UNG	Uracile	non
ANPG	3-méthyladénine, 3-méthylguanine, 1,N ² -éthénoguanine	non
SMUG1	Uracile, 5-hydroxyméthyluracile	non
MBD4	Uracile, O ⁶ -méthylguanine	oui
TDG	Uracile, éthénocytosine	non
OGG1	8-oxoG, FaPy-Guanine	oui
MYH	2-OH-Adénine	non
MPG	3-méthylpurines, hypoxanthine, éthénoadénine	non
NTHL1	Diols de thymine et de cytosine	oui
NEIL1	FaPy-Adénosine, 8-oxoG	oui
NEIL2	Diols de thymine et de cytosine	oui
NEIL3	Non déterminé	oui

Tableau 1 : Tableau regroupant différentes ADN *N*-Glycosylases humaines et leurs activités.

Il est à noter que certaines glycosylases présentent aussi une activité AP lyase, en plus de leur activité *N*-Glycosylase, qui permet d'inciser l'ADN après formation du site abasique. Nous allons le voir, cette activité AP lyase a une importance sur le déroulement de la suite du mécanisme de réparation.

b) L'incision du brin d'ADN

Une fois que le site abasique est formé par l'ADN *N*-Glycosylase, une incision dans le brin d'ADN doit avoir lieu afin de permettre la resynthèse de la base éliminée. Cette incision peut être réalisée selon deux mécanismes distincts.

- **Incision réalisée par les AP-Endonucléases :**

Cette incision peut être réalisée par une famille de protéines appelées AP-Endonucléases/Exonucléases. Deux d'entre elles ont été identifiées chez l'homme pour le moment, il s'agit de APEX1 et APEX2. Ces protéines ont la capacité de reconnaître les sites abasiques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester qui se trouve en 5' provoquant ainsi l'ouverture de la double hélice ; elles présentent aussi de faibles activités exonucléases¹. L'activité de APEX1 est dépendante en cations divalents notamment en Mg^{2+} , le magnésium affecte à la fois l'interaction avec l'ADN et le clivage de la liaison phosphodiester³⁵.

Il est intéressant de noter que APEX1 est aussi impliquée dans d'autres mécanismes. Sa région N-terminale permet notamment d'activer, par réduction, plusieurs facteurs de transcription : AP-1, NF- κ B, p53, Myb, ATF, CREB, impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires³⁶. Cette activité réductrice de APEX1 est modulée par le niveau rédox cellulaire. Lors de stress oxydant, APEX1 est rapidement oxydé et n'est plus capable, par exemple, d'activer AP-1 ; la régénération de l'activité rédox de la protéine APEX1 est alors assurée par la thioredoxine³⁶.

- **Les ADN N-Glycosylases AP lyase :**

L'étape d'incision peut aussi être réalisée par les ADN N-Glycosylases ayant une activité AP lyase. Grâce à cette activité AP lyase, elles sont capables d'hydrolyser la liaison phosphodiester qui est en 3' d'un site abasique. Dans le cas où une glycosylase bifonctionnelle excise une base et crée un site abasique, elle générera alors aussi une coupure en 3' du site abasique. Cette double activité permet de diminuer le temps de réparation, puisque dans ce cas précis le recrutement d'une endonucléase n'est pas nécessaire .

Lors de l'incision du brin d'ADN au niveau du site abasique par une AP lyase, la liaison phosphodiester sur laquelle était fixée la base modifiée doit être éliminée afin de permettre la resynthèse d'ADN. Une phosphodiesterase réalise cette hydrolyse, permettant la formation d'un 3'OH nécessaire pour l'élongation du brin d'ADN neosynthétisé.

c) Resynthèse de la zone excisée

Deux voies de resynthèse sont possibles, et pour chacune d'entre elles le nombre de nucléotides incorporés diffère :

- La voie de resynthèse courte :

Durant cette voie de resynthèse, un à deux nucléotides sont incorporés par la polymérase β associée à XRCC1. En même temps que les nucléotides sont polymérisés, la polymérase β , qui a aussi une activité ADN-desoxyribophosphatase (dRpase), excise le 5' desoxyribose-phosphate (dRp) généré lors de la coupure par l'endonucléase.

- La voie de resynthèse longue :

Contrairement à la voie courte, lors de la voie de resynthèse longue, un nombre plus important de nucléotides est incorporé, environ cinq à sept. Cette étape est réalisée par les mêmes polymérases que celles impliquées dans la resynthèse lors de la REN, à savoir : les polymérases ϵ ou δ associées au facteur de processivité PCNA. Les polymérases ϵ et δ n'ayant pas d'activité dRpase, les nucléotides qu'elles polymérisent provoquent une zone de recouvrement où l'ancien brin d'ADN n'est plus hybridé à son complémentaire. Une Flap endonucléase (FEN1) va alors venir le couper afin de permettre à l'étape de ligation d'avoir lieu.

Ce mécanisme de sélection entre l'une ou l'autre de ces deux voies n'a pas encore été élucidée. Certains résultats tendent à montrer que cette sélection dépendrait de la glycosylase qui a réalisé l'excision³⁷, d'autres qu'elle serait guidée par la capacité à éliminer le résidu dRp. L'hypothèse est que, si le résidu dRP est hydrolysé rapidement, alors la voie de resynthèse courte est favorisée et inversement³⁸.

d) L'étape de ligation

Cette étape finale de la REB fait intervenir différents acteurs en fonction de la voie de resynthèse qui a été prise. Dans le cas de la voie courte, c'est le complexe ligase III / XRCC1 qui referme la double hélice d'ADN, lors de la voie longue c'est le

complexe ligase I / XRCC1. Il est à noter que l'étape de ligation de la voie longue partage la même ligase que celle utilisée par la REN.

Ci-après est présenté un schéma récapitulatif de toutes les étapes de la réparation par excision de base (**Figure 5**).

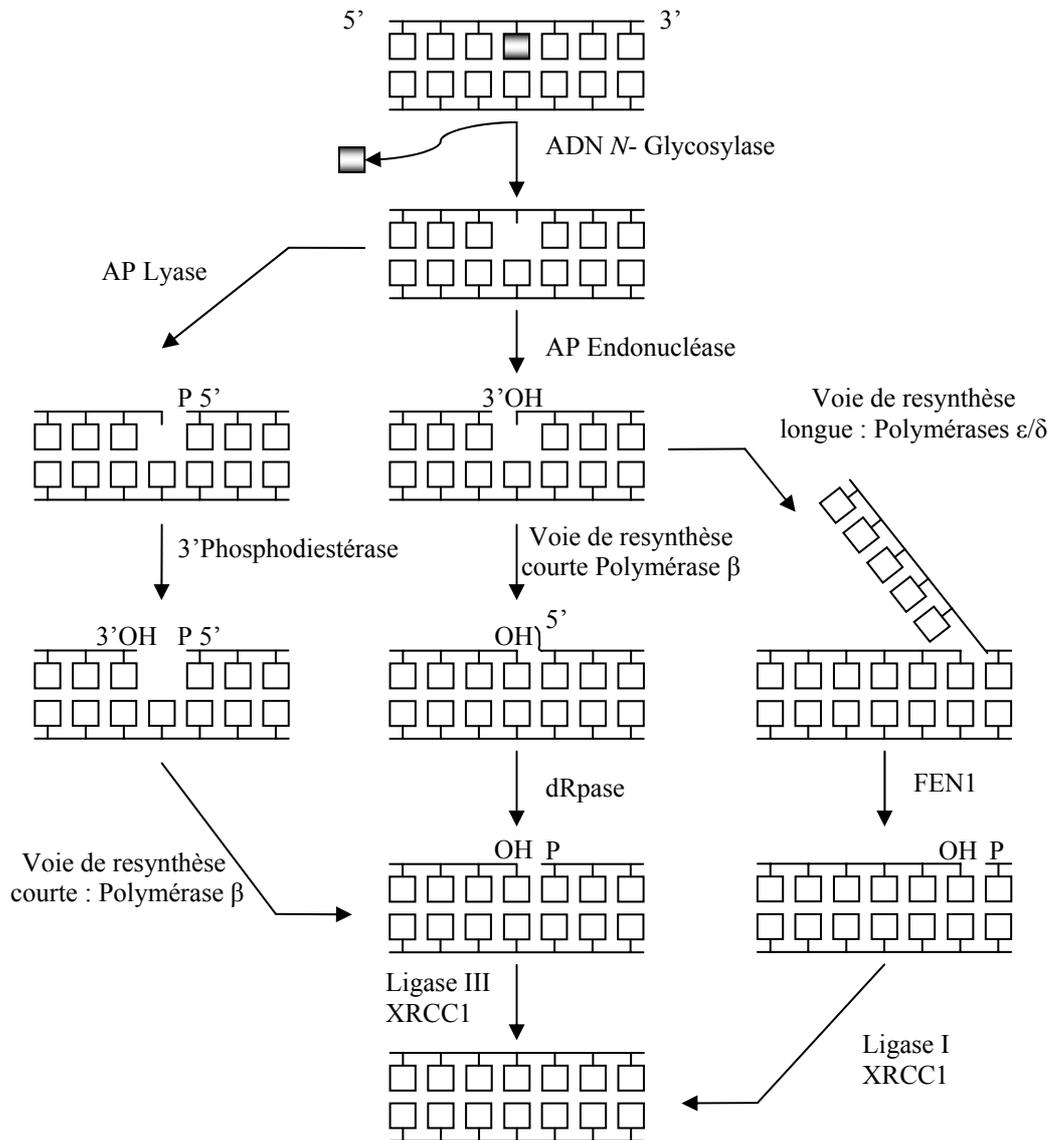


Figure 5 : Schéma représentant le déroulement séquentiel des différentes étapes de la réparation d'une base lésée (noire) par la REB, ainsi que les différentes voies de resynthèse possibles.

3) La réparation par excision de base couplée à la transcription

De nombreux travaux se sont attachés à l'étude de la réparation par excision de base couplée à la transcription. Cependant, aucune démonstration génétique ou biochimique n'a pu mettre en avant un rôle direct de la REB¹⁷. De plus, les bases

modifiées comme la 8-oxoG et les diols de thymines ne bloquent que très faiblement l'ARN polymérase (50%)^{39, 40}, ce qui pourrait rendre plus difficile le recrutement des protéines de réparation. Toutefois il faut rester très prudent quant à cette éventuelle implication de la REB dans la réparation couplée à la transcription, des éclaircissements sur ce mécanisme étant nécessaires.

4) La régulation de la réparation par excision de base

Contrairement à la réparation par excision de nucléotides, très peu de données sont disponibles concernant la régulation de la réparation par excision de base. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, la protéine p53 semble ici aussi jouer un rôle très important, et ce à deux niveaux :

- De manière indirecte, en régulant le niveau d'expression du gène codant pour la polymérase β ⁴¹.
- De manière directe, en interagissant et en stimulant différentes protéines impliquées dans la REB, notamment APEX1⁴² et la polymérase β ⁴³.

L'implication de p53 dans la régulation de la réparation par excision de base souligne une nouvelle fois son rôle dans le maintien de l'intégrité du génome.

La Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est une protéine décrite comme intervenant dans la régulation de la REB. La PARP est capable de polymériser de l'ADP-ribose sur d'autres protéines, mais aussi et principalement sur elle-même en utilisant du NAD⁺ comme source d'ADP-ribose^{44, 45}. Cette polymérisation lui permet de recruter des protéines, notamment lorsque la PARP est activée par la présence de cassures double, simple brin, ou de résidu dRp, ce dernier par exemple étant produit lors de la REB⁴⁶. La PARP semble réguler la REB en agissant sur le recrutement spécifique de la protéine XRCC1, de la polymérase β , et de la ligase 3 avec lesquelles elle peut interagir⁴⁷. Ce recrutement est modulé par l'état d'activation de la PARP qui dépendrait dans ce cas précis de la présence de résidus dRp, mais aussi de la concentration cellulaire en NAD⁺^{45, 48}.

Enfin, une voie de régulation concernant la glycosylase UDG a aussi été décrite. La quantité d'UDG semble régulée en fonction du cycle cellulaire, sa quantité

doublant entre la phase G1 et la phase S⁴⁹. Cette régulation permettrait à la cellule, en augmentant sa quantité de glycosylase au cours de la division cellulaire, d'améliorer ses capacités de réparation, et ainsi de réduire le nombre de dommages transmis à sa descendance.

5) Comparaison entre la REN et la REB

Le **Tableau 2** présenté ci-dessous permet d'avoir une vue d'ensemble des caractéristiques principales de la REN et de la REB, et ainsi d'apprécier leurs similitudes et différences.

	REN		REB	
	RGG	RCT	Rresynthèse longue	Resynthèse courte
Types de dommages pris en charge	Dommages volumineux	Dommages volumineux	Petits dommages de bases	Petits dommages de bases
Réparation couplée à la transcription	non	oui	A démontrer	A démontrer
Type de reconnaissance	Basée sur la déformation de l'ADN	Basée sur le blocage de l'ARN polymérase	Spécifique de la base lésée	Spécifique de la base lésée
Reconnaissance du dommage	XPC hHR23B DDB1 et 2	CSA CSB	Nombreuses glycosylases	Nombreuses glycosylases
Excision du dommage	TFIIH XPF ERCC1 XPG	TFIIH XPF XPG	Nombreuses glycosylases	Nombreuses glycosylases
Incision de la double hélice	TFIIH XPF XPG	TFIIH XPF XPG	APEX1 certaines glycosylases	APEX1 certaines glycosylases
Etape de resynthèse	Polymérasés ϵ/δ PCNA	Polymérasés ϵ/δ PCNA	Polymérasés ϵ/δ PCNA	Polymérasés β XRCC1
Nombre de nucléotides incorporés lors de la resynthèse	27-30	27-30	5-7	1-2
Ligase	Ligase I	Ligase I	Ligase I	Ligase III XRCC1

Tableau 2 : Tableau de comparaison entre la REN et la voie de resynthèse courte et longue de la REB.

C) Les autres systèmes de réparation

Nous venons de présenter les systèmes de réparation par excision de nucléotides et de réparation par excision de base, cependant d'autres mécanismes de réparation tout aussi importants existent et prennent en charge d'autres types de dommages. Nous allons aborder dans cette partie quelques-uns de ces mécanismes.

1) Les systèmes de réparation des cassures de l'ADN

Aux cours de la vie cellulaire, des cassures de la double hélice d'ADN peuvent survenir. Plusieurs facteurs sont à l'origine de ces cassures, notamment les espèces réactives de l'oxygène, mais aussi le rayonnement ionisant. Ces cassures de la chaîne d'ADN peuvent engendrer des instabilités génomiques telles que des remaniements chromosomiques. Actuellement, nous connaissons deux systèmes de réparation permettant de corriger ces dommages.

a) La réparation par recombinaison non homologue (RNH)

La réparation par recombinaison non homologue est la principale voie de réparation des cassures double brin chez les eucaryotes. Elle permet de rejoindre deux extrémités d'ADN même si ces dernières n'ont pas ou très peu d'homologie de séquences^{50, 51}. Ce mécanisme est initié par le dimère Ku80 / Ku70 qui a la capacité de fixer les extrémités d'ADN. Son premier rôle serait de protéger les extrémités afin d'éviter leur dégradation⁵² et de permettre leur bon positionnement⁵³. Ku80 et Ku70 recrutent la protéine DNA-PK qui s'active alors et permet l'arrivée d'autres facteurs essentiels pour la suite du processus, à savoir Rad50, Mre11 et Xrs2^{54, 55}. Ces protéines sont impliquées dans la préparation des extrémités de l'ADN, ajout, suppression de nucléotides, et dans le maintien de l'organisation spatiale des deux brins d'ADN. La ligase IV en dimère avec XRCC4 vient alors ressouder les deux brins d'ADN (**Figure 6**).

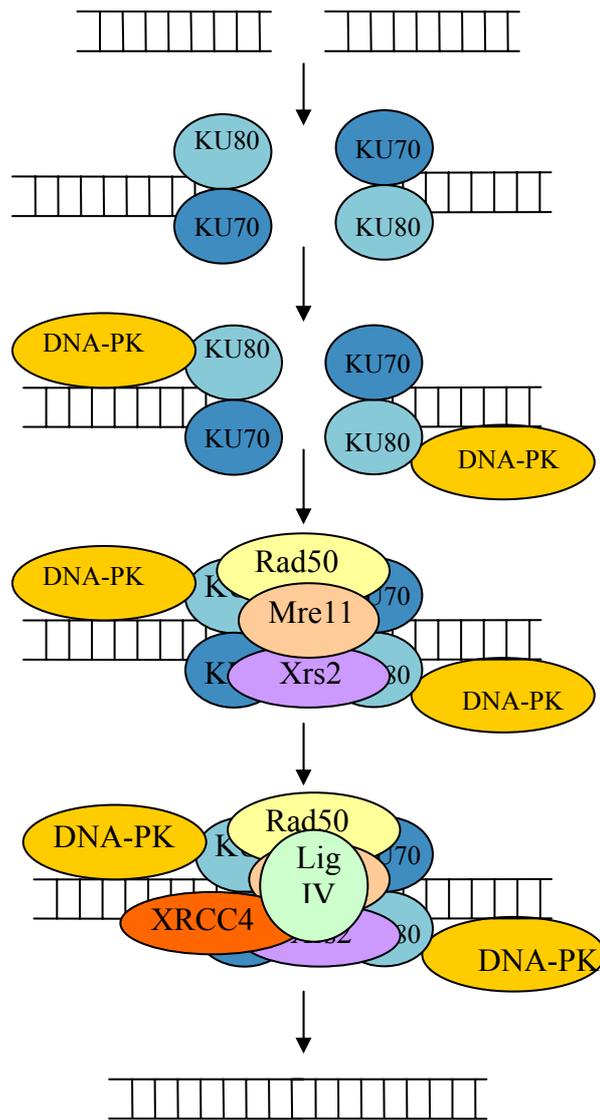


Figure 6 : Schéma présentant les différentes étapes lors de la réparation non homologue de cassures double brin de l'ADN

Il est important de souligner que le fonctionnement même de ce système de réparation peut générer des mutations ; en effet, comme aucune complémentarité des brins n'est nécessaire pour que la RNH ait lieu, deux brins non complémentaires peuvent être rejoints. De plus, avant que les extrémités d'ADN ne soient prises en charge par la ligase, des nucléotides peuvent être ajoutés ou retirés, ce qui accroît le risque mutagène de la RNH.

b) La réparation par recombinaison homologue (RH)

La réparation par recombinaison homologue est un mécanisme beaucoup plus complexe que celui de la recombinaison non homologue. Contrairement à cette dernière, il utilise la complémentarité des brins d'ADN afin de les rejoindre. Par conséquent, aucune information génétique n'est théoriquement perdue ou modifiée. Cependant, il semblerait que ce mode de réparation des cassures double brin soit moins utilisé par la cellule que la RNH, et serait restreint aux phases S et G2 du cycle cellulaire où les recombinaisons entre chromatides sœurs peuvent avoir lieu⁵⁶. Nous ne rentrerons pas dans les détails mécanistiques de ce mode de réparation dont une partie de son fonctionnement n'a pas été élucidée.

2) Les polymérases translésionelles

Un dommage est dangereux pour la cellule s'il modifie les données génétiques, mais aussi s'il bloque la réplication, ce qui peut provoquer la formation de chromosomes tronqués et conduire à un processus de cancérisation. A l'entrée du cycle cellulaire, il arrive que certains dommages pouvant bloquer les polymérases (réplicationnelles DCP, pp(6-4)) n'aient pas été réparés, soit parce qu'ils sont passés aux travers des systèmes de réparation, soit parce que leur formation est récente. Dans ce cas de figure, des polymérases translésionelles sont mises en jeu. Ces enzymes sont capables de polymériser des nucléotides bien qu'un dommage soit présent sur le brin matrice. Actuellement, cinq de ces polymérases ont été identifiées, ce sont les polymérases κ , μ , θ , ι , et η . Lorsque l'une des deux polymérases réplicationnelles ϵ ou δ se trouve bloquée au niveau d'un dommage, une des polymérases translésionelles prend alors le relais afin de passer cet obstacle. Par la suite, la polymérase translésionelle se retire de l'ADN et une des polymérases réplicationnelles reprend alors la polymérisation (**Figure 7**).

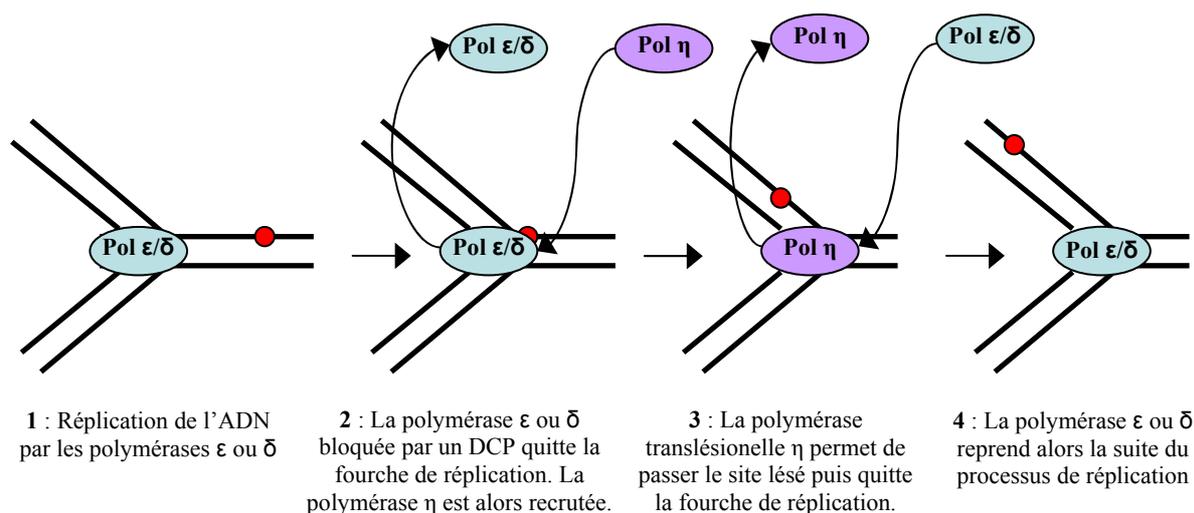


Figure 7 : Les différentes étapes lors de la polymérisation translésionnelle de DCP (point rouge)

Certaines des polymérase translésionnelles ne conduisent pas à des mutations. On peut citer par exemple la polymérase η qui réalise une synthèse translésionnelle non mutagène des dimères de thymines⁵⁷, la polymérase κ est aussi capable de passer des dommages tels que la 8-oxoG, les diols de thymines sans introduire d'erreur⁵⁸. Cependant, certaines polymérase comme la θ ne permettent pas de réaliser une synthèse translésionnelle sans introduire de modification dans la séquence nucléotidique. Ceci souligne le fait que, pour la cellule, il est plus important d'éviter un blocage de la fourche de réplication que d'introduire des mutations dans son génome. Nous allons le voir maintenant, la cellule est dotée de systèmes capables de réparer ces mésappariements.

3) La réparation des mésappariements et des insertions / délétions

Les mésappariements de bases sont des dommages qui se produisent très fréquemment durant la vie cellulaire. Par exemple, pendant la réplication, les polymérase peuvent introduire des erreurs de deux manières : en ne mettant pas le nucléotide correct en face de son complémentaire, ou en faisant des insertions / délétions de nucléotides. La réparation des mésappariements et des insertions / délétions fait intervenir plusieurs dimères de protéines qui ont chacun leurs spécificités. Par exemple, MutS_α dimère formé par hMSH2 / hMSH6, reconnaît les mésappariements de bases ainsi que les insertions et délétions de un à huit nucléotides. MutS_β, dimère formé par hMSH2 / hMSH3, reconnaît des boucles d'insertion / délétion plus grandes, mais ne reconnaît que très faiblement celle d'un seul

nucléotide⁵⁹. MutS α et MutS β jouent un véritable rôle de senseur et peuvent s'activer de manière ATP dépendante lorsqu'ils rencontrent un mésappariement ou une insertion délétion. Cette activation permet de recruter alors de manière ATP dépendante MutL α dimère formé par hMLH1 / hPMS2, ce qui conduit à l'incision de l'ADN. Le complexe PCNA, RFC, polymérase δ vient ensuite synthétiser l'ADN de la zone réparée^{1, 59}.

Plusieurs questions restent en suspens quant à la réparation des mésappariements :

- Quel est l'homologue humain de MutH, la protéine réalisant l'excision chez *E.coli* ?
- Comment, chez les eucaryotes, est-ce que ce système de réparation reconnaît et discrimine le brin à corriger ?

4) Les alkyltransférases

Nous avons brièvement abordé lors de la partie consacrée à la réparation par excision de base les lésions provoquées par les agents alkylants. Ces dommages sont la conséquence de l'ajout d'un groupement chimique sur une des quatre bases de l'ADN, ce qui peut avoir comme conséquence de provoquer des mutations lors de la réplication. Des sources diverses d'agents alkylants existent, comme le chlorure de méthyle, produit par exemple lors de la combustion de la biomasse⁶⁰, mais aussi les nitrosamines présentes dans la fumée de cigarette, ou encore le diméthyle sulfate (DMS) utilisé par l'industrie chimique et pharmaceutique. Nous sommes donc amenés à être exposés fréquemment à ce type de dommage.

a) La O⁶-MéthylGuanine DNA MéthyleTransférase (O⁶-MGMT)

La O⁶-MéthylGuanine, alkylation de la guanine par un groupement méthyle est un des rares dommages qui est spécifiquement pris en charge par un système de réparation dédié. Ce système de réparation est composé d'une seule enzyme, la O⁶-MGMT, qui a la capacité de retirer le groupement méthyle de la guanine. Lors de la réaction de réparation, la cystéine de la O⁶-MGMT joue le rôle d'accepteur de méthyle. L'enzyme sous forme méthylée n'est plus fonctionnelle et sera alors

dégradée¹, d'où son appellation « d'enzyme suicide » (Figure 8). Il est intéressant de noter que l'O⁶-MGMT procède à une réparation directe de la base endommagée et non à son élimination et son remplacement comme dans la REB ou la REN.

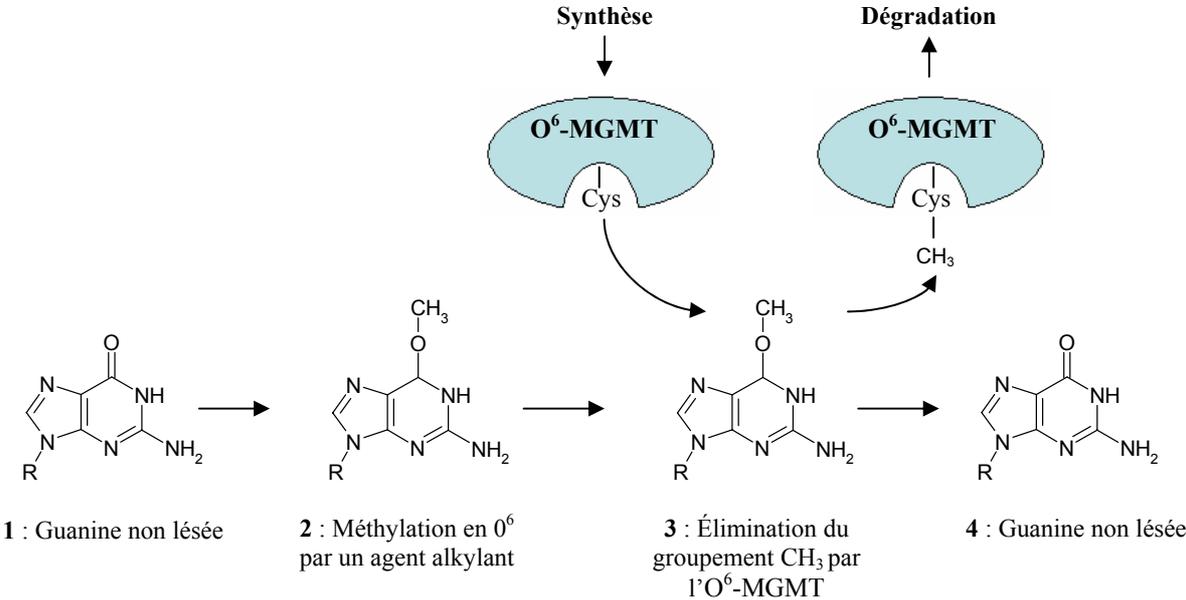


Figure 8 : Les différentes étapes de la réparation de l'O⁶-MethylGuanine par la O⁶-MGMT.

b) ABH1, 2 et 3

Les gènes *ABH1*, *ABH2* et *ABH3* codent pour des méthyle-transférases homologues de *AlkB* chez *E.coli*^{61, 62}. *ABH1*, *ABH2*, et *ABH3* peuvent retirer le groupement méthyle de la 1-méthyladénine et de la 3-méthylcytosine par une réaction oxydative dépendante en Fe²⁺ et 2-oxoglutarate **Figure 9**⁶³.

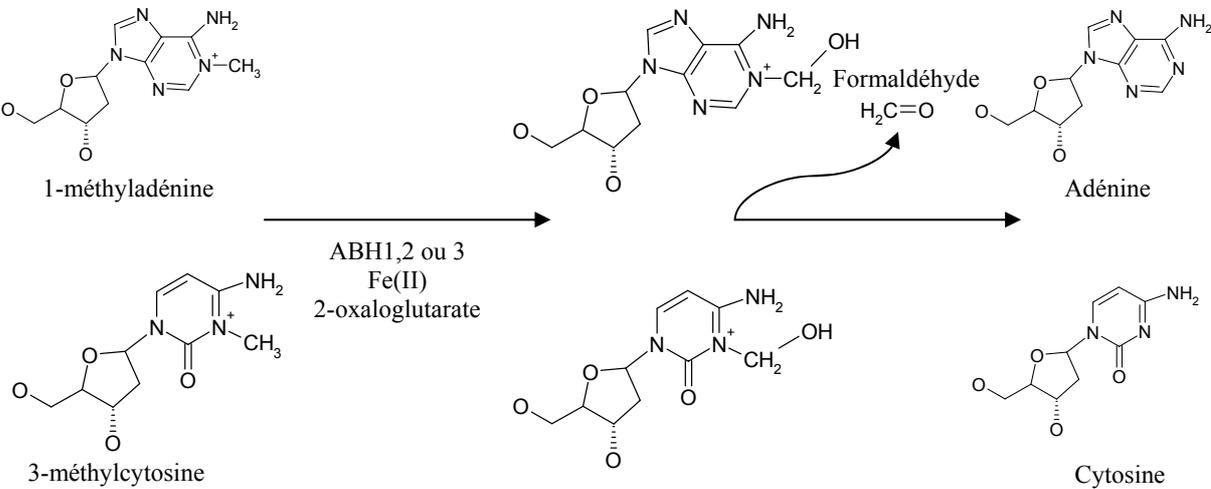


Figure 9 : Réparation de la 1-méthyladénine et de la 3-méthylcytosine par ABH1,2 ou 3.

ABH3 semble pouvoir réparer les bases méthylées présentes dans l'ARN comme la 1-méthyladénine et la 3-méthylcytosine^{63, 64}. Mais très peu de recherches se sont focalisées sur la réparation de l'ARN. Cependant, il a été montré que la présence de groupements méthyles sur les bases des ARN pouvait bloquer la traduction⁶⁵.

D) Complémentarités et interactions des systèmes de réparation

Comme nous venons de le voir, chaque système de réparation est spécifique d'un type ou d'une famille de dommages, ce qui les rend complémentaires les uns des autres. Si la REN est spécialisée dans les dommages qui induisent une déformation dans la double hélice d'ADN, la REB au contraire répare essentiellement les petites modifications de bases. La RH et la RNH quant à elles sont dédiées à la réparation des cassures double brin, et la O⁶-MGMT à la réparation des bases alkylées.

Cependant, notre connaissance évolue, et de plus en plus de résultats montrent que des interactions entre les différents mécanismes de réparation ont lieu. A. Sancar a démontré *in vitro* que les protéines de la réparation par excision de nucléotides sont capables d'exciser faiblement des dommages oxydatifs^{66, 67}, émettant l'hypothèse que la REN pourrait jouer, dans certains cas, un rôle de complément à la REB. Toujours dans ce même sens, les protéines XPA et XPG sembleraient favoriser les activités de la REB suggérant, là aussi, des interactions entre ces deux systèmes de réparation par l'intermédiaire de certaines protéines⁶⁸⁻⁷¹.

De leur côté, des protéines liées à la réparation des mésappariements auraient aussi des implications avec d'autres systèmes de réparation. Les protéines hMLH1 et hMSH2 semblent jouer un rôle dans la RCT des dommages UVC induits⁷², et que MutS α serait capable de reconnaître la 8-oxo-Guanine⁷³. Compte tenu de ces résultats récents, les systèmes de réparation apparaissent donc plus complexes que la vision segmentée que l'on pouvait en avoir. Les complémentarités et les interactions qui les régissent demandent donc de les appréhender de façon plus globale.

E) Régulation par translocation nucléaire des protéines de réparation

Beaucoup de recherches portent sur le déclenchement des voies de signalisation agissant sur la réparation de l'ADN, mais peu d'entre elles traitent de la régulation des systèmes de réparation, à savoir la modulation positive et négative de ces activités. Nous avons vu que certains gènes de réparation peuvent être induits et que leur produit peut être dégradé s'il est ubiquitinylé ; ce mécanisme constitue en soi une régulation. Cependant, certaines recherches ont montré qu'une régulation pouvait aussi avoir lieu par modulation de la translocation nucléaire des protéines de réparation, et ce pour différents systèmes de réparation. Une translocation nucléaire directement dépendante de la présence de dommages a été mise en évidence pour des protéines impliquées dans :

- La REN : DDB1/DDB2⁷⁴
- La RCT : CSA⁷⁵
- Le mécanisme de réparation des mésappariements : MSH2, MSH6⁷⁶

Les effecteurs entrant en jeu afin de provoquer cette translocation ne sont pas toujours connus. Cependant, il a été montré que la protéine XPA peut être transloquée vers le noyau de manière ATR dépendante, dans ce cas précis la translocation pourrait être médiée par un effecteur de ATR⁷⁷.

Les différentes protéines dont nous venons de parler possèdent dans leur séquence un signal de localisation nucléaire (SLN), mais n'ont, pour le moment, pas été décrites comme possédant un signal d'export nucléaire (SEN). Une fois la réparation des dommages effectuée, la cellule doit à nouveau retrouver un niveau de réparation basal. Leur dégradation par le protéasome suite à leur ubiquitination pourrait donc avoir lieu, comme cela a été décrit par exemple pour DDB2²⁷. Toutefois la protéine APEX1 impliquée dans la REB possède à la fois un SLN et un SEN, suggérant qu'une régulation par import-export pourrait aussi avoir lieu⁷⁸.

La translocation des enzymes de réparation apparaît donc comme une voie de régulation potentiellement importante des systèmes de réparation, dont l'implication concrète reste à déterminer.

F) Dommages de l'ADN et cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus très important de la vie cellulaire, durant lequel l'intégralité du génome va être dupliqué. La cellule doit donc éviter qu'il ait des dommages avant de débiter le cycle et que des dommages ne se forment pendant le cycle.

Pour cela deux mécanismes coopèrent, le premier est basé sur un réseau de protéines capables de bloquer le cycle si des dommages sont présents afin de permettre leur réparation. Ce réseau comprend deux protéines senseurs de dommages ATR et ATM qui déclenchent une cascade de signalisation, passant respectivement par Chk1 et Chk2, capables de bloquer le cycle cellulaire en G2/M et G1/S^{79, 80}. Mais ATM et ATR ont aussi comme effecteur p53^{22, 80, 81}; ce dernier, par l'intermédiaire de p21, est capable de bloquer le cycle en phase G1/S et en phase G2^{82, 83}. Enfin la protéine BRCA1 peut être activée par ATM et arrêter le cycle en phase S⁸⁴.

Le deuxième mécanisme permettant d'éviter l'apparition de dommages durant le cycle cellulaire est basé sur une régulation des protéines de réparation en fonction des phases du cycle. Ce mécanisme permet ainsi à la cellule d'augmenter ses capacités de réparation de l'ADN de manière à les adapter aux besoins du cycle cellulaire. A l'heure actuelle, seuls trois systèmes de réparation semblent présenter ce type de régulation. Pour la REB, il a été montré que la quantité en UNG double lors de la phase S⁴⁹, et que la quantité de transcrit *APEX1* est également multipliée par quatre au moment de la phase S⁸⁵. La réparation des mésappariements de son côté voit la quantité des protéines hMLH1 et hPMS2 augmenter entre la phase G1 et S⁸⁶. Enfin une régulation importante des protéines impliquées dans la réparation par recombinaison homologue est non homologue a été démontrée. Les activités des protéines Rad50 et DNA-PK sont plus importantes lors de la phase G1/S⁵⁶, alors que l'activité des protéines Rad52, Rad51 et Ku80 augmente lors des phases G2/M^{56, 87-89}. Pour le moment, il semblerait donc que la réparation des cassures soit le mécanisme de réparation le plus régulé au cours du cycle cellulaire. Les cassures de l'ADN pouvant survenir lors du cycle, et avoir des conséquences graves, son importance au cours de ce processus est donc capitale. Un schéma intégrant ces deux mécanismes impliqués lors du cycle cellulaire est présenté sur la **Figure 10**.

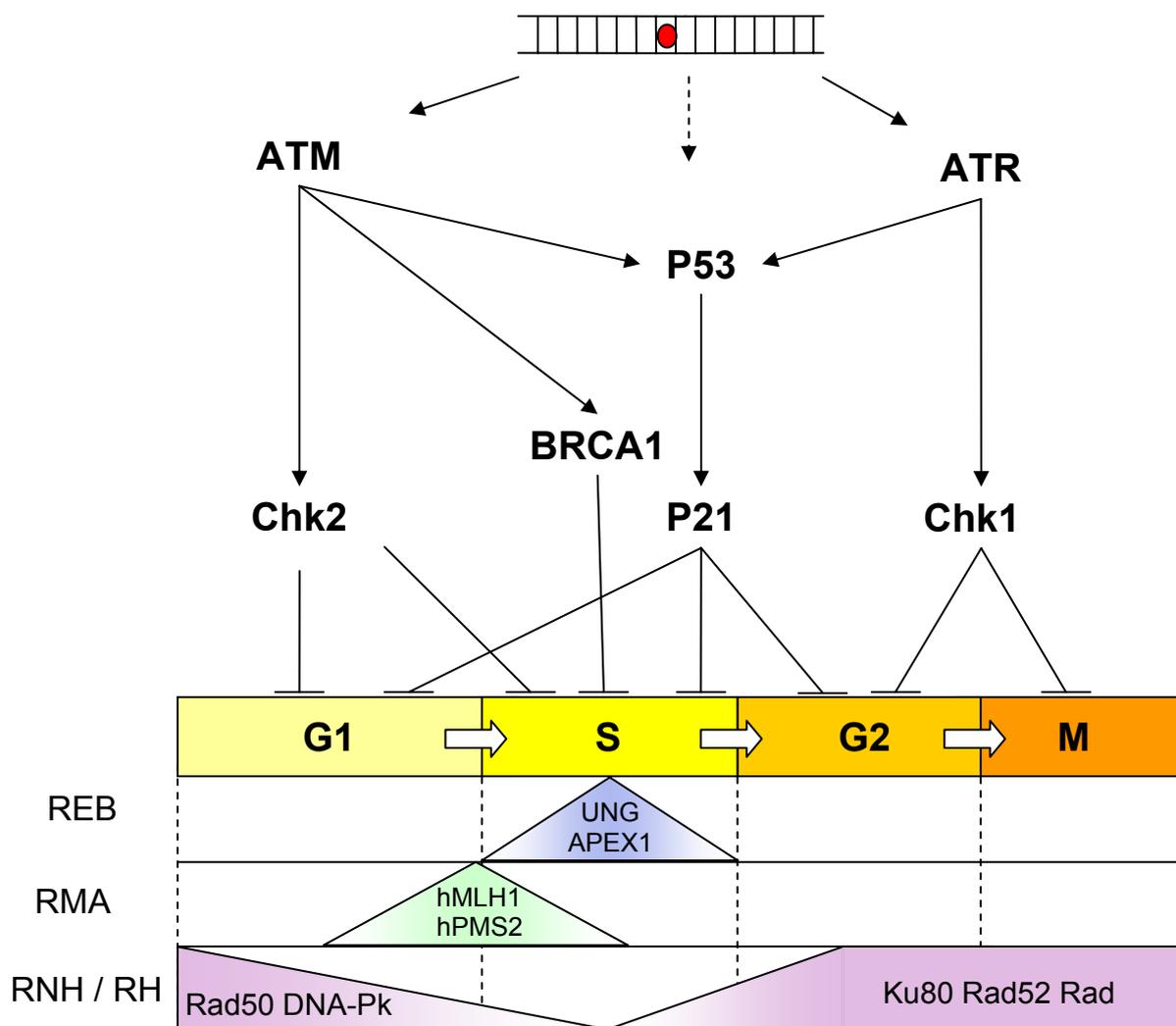


Figure 10 : Schéma présentant les différents mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire induits par la présence de dommages, ainsi que la régulation en fonction du cycle cellulaire de protéines de réparation impliquées dans la REB, la RMA, la RNH et la RH.

II) Les maladies impliquant les systèmes de réparation

Les systèmes de réparation de l'ADN, nous venons de le voir, veillent au maintien de l'intégrité du génome. Nous allons aborder dans cette partie les conséquences que peuvent avoir des défauts dans leur fonctionnement.

A) Implication des systèmes de réparation dans le processus de carcinogenèse et de résistance aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie

1) Implication de la réparation de l'ADN dans le processus de carcinogenèse

Chez tous les organismes pluricellulaires adultes, il existe un équilibre entre le nombre de cellules qui se divisent et le nombre de cellules qui meurent. Cette régulation délicate de la prolifération cellulaire permet le maintien de l'organisation structurelle et fonctionnelle des organes et par conséquent de conserver l'intégrité de l'individu. La transformation cellulaire est un phénomène qui tend à détruire cet équilibre conduisant à l'immortalisation d'une cellule et à sa multiplication clonale par des divisions non régulées. Ce processus complexe fait intervenir l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes codent pour des protéines impliquées dans différents processus cellulaires favorisant par exemple la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, mais aussi empêchant la cellule de mourir par apoptose. Les gènes suppresseurs de tumeurs, de leur côté, possèdent des activités opposées, telles que : inhiber la prolifération cellulaire, bloquer le cycle cellulaire, induire l'apoptose, et favoriser la réparation de l'ADN⁹⁰.

Dans la plupart des cas, les événements conduisant aux changements d'activité des protéines codées par des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs sont liés à des modifications du code génétique, ceci pouvant se produire de différentes façons.

Premièrement, l'apparition d'une mutation peut conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Par exemple, la protéine pRB, régulant le cycle cellulaire, est retrouvée sous une forme mutée inactive dans les cas de rétinoblastomes⁹¹. La protéine p53 est aussi sous forme mutée non active dans de très nombreux cas de cancers de la peau. Il a par exemple été montré que des « points

chauds » hautement mutables par les dommages UV induits sont présents dans le gène codant pour p53⁹².

Certaines mutations peuvent aussi conduire à l'activation de proto-oncogènes, par exemple la protéine G de signalisation Ras, où la modification de son activité GTPase induit une transduction du signal permanente⁹³. Mais, les modifications de bases ne sont pas les seuls dommages de l'ADN pouvant conduire au phénomène de cancérisation. La formation de coupures dans l'ADN peut engendrer des réarrangements chromosomiques favorisant par exemple l'échange de promoteurs. Un gène ayant subi une telle modification voit son niveau d'expression modifié. Le proto-oncogène *MYC* est très souvent activé par des réarrangements d'ADN le plaçant sous le contrôle d'un promoteur fort⁹⁴.

Il est intéressant de noter que le processus de cancérisation nécessite des mutations dans plusieurs gènes afin d'obtenir une cellule transformée. Il faut que la cellule échappe à l'apoptose (ex : inactivation de p53, expression constitutive de *hTERT*), ne régule plus son cycle cellulaire (ex : inactivation de pRB), que les voies de prolifération soient activées (ex : activation de RAS). Toutes ces modifications d'activité enzymatique nécessitent des mutations dans les gènes correspondants. La probabilité de muter un ou plusieurs de ces gènes en même temps est très faible, cependant ces multiples mutations sont bien présentes dans les cellules tumorales. Deux mécanismes peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement l'hypothèse décrite par L. A. Loeb⁹⁵ basée sur l'apparition d'une mutation primaire dans un gène des systèmes de réparation ou dans celui d'une polymérase conférant ainsi à la cellule un « phénotype mutateur » générant un grand nombre de mutations. Ce phénotype permet alors à la cellule d'acquérir toutes les mutations nécessaires à sa transformation. Une autre hypothèse avancée par B. Vogelstein⁹⁶, est basée sur une vision Darwinienne du processus de cancérisation. Selon sa théorie, des mutations aléatoires surviendraient dans le génome, parfois dans des gènes nécessaires au processus de cancérisation cellulaire. Des sélections clonales successives opéreraient alors sur ces gènes mutés en fonction de l'environnement, permettant ainsi l'émergence d'un clone tumoral. A la vue de ces deux hypothèses, où l'une donne à la réparation une place centrale et l'autre confère un rôle important à l'environnement cellulaire, on peut penser que ces deux mécanismes existent et peuvent en synergie cumulative contribuer à la transformation cellulaire (**Figure 11**).

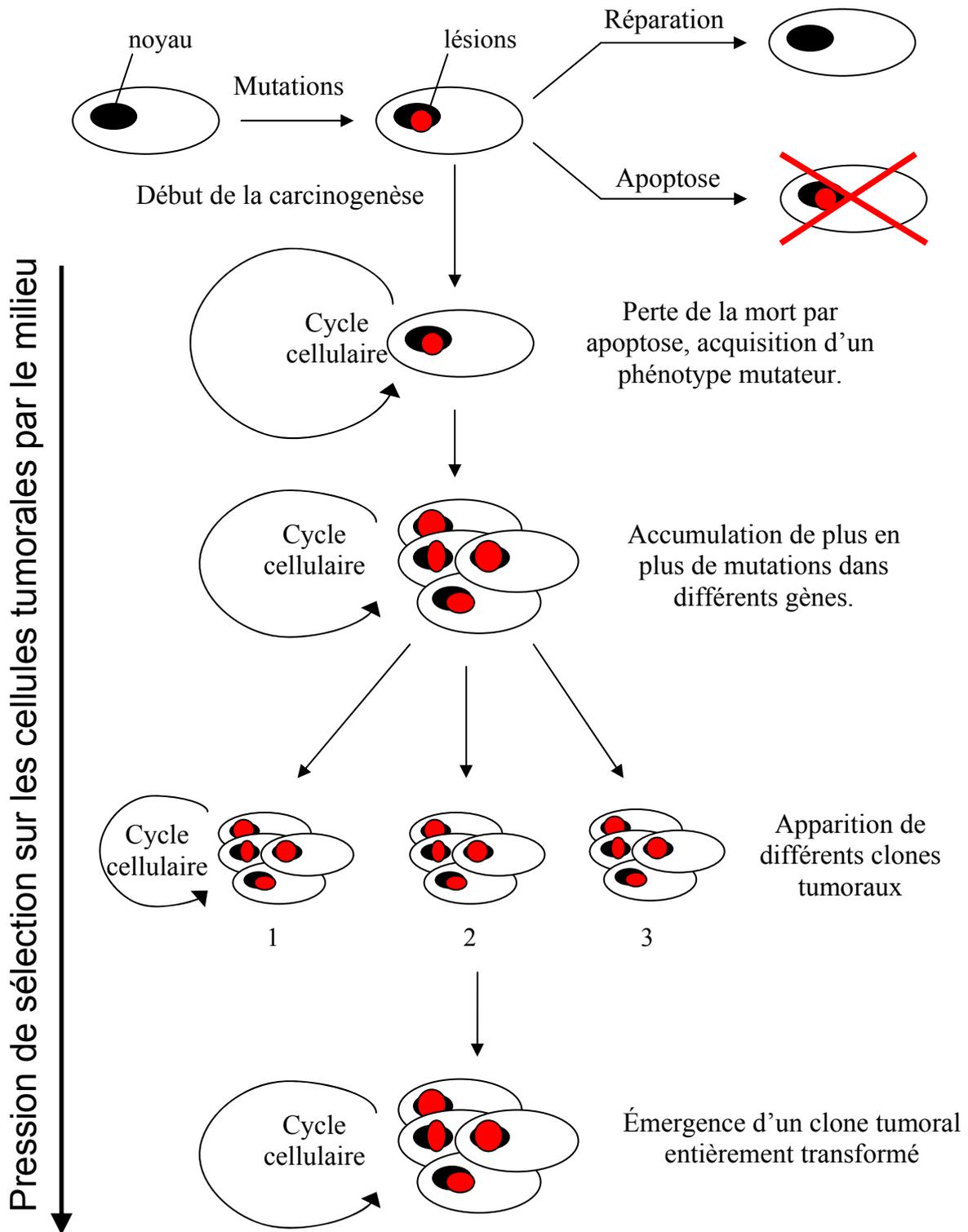


Figure 11 : Schéma bilan présentant les différentes étapes du processus de carcinogenèse.

On comprend donc toute l'importance des systèmes de réparation à travers leur double implication dans le processus de cancérisation cellulaire. En effet, ils jouent un rôle d'élément déclencheur dans le cas de dommages non réparés présents dans des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs, mais aussi d'accélérateur du processus de carcinogenèse s'ils viennent à devenir inactifs. L'aptitude qu'ont nos cellules à maintenir l'intégrité de leur génome est donc corrélée en partie à leur capacité à ne pas devenir cancéreuse.

Nous aborderons plus loin le fait que nous ne sommes pas tous égaux en terme de capacité de réparation de l'ADN, et que le polymorphisme de nos gènes de réparation fait que certains individus sont plus enclins que d'autres à développer certaines formes de cancer.

2) Implication de la réparation de l'ADN dans le phénomène de résistance au traitement par chimiothérapie et radiothérapie

a) Le traitement des cancers et la résistance au traitement

Les traitements les plus largement utilisés pour lutter contre le cancer sont les chimiothérapies, et les radiothérapies. Ces deux méthodes de traitement ont pour but, notamment, de créer des dommages dans l'ADN cellulaire. Leur concept est basé sur deux constatations. Premièrement, quand l'ADN d'une cellule est trop endommagé et qu'elle ne peut le réparer, sa division cellulaire est arrêtée et elle peut alors mourir par apoptose. La seconde constatation est que les cellules cancéreuses se divisent de manière très rapide. Si des dommages sont présents dans leur ADN, elles ont donc moins de temps pour les réparer que des cellules saines qui elles ont des divisions plus lentes.

Très tôt les oncologues ont eu l'idée, en ajustant la quantité de dommages formés et les intervalles des traitements, d'induire spécifiquement la mort des cellules tumorales en endommageant leur génome. L'utilisation de rayonnement ionisant comme les rayons X, de radio-mimétiques comme la doxorubicine, mais aussi d'agents alkylants mono ou bi fonctionnels comme le cisplatine, le cyclophosphamide, le melphalan, les nitroso-urées, ont permis et permettent toujours de traiter un grand nombre de cancers : 50% des patients atteints de cancer subiront des chimiothérapies, et 70% une radiothérapie⁹⁷. Cependant l'utilisation de ces méthodes s'est révélée dans certains cas inefficace, ceci étant dû à l'apparition de résistances lors du traitement.

L'étude de ce processus de résistance a permis de mettre en lumière son caractère multifactoriel dont la conséquence est une diminution de la réponse à la chimiothérapie ou à la radiothérapie. Nous allons brièvement aborder ces différentes voies. Tout d'abord, cette résistance au traitement peut passer par une diminution de la concentration cellulaire de la molécule thérapeutique, et ce par deux mécanismes distincts : une diminution de l'entrée de la molécule dans la cellule, ou un relargage dans le milieu extracellulaire via des transporteurs de type ABC⁹⁸. Une autre possibilité pour la cellule cancéreuse de devenir résistante à la chimiothérapie est d'inactiver la molécule chimique en la métabolisant. On peut citer deux protéines impliquées dans ce mécanisme, la glutathion-S-transférase⁹⁹⁻¹⁰¹, et la métallothionéine¹⁰² qui ont la capacité de réagir avec les agents alkylants et ainsi de les neutraliser.

En outre, ce mécanisme de résistance peut aussi passer par la perte du déclenchement de la mort cellulaire par apoptose, par exemple par la perte de l'activité de la protéine p53. Dans ce cas, les cellules ne répondent alors plus par la mort apoptotique à une présence importante de dommages dans leur ADN¹⁰³. Le dernier mécanisme cellulaire permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'effet des traitements par chimiothérapies et radiothérapies est une augmentation de leur activité de réparation de l'ADN^{3, 104}, leur conférant la capacité de corriger les dommages plus rapidement, et ce, de manière adaptée à leur cycle cellulaire. Il est important de noter que les deux premiers facteurs de résistance au traitement (une diminution de l'assimilation, et une inactivation par métabolisation du composé thérapeutique) ne sont pas en jeu dans le cas de l'utilisation de rayonnements, en effet les rayonnements accèdent directement à leur cible qu'est l'ADN.

Enfin, ces mécanismes de résistance étant indépendants les uns des autres, un effet cumulatif peut donc avoir lieu, rendant la cellule d'autant plus résistante au traitement. Ce statut de haute résistance peut être acquis par sélection clonale au cours du traitement selon le même mécanisme que celui décrit par B. Vogelstein lors du processus de carcinogenèse.

b) Les différents systèmes de réparation de l'ADN et les résistances qu'ils confèrent

Nous avons vu que les systèmes de réparation participent au processus de résistance au traitement lorsque leurs activités sont exacerbées. Nous allons maintenant aborder l'implication de chaque système de réparation dans la résistance aux différents traitements utilisés. L'inhibition des systèmes de réparation est un axe de recherche en plein essor, afin de potentialiser les traitements de chimiothérapie et radiothérapie, nous présenterons aussi les molécules développées dans ce but.

- Résistance liée à la O⁶-MGMT

Nous avons abordé le mode fonctionnement de la O⁶-MGMT dans le chapitre dédié aux systèmes de réparation. Cette protéine est spécialisée dans la réparation des bases alkylées notamment en position O⁶ de la guanine, or certains traitements par chimiothérapie sont basés sur l'alkylation des bases de l'ADN. Les dérivés de nitrosourée tels que le BCNU ou le CCNU ainsi que la dacarbazine et la procarbazine pour ne citer qu'eux, alkylent tous l'adénine en position N³ mais aussi la guanine en position N⁷ et plus faiblement en O⁶. Cependant la modification en O⁶ de la guanine est fortement mutagène¹⁰⁵. On comprend aisément l'implication de la O⁶-MGMT dans le processus de résistance à ce type de traitement. En effet, l'expression de la O⁶-MGMT se trouve augmentée dans de nombreux cas de cancer. Cette augmentation de l'expression de la O⁶-MGMT est due à une activation de son promoteur¹⁰⁶⁻¹¹¹.

Pour agir sur le niveau d'activité élevé de la O⁶-MGMT dans le but de le diminuer, des méthodes thérapeutiques ont été développées comme, par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs directs tels que la O⁶-benzylGuanine, la O⁶-benzyl-2'-deoxyguanosine, ou encore l'utilisation combinée de cisplatine, qui permet de diminuer l'expression du gène O⁶-MGMT¹⁰⁵.

- Résistance liée à la réparation par excision de base

La REB est capable de réparer les bases alkylées, notamment les alkylations en N⁷ de la guanine et N³ de l'adénine. Elle joue donc un véritable rôle de complément à l'AGT qui elle est spécifique de la position O⁶ de la guanine. Son rôle dans la résistance aux traitements à base d'agents alkylants est donc aussi important. Il a été

mis en évidence au cours d'études pré-cliniques où l'inhibition de la REB a permis d'augmenter la sensibilité aux agents alkylants^{71, 112, 113}.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour diminuer l'activité de la REB dans les cellules tumorales. Elles visent toutes des points clés du mécanisme comme le blocage de l'étape de resynthèse par la polymérase β , l'inhibition de APEX1 pour empêcher la coupure du brin d'ADN au niveau de sites abasiques, l'inactivation de la PARP en vue d'inhiber le recrutement de la polymérase β ^{104, 114}. L'inhibition d'APEX1 et de la PARP sont des axes de recherche très privilégiés car ces deux protéines sont aussi impliquées dans la réparation des cassures de brins, et pourraient donc aussi potentialiser la radiothérapie. Des inhibiteurs existent concernant ces protéines, le Lucanthone pour APEX1, l'acide pamoïque pour la polymérase β , l'AG014699[®] le INO-1001[®] et le CEP-6800[®] pour la PARP¹⁰⁴.

- Résistance liée à la réparation par excision de nucléotides

La réparation par excision de nucléotides est impliquée à deux niveaux dans la résistance aux chimiothérapies à base de cisplatine. Le cisplatine peut conduire à la formation de plusieurs types d'adduits sur l'ADN, comme des pontages inter-brins ainsi que des pontages intra-brin. Les pontages inter-brins ne sont cependant pas les adduits majoritaires générés par le cisplatine : environ 2% contre 98% d'adduits intra-brin¹¹⁵. L'effet des pontages inter-brin est cependant très important car ils bloquent physiquement l'ouverture de l'ADN empêchant ainsi la réplication et la transcription. La REN est impliquée à la fois dans la réparation des pontages inter et intra-brin. Lors de la réparation des pontages inter-brins, elle réalise l'étape d'excision uniquement, la suite de la réparation étant prise en charge par soit la RNH, soit la RH³. La réparation des pontages intra-brin, quant à elle, est entièrement prise en charge par la REN¹¹⁶. Dans les cas de résistance au traitement par le cisplatine, la protéine ERCC1 se retrouve, dans la plupart des cas, surexprimée. ERCC1 est impliquée dans l'étape limitante d'excision lors de la REN^{117, 118}. Elle serait donc autant impliquée dans la résistance aux pontages inter-brins que intra-brin.

La réparation par excision de nucléotides peut être aussi responsable de la résistance à certains agents alkylants monofonctionnels. En effet, plus la taille du groupe alkylé devient importante et déforme la structure de la double hélice, moins

elle est réparée par la O⁶-MGMT ou la REB, et plus sa réparation est alors prise en charge par la REN¹¹⁸.

Il est intéressant de constater qu'aucun inhibiteur de la REN n'a encore pu être développé, et ce malgré son importance dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques¹⁰⁴.

- Résistance liée à la recombinaison non homologue (RNH)

La RNH est tout d'abord impliquée dans des phénomènes de résistance lors des traitements par radiothérapie. En effet, ce type de traitement crée des cassures double brin dans la double hélice d'ADN qui sont prises en charge dans la cellule par la RNH. Une surexpression de DNA-PKcs a été démontrée dans des cas de patients présentant des résistances au traitement par radiothérapie¹¹⁹.

La RNH est aussi impliquée dans la résistance aux agents alkylants bifonctionnels, tels que les dérivés du gaz moutarde ou le cisplatine. Ces composés conduisent, comme nous l'avons vu, à la formation de pontages inter-brins dans l'ADN. Il a été démontré que la réparation de ces pontages nécessite la RNH. En effet, des cellules mutées pour les protéines Ku70, Ku86, DNA-PKcs, XRCC4 présentent une hypersensibilité à divers agents pontants de l'ADN³.

Cette double implication de la RNH en fait une cible de choix pour potentialiser les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. Plusieurs inhibiteurs de DNA-PKcs ont notamment vu le jour : le IC87361[®], le NU7026[®], le Vanillin[®], le SU11752[®], la Salvicine[®].

- Résistance liée à la recombinaison homologue (RH)

La recombinaison homologue, contrairement à la RNH, nécessite la présence d'une chromatide sœur pour réaliser la réparation de cassures dans l'ADN. Dans les cellules saines, l'implication de la recombinaison homologue dans la réparation des cassures double brin est donc très restreinte car une grande partie des cellules ne se divisent pas ou peu. Au contraire, dans le cas de cellules cancéreuses, nous sommes dans un tout autre schéma, puisque les phases de divisions s'enchaînent rapidement. La recombinaison homologue est donc beaucoup plus sollicitée.

Ce mécanisme de réparation est impliqué au même titre que la RNH dans la résistance aux traitements induisant des cassures dans l'ADN, à savoir les

radiothérapies et certaine chimiothérapies. Il a en effet été démontré que la recombinaison homologue intervient dans la réparation des pontages inter-brins ; au cours de cette étape, elle joue le même rôle que la RNH³. Dans les cas de résistance au traitement à base de cisplatine, plusieurs protéines appartenant à la réparation par recombinaison homologue ont été mises en évidence, notamment Rad51, Rad51B, Xrcc2 et Xrcc3¹²⁰⁻¹²³, suggérant ainsi l'implication de ce mécanisme. Enfin, la recombinaison homologue est aussi en jeu lors de la réparation des cassures double brins générées par les rayonnements lors des radiothérapies. Cette idée a notamment été confortée lors d'expériences menées sur des souris où la surexpression de Rad51 induit une radiorésistance, et au contraire une suppression du gène *Rad54* conduit à une hypersensibilité aux rayonnements ionisants^{124, 125}.

Tout comme la RNH, la double implication de la réparation par recombinaison homologue dans le processus de résistance au traitement de chimio et radiothérapie fait de ce mécanisme une cible intéressante. Un seul inhibiteur a pour le moment été découvert, il s'agit du KU-55933[®], qui a pour cible ATM. Tout comme ATR, ATM est un senseur de dommage capable d'activer des voies de signalisation agissant notamment sur le cycle cellulaire et sur la recombinaison homologue.

- **Résistance liée à la réparation des mésappariements**

Le mécanisme de réparation des mésappariements est capable de réparer les boucles d'insertion et de délétion ainsi que les mésappariements de bases. Il semblerait qu'il possède aussi la capacité de réparer les pontages intra-brin causés par le cisplatine^{126, 127}. Cette capacité de réparer les dommages formés par le cisplatine pourrait permettre, à travers une surexpression des gènes de ce système de réparation, d'acquérir une résistance à ce composé, or ce n'est pourtant pas le cas. En effet le système de réparation des mésappariements confère à la cellule une résistance au traitement de chimiothérapie par perte d'activité des gènes *MSH2* ou *MLH1*^{118, 128}. Cette particularité vient du fait que ce système, en plus de son activité de réparation, est aussi capable d'induire l'apoptose si un trop grand nombre de dommages causés, par exemple, par le cisplatine sont présents dans l'ADN¹²⁹. Une cellule ayant perdu ce système de réparation peut donc devenir résistante au cisplatine, mais cette résistance est aussi étendue à d'autres agents alkylants¹³⁰⁻¹³². Il est à noter que cette perte d'activité de réparation confère en plus à la cellule un phénotype lui permettant d'accumuler des mutations favorisant ainsi le processus de carcinogenèse ; en effet,

elle n'est plus en mesure de réparer les erreurs post réplicationnelles normalement prises en charge par ce système de réparation.

Etant données les caractéristiques de cette résistance, aucune molécule permettant de restaurer cette activité de réparation n'a pour le moment été découverte.

3) Effets secondaire liés aux traitements par chimiothérapie et radiothérapie

Les chimiothérapies et radiothérapies sont des traitements qui provoquent sur l'organisme du patient un stress important et peuvent avoir des conséquences à court et long terme graves.

a) Les cancers secondaires

Les cancers secondaires sont une complication grave pouvant survenir après une chimiothérapie ou une radiothérapies. Ces traitements peuvent avoir chez certains patients un effet carcinogène conduisant à l'apparition de tumeurs secondaires solides mais aussi et surtout hématologiques¹³³. Un lien direct a pu être démontré entre certains traitements par chimiothérapie et l'apparition de cancers secondaires, par exemple lors de traitement de leucémies par des agents alkylants et lors de traitements de cancers de la vessie avec des cyclophosphamides¹³⁴. Les cancers hématologiques secondaires les plus souvent décrits sont des leucémies aigües, des lymphomes non-Hodgkiniens, des myelodysplasies¹³⁵⁻¹³⁹. Il semblerait que le risque maximal de cancer secondaire leucémique se situe dans une période de 5 à 10 ans après le début du traitement chimiothérapeutique, et qu'il diminue ensuite. Le suivi des patients est donc très important¹³⁴.

Cette susceptibilité à développer des cancers secondaires présentés par une partie des patients, pourrait dans certains cas être liée à leur capacité de réparation de l'ADN. En effet, un patient présentant des capacités de réparation de l'ADN inférieures à celles généralement rencontrées dans la population pourrait, s'il subit une chimiothérapie ou une radiothérapie conventionnelle, accumuler des dommages dans ces cellules saines conduisant à l'apparition de mutations carcinogènes.

b) Hypersensibilité aux traitements

L'hypersensibilité est un autre effet secondaire des traitements par chimiothérapie et radiothérapie. Dans le cas de chimiothérapies cette hypersensibilité se traduit par des réactions cutanées telles que l'apparition de rougeurs, des crises urticaires, des troubles respiratoires et cardiovasculaires (bronchospasmes, hypotension)¹⁴⁰. Dans le cas de l'utilisation de carboplatine, des problèmes d'hypersensibilité apparaissent chez 1% des patients recevant moins de six cures de carboplatine, et grimpe à 27% pour les patients subissant plus de sept cures¹⁴¹. Des cas d'hypersensibilité aux radiothérapies existent aussi, ils concernent à peu près 5% des patients¹⁴². Lors de traitements de cancer du sein, par exemple, les symptômes peuvent être cutanés : des érythèmes, des oedèmes, des desquamations. Les effets à plus long terme sont des fibroses et des télangiectasies¹⁴³.

La conséquence des hypersensibilités sévères liées aux chimiothérapies et aux radiothérapies est de conduire à l'arrêt du traitement. Pour pallier à ce problème, des protocoles de désensibilisation ont été testés, et se sont révélés efficaces dans certains cas de traitement par chimiothérapie¹⁴⁰. L'utilisation d'anti-histaminiques et de corticoïdes a aussi permis de diminuer les problèmes d'hypersensibilité¹⁴⁰, car elle est en partie liée à un phénomène allergique¹⁴⁴. Toutefois de récents travaux tendent à montrer que, au moins pour l'hypersensibilité liée aux radiothérapies, les systèmes de réparation pourraient être impliqués dans ce phénomène. En effet certains polymorphismes des gènes XRCC1, ATM semblent favoriser l'hypersensibilité, il a aussi été montré que la protéine Rad50 pourrait être impliquée dans ce phénomène^{142, 143}. Les capacités de réparation des patients pourraient aussi, tout comme dans le cas des cancers secondaires, être un facteur contribuant à l'apparition d'hypersensibilités.

4) Conclusion

Les mécanismes de réparation de l'ADN jouent un rôle important dans le processus de cancérisation et de résistance aux traitements par chimio et radiothérapie. Ils pourraient aussi jouer un rôle dans l'apparition de cancers secondaires et dans l'hypersensibilité aux traitements. Cette ambivalence les fait apparaître comme un véritable « couteau à double tranchant » pour la cellule. Ainsi, si un niveau de réparation élevé permet d'éviter l'accumulation de dommages dans des gènes

impliqués dans le processus de carcinogenèse, il peut aussi être responsable d'une résistance aux traitements. A l'inverse, un niveau d'activité de réparation faible pourrait être favorable au processus de carcinogenèse. Il favoriserait l'efficacité des traitements de chimiothérapie et radiothérapie, mais pourrait être en partie responsable de l'induction des cancers secondaires ou des réactions d'hypersensibilité. Un équilibre délicat existe donc entre le niveau de réparation de nos cellules, la quantité de dommages auxquels elles ont à faire face, et le processus de carcinogenèse.

B) Les maladies génétiques liées à des gènes impliqués dans la réparation

Un défaut dans les mécanismes de réparation peut conduire à un processus de cancérisation. Nous allons voir que la plupart des maladies génétiques portant sur des gènes de réparation conduisent au développement de cancers ou dans certains cas à des dégénérescences neuronales. Nous aborderons les maladies génétiques liées spécifiquement à des défauts dans les gènes de réparation, nous ne parlerons pas ou très succinctement des maladies génétiques liées à des défauts de la régulation des activités de réparation portées par exemple sur les gènes *ATM* ou *BRCA*.

1) Xeroderma pigmentosum

Xeroderma pigmentosum est une maladie génétique dont le premier cas a été décrit par le dermatologue Autrichien Ferdinand Ritter von Hebra en 1870¹⁴⁵. Il a donné le nom de *Xeroderma* à cette maladie, ce mot latin signifiant littéralement « peau en parchemin ». Le terme *pigmentosum* fut rajouté plus tard pour souligner les problèmes importants de pigmentation dont souffrent les personnes atteintes. Il faudra attendre 1968 pour que les scientifiques s'intéressent à cette maladie, et cette rencontre est en partie due au fruit du hasard. En effet, J.E. Cleaver, qui travaillait alors sur la réparation de l'ADN, cherchait désespérément à obtenir des mutants afin de réaliser des expériences de complémentations et ainsi valider ses travaux sur la REN. C'est en parcourant un journal local que son attention fut attirée par un article traitant de la maladie *Xeroderma pigmentosum*, la décrivant comme une maladie héréditaire prédisposant au cancer induit par le soleil. Il eut alors rapidement l'intuition que cette maladie devait être liée à une déficience des systèmes de réparation, il réussit à obtenir des biopsies de peau de patients, et il montra que leurs fibroblastes présentaient un

défaut de réparation de l'ADN après une exposition aux UV. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie pouvaient alors débiter.

a) Les bases moléculaires du *Xeroderma pigmentosum*

Xeroderma pigmentosum est une maladie autosomale récessive et les gènes codant pour les protéines XP sont tous sur des loci appartenant à des chromosomes différents (**Tableau 3**). Les travaux sur *Xeroderma pigmentosum*, notamment ceux de J.E. Cleaver, ont permis de mettre en évidence sept groupes de complémentation : XP-A, XP-B, XP-C, XP-D, XP-E, XP-F et XP-G. Un huitième groupe XP-V a par la suite été découvert.

<i>Gène XP</i>	<i>Locus</i>
<i>XPA</i>	9q22
<i>XPB</i>	2q14
<i>XPC</i>	3p25
<i>XPD</i>	19q13
<i>XPE</i>	11p11
<i>XPF</i>	16p13
<i>XPG</i>	13q33
<i>XPV</i>	6p21

Tableau 3 : Tableau présentant les différents loci des gènes XP

Les groupes de complémentation de XP-A à XP-G correspondent tous à des protéines impliquées dans la REN auxquelles ils ont donné leurs noms (XPA, XPB, etc). Les personnes porteuses de mutations pour l'un de ces gènes sont donc déficientes pour le système de REN impliqué dans la réparation globale du génome. Ceci a été démontré par la faible capacité qu'ont leurs fibroblastes à incorporer de la thymidine tritiée après une irradiation UV¹. L'étude des différentes mutations et les phénotypes qui en découlent ont permis de mettre en évidence que plusieurs facteurs peuvent moduler la sévérité des cas de *Xeroderma pigmentosum*. Premièrement entre en jeu la conséquence que va avoir la mutation sur la protéine XP, par exemple l'apparition d'un codon stop, un décalage du cadre de lecture, ou une modification de l'épissage de son ARNm peuvent conduire à des cas particulièrement sévères. Une mutation faux-sens peut donner un phénotype moins prononcé. Le deuxième facteur influençant le degré de sévérité est la fonction du gène *XP* muté. Par exemple, des mutations dans le gène *XPE* conduisent à des symptômes moins sévères que des

mutations dans le gène *XPC* qui est essentiel au recrutement des protéines de la REN¹⁴⁶.

Le huitième groupe de complémentation quant à lui est nommé XP-V, le V étant l'abréviation du mot variant. Le gène *XPV* n'est pas impliqué dans la réparation par excision de nucléotides, mais dans la synthèse translésionnelle des dommages UV induits et code pour la polymérase η . Les cellules déficientes pour la protéine XPV ne sont donc plus capables de réaliser une synthèse translésionnelle non mutagène des dommages UV induits.

b) Les caractéristiques cliniques

Les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* présentent de nombreux troubles cutanés, comme des défauts de pigmentation, certaines zones sont dépigmentées alors que d'autres sont hyperpigmentées. Leur peau est caractérisée par un vieillissement accéléré, et présente un nombre très important de taches de rousseur. Le défaut de réparation des dommages UV que présentent les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum* les rend particulièrement prédisposés aux cancers cutanés. Leur risque de développer un mélanome est 2000 fois supérieure à celle d'un individu sain ; pour les autres types de cancer cutané, leur prédisposition est 4800 fois supérieure à la normale¹⁴⁷. Cette prédisposition aux cancers cutanés se manifeste précocement en moyenne à l'âge de 8 ans chez les patients XP contre 50-60 ans dans la population¹⁴⁷. La prédisposition à d'autres types de cancer devrait elle aussi théoriquement être supérieure à celle d'individus sains, cependant l'espérance de vie courte ainsi que le faible nombre de malades ne permet pas de mettre en évidence ce phénomène¹.

Outre les problèmes cutanés, les personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum* présentent aussi des problèmes oculaires au niveau des paupières, de la cornée, mais aussi buccaux au niveau de la langue et des lèvres, ces zones étant particulièrement sensibles au rayonnement UV¹. On comprend alors que la seule indication pour les personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum* est une absence totale d'exposition au rayonnement UV.

Enfin, la dernière caractéristique clinique présentée par 20 à 30% des personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum* est une dégénérescence neurologique caractérisée par une mort neuronale prématurée, un retard mental et une microcéphalie¹⁴⁶. Ces problèmes neurologiques pourraient être expliqués par une

accumulation de dommages dans les neurones qui les conduirait à la mort par apoptose. En effet, les neurones ayant un métabolisme élevé, produisent beaucoup d'espèces réactives de l'oxygène, leur ADN est par conséquent d'autant plus endommagé. Une implication de la REN dans la réparation des dommages oxydatifs, pourrait expliquer pourquoi des personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum* présentent une dégénérescence neurologique et renforcerait l'idée d'une complémentarité des systèmes de réparation^{66, 148, 149}.

c) Prévalence démographique et géographique

Des cas de *Xeroderma pigmentosum* sont présents dans le monde entier, mais l'incidence de cette maladie varie en fonction des populations. Elle est de 1 pour 250 000 en Europe et aux Etats Unis, alors qu'elle atteint 1 pour 40 000 au Japon, une incidence élevée et aussi présente en Egypte¹. Mais cette répartition est également dépendante du type de gènes XP mutés, par exemple la mutation la plus fréquente au Japon porte sur le gène *XPA*, alors qu'en Europe ce sont les gènes *XPC* et *XPD* qui sont les plus touchés (**Tableau 4**). Les taux de mutation sur *XPV* au Japon et en Europe sont comparables¹.

<i>Population</i>	<i>XP-A</i>	<i>XP-B</i>	<i>XP-C</i>	<i>XP-D</i>	<i>XP-E</i>	<i>XP-F</i>	<i>XP-G</i>	<i>XP-V</i>
Amérique du Nord	9	1	11	8	0	0	0	5
Europe	12	0	28	17	2	0	2	19
Japon	30	0	5	4	3	11	1	21
Egypte	7	0	12	0	0	0	0	5
Autre	5	0	6	0	0	0	0	4
Total	63	1	62	29	5	11	3	54

Tableau 4 : Tableau présentant le nombre cas de personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum*, en fonction du type de gène muté et de la localisation géographique.

2) Le syndrome de Cockayne

Le syndrome de Cockayne est une maladie très rare qui a été décrite pour la première fois au milieu des années trente par le pédiatre Edward Alfred Cockayne, qui donna son nom à ce syndrome.

a) Les bases moléculaires du syndrome de Cockayne (CS)

Ce syndrome est une maladie autosomale récessive. Deux groupes de complémentations ont été découverts, CS-A et CS-B, et ont donné leur nom aux protéines CSA et CSB. 80% des personnes touchées sont mutées pour CSB, les 20% restant le sont pour CSA¹⁵⁰. Ces deux protéines sont impliquées dans le recrutement des protéines de la REN lors de la réparation couplée à la transcription. Les personnes atteintes du syndrome de Cockayne sont donc déficientes en réparation couplée à la transcription, mais présentent une réparation globale du génome par la REN parfaitement fonctionnelle. Cette déficience dans la réparation couplée à la transcription a été déduite de l'observation du phénotype des cellules de patients CS, qui voient leur synthèse d'ARN très fortement inhibée à la suite d'une irradiation UV. Cette caractéristique est utilisée lors des tests permettant de diagnostiquer cette maladie. Il est intéressant de noter qu'il n'apparaît pas de différences au niveau clinique ou cellulaire entre l'un ou l'autre des deux groupes de complémentation, et que les études génétiques menées sur les patients n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation entre le type de mutation et le degré de sévérité de la maladie¹⁴⁷.

b) Caractéristiques cliniques

Les personnes atteintes du syndrome de Cockayne présentent une petite taille, leur croissance étant souvent arrêtée à un âge très précoce, et elles souffrent de rachitisme. Elles sont aussi victimes d'un vieillissement prématuré et présentent des membres, bras et jambes, disproportionnés par rapport à leur tronc, et un visage aux traits typiques : grandes oreilles, grand nez, yeux renfoncés¹⁵¹. Certains d'entre eux souffrent d'anomalie oculaire, et peuvent développer des cataractes avant l'âge de trois ans. Contrairement aux patients XP, ils ne présentent pas de prédispositions aux cancers cutanés ni à d'autres types de cancers, et ce, bien que leur peau soit photosensible. A l'inverse des patients XP, les personnes atteintes par le syndrome de Cockayne présentent une dégénérescence neurologique causée par une démyélinisation qui réduit leur espérance de vie à douze ans. Cette dégénérescence serait causée par une accumulation de dommages oxydatifs dans l'ADN des neurones¹⁵², comme c'est le cas par exemple chez certains patients XP. Le fait que

tous les patients CS aient des troubles neuronaux suggère que la réparation couplée à la transcription pourrait être impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs. Cette constatation alimente donc les interrogations quant à l'existence d'un lien entre la REB et la réparation couplée à la transcription, mais aussi d'une possible réparation des dommages oxydatifs par la REN. Cependant, une autre théorie pourrait expliquer cette dégénérescence des neurones par une accumulation de dommages. Elle suppose qu'une diminution de la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN serait causée par la présence importante de lésions. Il en résulterait alors une baisse du niveau de transcription des gènes de réparation touchés, et par conséquent une baisse de l'activité de réparation de l'ADN conduisant à l'accumulation de dommages¹.

c) Prévalence démographique et géographique

Plus de 180 cas ont été répertoriés dans le monde jusqu'à ce jour, aucune incidence précise n'a pu être déterminée, mais il semblerait qu'elle soit nettement inférieure à 1 cas pour 100 000 personnes. Il ne semble pas y avoir comme pour le *Xeroderma pigmentosum* une prévalence géographique liée à une population particulière^{151, 153, 154}

d) Le cas particulier du Syndrome de Cockayne combiné au *Xeroderma pigmentosum* (XP/CS)

Certains cas rares de personnes présentant un Syndrome de Cockayne combiné au *Xeroderma pigmentosum* ont été recensés. Dans le cas du XP/CS les protéines mutées sont soit XPD, XPB ou XPG¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Les protéines XPD et XPB, nous l'avons vu, font partie du complexe TFIIH impliqué dans la transcription ainsi que dans la REN ; XPG quant à elle est une des deux endonucléases du système de réparation par excision de nucléotides. Les personnes atteintes possèdent les caractéristiques cliniques du Syndrome de Cockayne, mais aussi une prédisposition aux cancers cutanés comme les patients atteints de *Xeroderma pigmentosum*¹.

3) **Trichothiodystrophie (TTD)**

La trichothiodystrophie est une maladie génétique très rare (sa prévalence n'est pas connue), elle a été décrite pour la première fois en 1968 par R. J. Pollitt¹⁵⁹, le nom trichothiodystrophie ne sera attribué que plus tard¹⁶⁰.

a) **Base moléculaire de la Trichothiodystrophie (TTD)**

La trichothiodystrophie, tout comme le Syndrome de Cockayne et le *Xeroderma pigmentosum*, est une maladie autosomale récessive. Deux groupes de complémentation existent, il s'agit de XP-B et XP-D. Les mutations portent donc sur les mêmes gènes que dans le Syndrome de Cockayne combiné et le *Xeroderma pigmentosum*, cependant le phénotype des patients atteints de trichothiodystrophie est différent. Les cellules de malades présentent un défaut dans leurs activités transcriptionnelles, le complexe TFIIH étant déstabilisé par la protéine mutée^{161, 162}. De plus, environ 50% des personnes souffrant de cette maladie présentent aussi un niveau de réparation par excision de nucléotides réduit¹.

b) **Caractéristiques cliniques**

Les personnes atteintes de trichothiodystrophie présentent une petite stature, un retard mental, une peau ichthyotique, et des traits de visage spécifiques. Ils possèdent aussi des cheveux très cassants à cause d'une déficience en protéines de matrice riches en cystéines. Leurs cheveux présentent la particularité d'être « rayés » lorsqu'on les observe sous une lumière polarisée. Enfin, une partie des malades présente une photosensibilité accrue due à une déficience dans la REN^{163, 164}.

Certains cas de personnes présentant une trichothiodystrophie combinée avec un *Xeroderma pigmentosum* ont été recensés¹. L'existence de cas de XP/TTD ainsi que de XP/CS montre toute la subtilité des maladies génétiques XP, CS et TTD. En effet, si ces trois maladies peuvent être causées par des modifications dans les mêmes protéines XPB et XPD, il n'en reste pas moins que les phénotypes qui en résultent sont différents. Les protéines XPB et XPD sont impliquées, nous l'avons vu, dans au moins deux mécanismes cellulaires qui sont la réparation et la transcription ; les mutations

touchant ces gènes peuvent donc avoir différents effets et causer différents phénotypes en fonction de leur type et de leur position.

Soit la mutation touche l'une ou l'autre des fonctions de XPB et XPD, et l'on obtient alors l'un des trois phénotypes XP, CS ou TTD, soit la mutation affecte plusieurs fonctions et il en résulte un phénotype combiné XP/CS et XP/TTD. A cela vient s'ajouter toute la complexité de l'hétérogénéité allélique. En effet, il ne faut pas perdre de vue que le phénotype est lié à l'expression de deux gènes mutés, tous deux portant une modification dans la même protéine. Ces deux modifications ne sont pas forcément situées au même endroit dans la protéine et ne sont pas non plus de même type. La combinaison de l'expression des deux protéines modifiées influence aussi directement le phénotype.

Les mécanismes moléculaires des maladies génétiques liées aux protéines XPB et XPD sont donc très complexes, et soulignent toute la complexité des interactions protéiques au sein de TFIIH et leurs différentes conséquences.

4) Le cancer du colon héréditaire non-polyposique (CCHNP)

Le cancer du colon héréditaire non-polyposique ou syndrome de Lynch a été décrit pour la première fois par Aldred Warthin en 1913. Ce syndrome est hérité de manière autosomale dominante et représente de 1 à 3% des cancers colorectaux^{165, 166}. 80% des personnes porteuses de cette maladie génétique développent un cancer du colon précoce¹⁶⁷, l'âge moyen du diagnostic étant de 45 ans. La maladie se caractérise par l'apparition d'un nombre fini d'adénomes au niveau du colon, qui peuvent devenir rapidement malins¹⁶⁸. Des tumeurs extracoliques peuvent aussi se former au niveau de l'utérus, de l'estomac, des ovaires, des reins, et du petit intestin. Plus rarement, elles peuvent apparaître au niveau du cerveau (glioblastome), ou de la peau. La maladie doit donc être diagnostiquée très tôt afin de surveiller les patients et pouvoir ainsi retirer, s'il le faut, les adénomes rapidement¹⁶⁹.

Cette maladie génétique est causée par une mutation dans les gènes du système de réparation des mésappariements. Dans 90% des cas ce sont les gènes *hMSH2* ou *hMLH1* qui sont mutés. Les mutations portant sur *hPMS1*, *hMSH6*, *hPMS1* font partie des 10% restant¹⁷⁰. Les personnes atteintes par cette maladie sont hétérozygotes pour le gène muté. Le système de réparation des mésappariements n'est donc plus

fonctionnel uniquement lorsque l'allèle sauvage est inactivé. La perte d'activité de l'allèle sauvage et le fait qu'il soit localisé spécifiquement dans le colon n'ont pas encore été élucidés. Les cellules de l'épithélium colorectal devenues déficientes en réparation des mésappariements acquièrent alors un statut mutateur générant une forte instabilité génomique, la cellule n'étant plus capable de corriger les erreurs introduites lors des réplifications. Ces cellules sont alors caractérisées par une fréquence élevée de microsatellites instables. Les microsatellites sont des séquences d'ADN composées de répétitions de di-nucléotides. Ces microsatellites sont une source importante de formation de boucles d'insertion ou de délétion lors de la réplication. Dans le cas du CCHNP, ces boucles ne sont pas réparées, et donc la taille et la localisation des microsatellites ne sont plus fixes. Cette caractéristique est un des facteurs utilisés pour diagnostiquer les cas de CCHNP, avec aussi la réalisation d'un arbre phylogénétique afin d'étudier l'apparition et la distribution de la maladie dans la famille.

5) Réparation de l'ADN et polymorphisme génétique

Dans ce dernier sous chapitre, nous allons aborder le polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN et leur implication dans la prédisposition au cancer. Le polymorphisme génétique correspond aux différents allèles d'un gène dont la représentation dans une population d'individus est supérieure à 1%. Il résulte en partie de micro variations de séquences qui existent pour un même gène donné. Les variations présentes dans nos gènes peuvent avoir des conséquences sur la fonctionnalité des protéines. En effet, ces variations de séquences peuvent porter sur le site actif d'une protéine et ainsi agir sur son activité, mais elles peuvent également porter sur des motifs d'interaction avec l'ADN, ou d'interactions avec d'autres protéines. Ainsi le pool de gènes codant pour les protéines de réparation que nous possédons est spécifique à chaque être humain, les activités de ces protéines font partie de notre phénotype au même titre que la couleur de nos yeux, de nos cheveux. Nous ne sommes donc pas tous égaux en terme d'activité enzymatique de réparation.

C'est de ces constatations qu'est née l'idée que les variations polymorphiques conduisant à des protéines ayant une activité de réparation de l'ADN plus faible que la normale pourraient prédisposer au cancer¹⁷¹. Des études ont été menées pour étudier le polymorphisme des gènes impliqués dans différents systèmes de réparation et il

apparaît que des variants polymorphiques existent pour chacun d'entre eux (**Tableau 5**).

	<i>Nbre de gènes étudiés</i>	<i>Nbre de variants</i>	<i>Nbre de variants présents à une fréquence >20%</i>	<i>Nbre de variants présents à une fréquence >5%</i>	<i>Nbre de variants présents à une fréquence >2%</i>
Réparation des mésappariements	17	85	10	18	32
REB	27	126	9	19	36
REN	25	75	5	14	22
Réparation des cassures double brin	15	82	4	9	19
Polymérase translésionelles	8	58	6	16	27

Tableau 5 : Tableau illustrant le polymorphisme des gènes de réparation à travers leurs fréquences d'apparition

Il est intéressant de constater que le polymorphisme le plus répandu porte sur les gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements et de la REB. Cette représentativité s'équilibre entre les différents systèmes de réparation de l'ADN pour une fréquence d'apparition entre 5% et 2%. Enfin il semblerait que la REB présente le plus grand nombre de variants pour une fréquence d'apparition faible inférieure à 2%. Nous allons maintenant, pour chaque système de réparation, présenter l'implication du polymorphisme génétique dans la prédisposition au cancer.

a) **Polymorphisme des gènes impliqués dans la REB**

Le polymorphisme le plus étudié pour la réparation par excision de base porte sur le gène *XRCC1*, ce gène code pour la protéine XRCC1 qui a une activité centrale dans le mécanisme de la REB car elle permet de coordonner les protéines comme notamment la ligase III et la polymérase β . Ce gène possède trois variants polymorphiques Arg194Trp, Arg399Gln, Arg280His¹⁷² sur lesquels de nombreuses études ont été réalisées. Le variant Arg194Trp chez les personnes homozygotes présenterait une tendance globale à la protection contre plusieurs cancers, notamment du sein, des poumons, de la rate, et de l'estomac¹⁷³⁻¹⁷⁶. Cette protection est toutefois faible en comparaison des homozygotes Arg/Arg, les rapports de côtes (odds ratio) étant aux alentours de 0,7. Les études portant sur les homozygotes Arg194Trp ont elles aussi montré un effet faiblement protecteur contre plusieurs cancers : le mélanome¹⁷⁷, les cancers oesophagiens¹⁷⁸ et les cancers de la rate^{174, 179}. Toutefois, dans le cas de ce variant une prédisposition à certains types de cancer à aussi été mise en évidence : cancer du sein¹⁷⁸, de l'estomac¹⁸⁰, de la tête et du cou^{181, 182}. Le dernier

variant Arg280His a été moins étudié que les deux autres et surtout sur de plus petites cohortes. Il a cependant été montré que les porteurs homozygote de Arg280His étaient plus enclins à développer des cancers du poumon¹⁷⁵.

La protéine APEX1 de la réparation par excision de base possède aussi plusieurs variants, Asp148Glu, Gln51his, Ile54Val. Le variant Asp148Glu est le plus étudié des trois, son activité enzymatique a été décrite comme provoquant une hypersensibilité aux rayonnements ionisants¹⁸³. L'étude des données statistiques a permis de mettre en évidence que les porteurs homozygotes ne présentaient pas de prédisposition au cancer du poumon¹⁸⁴.

Pour finir, une étude portant sur le variant Ser326Cys du gène *OGGI* a montré que les porteurs homozygotes Cys/Cys avaient une prédisposition importante à développer des cancers du poumon¹⁸⁵.

b) Polymorphisme des gènes impliqués dans la REN

Le polymorphisme du gène *XPD* est celui qui a été le plus étudié, car ce gène présente deux variants, Asp312Asn et Lys751Gln, très largement représentés dans la population avec une fréquence d'apparition supérieure à 40%. Le polymorphisme Gln/Gln augmenterait sensiblement les risques de cancer du poumon chez les personnes non fumeuses (rapport de côtes de 2)¹⁸⁶, cependant ces résultats restent controversés car d'autres études n'ont pas trouvé d'association entre une prédisposition au cancer du poumon et les personnes homozygotes pour ce variant^{187, 188}. Les études portant sur le variant Asp312Asn ont quant à elles montré que les homozygotes Asn/Asn avaient une probabilité plus élevée de développer un cancer de la prostate ainsi qu'un cancer du poumon lié au tabagisme^{189, 190}. Un effet protecteur de cet allèle à toutefois été démontré dans le cas de cancer du poumon non à petites cellules¹⁹¹, enfin aucune prédisposition au mélanome n'a pu être mise en évidence¹⁹².

Le gène *XPC* présente un polymorphisme particulier qui a récemment été découvert. Celui-ci est dû à des insertions/délétions de poly AT (PAT)¹⁹³. Lors d'une étude, il est apparu que les personnes homozygotes *XPC*-PAT+/*XPC*-PAT+ ont un risque significativement plus élevé de développer des cancers de la tête et du cou¹⁹⁴.

Enfin il a été montré que le polymorphisme du gène *ERCCI* ne semble pas associé ni avec le mélanome ni avec des gliomes^{192, 195}, et que le polymorphisme des

zones non transcrites en 5' et 3' de *XPF* n'interviendrait pas non plus dans les cas de mélanome¹⁹².

c) Polymorphisme des gènes de la réparation des cassures double brin

Le polymorphisme lié aux gènes de réparation des cassures double brin a été moins étudié que celui des autres systèmes de réparation. Toutefois des études sur le polymorphisme de *BRCA2* et *XRCC4* ont été menées. *BRCA2* est une protéine qui régule la réparation des cassures double brin, elle possède un variant Asn372His. Les homozygotes His/His pour le variant Asn372His de *BRCA2* montrent une plus forte susceptibilité de développer des cancers du sein¹⁹⁶.

Le gène *XRCC4* quant à lui coordonne l'étape de ligation lors du processus de réparation, son variant Thr241Met a principalement été étudié, et il a été montré que les homozygotes Met/Met ont une forte prédisposition au cancer de la rate, au mélanome, et au cancer du poumon^{187, 191, 192}.

d) Conclusion sur le polymorphisme génétique

Le polymorphisme des gènes de réparation de l'ADN semble jouer un rôle dans le processus de cancérisation. Toutefois, une corrélation entre une homozygotie pour un variant et une prédisposition à un type particulier de cancer n'est pas toujours constatée. Dans certains cas il semblerait que le variant puisse prévenir l'apparition de cancer. Ces résultats soulignent la complexité des mécanismes mis en jeu dans le polymorphisme génétique. Notamment le fait que nous pouvons posséder des variants polymorphiques pour plusieurs gènes de réparation, affectant plusieurs systèmes de réparation différents, mais aussi plusieurs fois un même système de réparation. Se rajoute à cela la possibilité d'être hétérozygote. Enfin, il ne faut pas oublier les facteurs environnementaux tels que le tabagisme, la consommation d'alcool, et les habitudes alimentaires qui modulent les phénomènes de prédisposition au cancer, rendent complexe l'étude des variants polymorphiques.

C) Conclusion sur les maladies liées à la réparation de l'ADN

Les systèmes de réparation sont au cœur de plusieurs maladies aussi bien génétiques qu'acquises. Leurs conséquences sont graves, l'issue étant dans la plupart des cas une mort prématurée causée soit par un cancer soit par une dégénérescence neurologique. L'amélioration du traitement de ces maladies passe par deux axes de développement : premièrement par une meilleure compréhension du fonctionnement des mécanismes de réparation afin de mieux pouvoir agir sur ces maladies. Deuxièmement, par une meilleure capacité à évaluer les activités de réparation de l'ADN des cellules, pour permettre un diagnostic plus rapide des maladies génétiques ; mais aussi de mieux appréhender les capacités de réparation de l'ADN du patient et des cellules tumorales afin par exemple d'adapter le traitement anti-cancéreux. Dans ces deux cas, le développement d'outils capables de mesurer les activités des systèmes de réparation de l'ADN est nécessaire. Nous allons aborder dans la troisième partie les différentes techniques permettant de mesurer les activités de réparation de l'ADN.

III) Les outils permettant d'étudier la réparation de l'ADN

Nous venons de voir qu'il existe un besoin important de pouvoir quantifier les capacités de réparation de l'ADN, aussi nous allons présenter ici quelques-unes des techniques utilisées dans ce but. Les outils que nous allons présenter permettent soit d'apprécier les activités enzymatiques de réparation, soit le niveau d'ARN ou la quantité de protéine de réparation (**Figure 12**). Pour finir il faut garder à l'esprit que cette présentation n'est pas exhaustive, et que d'autres outils de mesure existent.

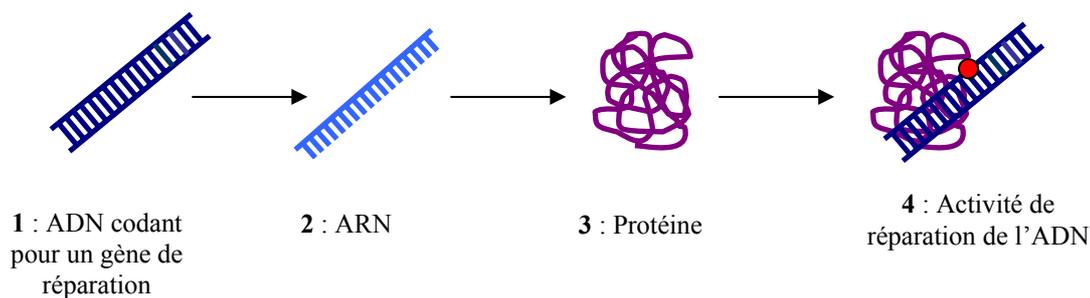


Figure 12 : Les différents niveaux d'étude de la réparation de l'ADN

A) Etude de la réparation : mesure des activités enzymatiques

1) Méthodes indirectes basées sur la mesure des lésions

Les tests que nous allons présenter dans cette partie permettent de quantifier les lésions présentes dans l'ADN. En observant la disparition des lésions, il est possible lors de cinétique de réparation de mesurer de manière indirecte les activités enzymatiques de réparation.

a) La méthode COMET

- Principe :

La méthode COMET a été décrite pour la première fois en 1984 par O. Ostling et K.J. Johanson. Depuis elle a énormément été utilisée dans de nombreux laboratoires dans le monde, son faible coût et sa simplicité la rendant attrayante.

La méthode des comètes est basée sur l'électrophorèse de l'ADN de cellules isolées dans un gel. Elle permet de mesurer les cassures double et simple brin ainsi que les sites alcali-labiles. Son principe est de faire migrer l'ADN nucléaire des cellules dans un gel en milieu alcalin et dénaturant ; si des cassures de la double hélice sont présentes, alors la forme super enroulée de l'ADN sera partiellement désorganisée. Grâce à la force exercée par le champ électrique, on aura migration de boucles d'ADN dans le gel dans le gel¹⁹⁷.

La visualisation de l'ADN au microscope à fluorescence est réalisée après un marquage avec un agent intercalent fluorescent (ex : bromure d'éthidium). S'il y a eu des cassures, il y a apparition d'une forme de comète dont la tête est composée du noyau et la queue de l'expansion des boucles d'ADN dans le gel. La taille et l'intensité de la queue de la comète sont directement proportionnelles au nombre de cassures présentes dans l'ADN nucléaire (**Figure 13**).

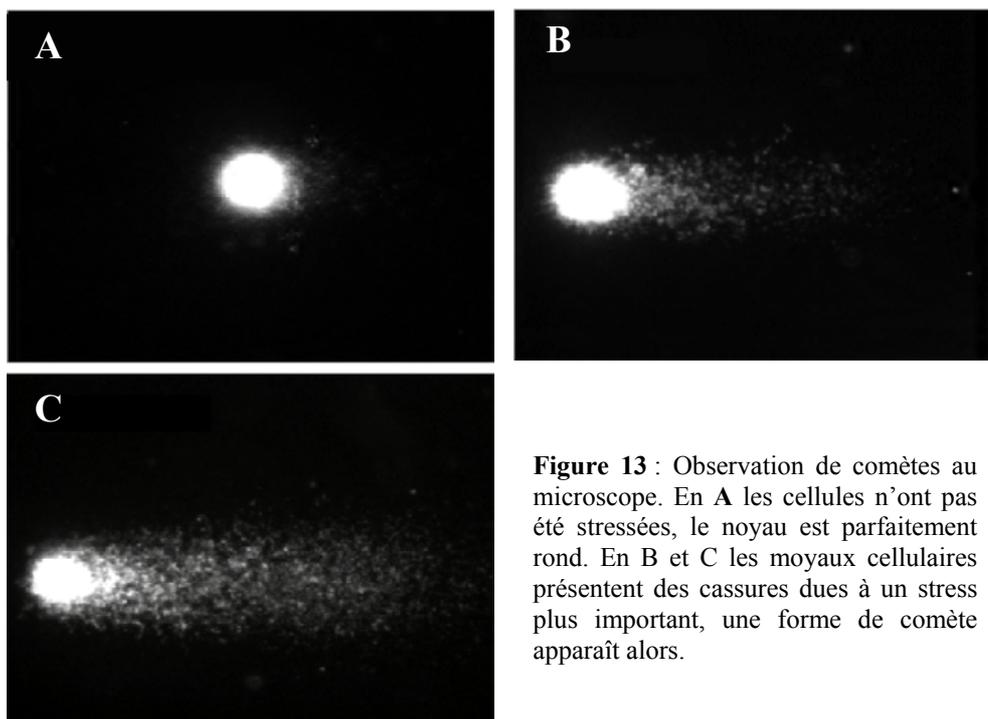


Figure 13 : Observation de comètes au microscope. En A les cellules n'ont pas été stressées, le noyau est parfaitement rond. En B et C les noyaux cellulaires présentent des cassures dues à un stress plus important, une forme de comète apparaît alors.

Il est important de noter que la méthode COMET permet aussi de mesurer les dommages qui ne sont pas de cassures de l'ADN, grâce à l'utilisation d'ADN *N*-glycosylases spécifiques des lésions étudiées. En effet une incubation des noyaux avec l'ADN *N*-glycosylase conduit à la formation de sites abasiques en lieu et place des dommages. Ces sites abasiques seront alors, grâce aux conditions spécifiques du tampon, transformés en cassures simple brin.

Plusieurs méthodes permettent d'appréhender les activités de réparation de l'ADN avec la technique COMET :

- La première méthode permet de mesurer l'activité de réparation de l'ADN *in cellulo*. Elle consiste tout d'abord à traiter les cellules avec un agent créant des dommages de l'ADN. Les cellules sont ensuite incubées pendant différents temps afin que la réparation de leur ADN puisse se dérouler. Enfin, le test COMET est réalisé. Si une activité de réparation de l'ADN a eu lieu lors de la période d'incubation, alors la taille des comètes s'en trouve réduite, et ce en fonction du temps laissé aux cellules pour réparer leur ADN.

- La deuxième méthode permet une mesure *in vitro* des capacités de réparation d'un extrait nucléaire¹⁹⁸. Elle consiste à traiter les cellules avec un agent créant des dommages de l'ADN, puis à incuber les noyaux cellulaires avec des extraits nucléaires avant de réaliser l'étape de migration par électrophorèse. Pendant l'étape d'incubation avec les extraits nucléaires, les enzymes de réparation peuvent réparer les dommages présents dans l'ADN. Durant cette réparation des incisions de la double hélice vont avoir lieu, on aura alors après migration dans le gel, une apparition de forme de comète.

- Avantages et inconvénients de la méthode COMET :

Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, très sensible et peu coûteuse, elle peut facilement être mise en place dans un laboratoire possédant un microscope. Une mesure de la réparation de l'ADN *in cellulo* est possible, ce qui permet de se rapprocher des conditions physiologiques. Enfin cette technique permet de mesurer les activités de plusieurs systèmes de réparation (recombinaison non homologue, REB, REN)

Les inconvénients résident tout d'abord dans le fait que cette méthode ne permet pas une mesure quantitative et spécifique de la réparation d'un dommage donné, l'ADN *N*-glycosylase utilisée pour former les sites abasiques pouvant être spécifique de plusieurs dommages. De plus, cette technique est longue, notamment la phase d'analyse des comètes, et ne permet pas de réaliser des expériences en haut débit.

b) L'éluion alcaline

- Principe :

L'éluion alcaline est une technique proche de la méthode COMET car elle permet de mesurer les cassures simple brin, double brin et les sites alcali-labiles en utilisant les caractéristiques d'éluion de l'ADN¹⁹⁹⁻²⁰¹. Son principe est de lyser les cellules à l'aide d'un tampon et de les déposer sur un filtre. La plupart du contenu cellulaire, excepté l'ADN, est éliminé par gravité. L'ADN va ensuite être élué à l'aide d'une solution alcaline qui est délivrée grâce à l'action d'une pompe. L'éluant est collecté sous forme de fractions. Les fragments d'ADN court sont élués les premiers alors que les fragments de grande taille sont élués en derniers. La quantité d'ADN de chaque fraction est alors quantifiée. Cette technique a permis d'étudier la réparation de différents dommages: bases alkylées²⁰², cassures double brin²⁰³, adduits cisplatine²⁰⁴, dommages oxydatifs²⁰⁵.

- Avantages et inconvénients :

Cette méthode non quantitative partage les avantages et inconvénients de la méthode COMET. Toutefois bien que l'éluion alcaline soit d'une grande sensibilité, des facteurs extrinsèques tels que le pH de lyse la composition des tampons peuvent influencer sur les résultats²⁰⁶.

c) La Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse en mode tandem (CLHP-SM/SM)

- Principe :

La CLHP-SM/SM est une technique d'analyse quantitative qui permet de détecter spécifiquement un ion en fonction de son rapport masse/charge. Cette méthode est utilisée pour quantifier les dommages présents dans de l'ADN. Le principe est de digérer l'échantillon d'ADN en nucléosides qui vont tout d'abord être séparés par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Les nucléosides sont ensuite ionisés à l'entrée du spectromètre de masse, puis le nucléoside d'intérêt est fragmenté en ions fils, seul un des ions fils sera alors quantifié (pour plus de détails se reporter à la partie matériels et méthodes). C'est la double sélection, de l'ion du nucléosides d'intérêt puis de l'ion fils qui procure à cette technique toute sa spécificité. Cette méthode est particulièrement utilisée au sein de notre laboratoire. Des études ont notamment porté sur les cinétiques de réparation de photoproduits dans les fibroblastes et les kératinocytes^{207, 208}.

- Avantages et inconvénients :

Les deux principaux avantages de cette technique sont sa grande spécificité et sa grande sensibilité et le fait qu'elle soit quantitative. La limite de détection est de l'ordre de 1 nucléotide lésé pour 10^8 nucléotides normaux. Cependant elle possède aussi des inconvénients. Premièrement l'étude de certaines lésions peut poser des problèmes lors, notamment, de la digestion de l'échantillon. En effet, il arrive parfois que des lésions rendent difficile la digestion de l'ADN, ce qui est gênant lors de l'étape d'analyse. Une autre limitation s'applique pour la quantification des bases oxydées, où, dans ce cas précis, il faut porter un grand soin à ne pas réaliser d'oxydation artéfactuelle de l'échantillon. Enfin, pour que l'analyse par CLHP-SM/SM soit quantitative il faut posséder un standard de la lésion afin de calibrer le spectromètre de masse. Il n'est pas toujours aisé de réaliser la synthèse chimique du standard.

d) La PCR médiée par ligation (PCR-ML)

- Principe :

Cette technique de PCR permet la cartographie des cassures monocaténaïres présentant un phosphate en 5'. De ce fait, tout ce qui est présent dans l'ADN et qui peut être converti en cassures monocaténaïres peut virtuellement être cartographié par la technique PCR-LM. Selon ce principe, la technique PCR-LM a été également développée pour l'étude de la cartographie et de la réparation des dommages UV induits, tels les DCP²⁰⁹, les pp(6-4)²¹⁰, mais aussi les dommages oxydatifs²¹¹.

Nous allons brièvement décrire son principe : les cellules à étudier sont irradiées en UVB afin de former des DCP dans leur génome, l'ADN nucléaire est ensuite récupéré puis mis en présence de T4 endonucléase V qui va spécifiquement couper les DCP et donc former des coupures simple brin. L'ADN est ensuite dénaturé et une PCR asymétrique est réalisée avec une amorce spécifique à la zone génomique à étudier. Un adaptateur est ensuite fixé du côté 3' du fragment d'ADN permettant ainsi de réaliser une PCR symétrique. Cette PCR n'a lieu que si un DCP était présent dans la zone génomique d'intérêt, et elle va permettre d'amplifier le fragment d'ADN. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide est ensuite réalisée, puis les sondes sont électrotransférées sur une membrane de nylon, enfin une autoradiographie est réalisée.

- Avantages et inconvénients :

La PCR-ML permet de mesurer la réparation de DCP, et ce de manière très localisée dans le génome, c'est un avantage qui n'est offert par aucune autre technique. Cette méthode permet donc d'étudier la réparation de « points chauds » de gènes comme p53²¹², mais aussi l'effet de la présence de facteurs de transcription sur la formation des dommages dans les promoteurs²⁰⁹.

Cependant, cette méthode présente l'inconvénient, nous l'avons vu, d'utiliser la radioactivité, et n'est pas facilement utilisable dans le cadre d'expériences réalisées en haut débit. De plus, les étapes de ligation peuvent s'avérer délicates.

e) **Les autres techniques**

D'autres techniques permettant de mesurer la disparition de dommages lors de cinétique de réparation existent. Nous ne les décrivons pas, mais nous pouvons citer notamment l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre des lésions, la CLHP couplée à un détecteur électrochimique.

2) **Les méthodes de mesure directe des activités enzymatiques de réparation**

a) **La réactivation de plasmide lésé (RPL)**

- **Principe :**

Cette méthode est basée sur la transfection de cellules avec un plasmide codant pour un gène rapporteur, par exemple la luciférase ou *LacZ*, comportant un dommage. L'expression du gène rapporteur est inactivée par la présence de la lésion et ce de deux manières possibles : soit la présence de la lésion bloque la transcription du gène (ex : dimères de pyrimidine)²¹³, soit elle induit une mutation dans un codon modifiant ainsi un acide aminé essentiel au bon fonctionnement de la protéine (ex : diols de thymines)²¹⁴.

L'activité de réparation cellulaire est mesurée au microscope en observant le niveau d'expression du gène rapporteur. Si la cellule n'a pas réussi à réparer la lésion alors l'expression du gène rapporteur est nulle ; au contraire, si la lésion a été correctement réparée alors l'expression du gène rapporteur est présente. **(Figure 14).**

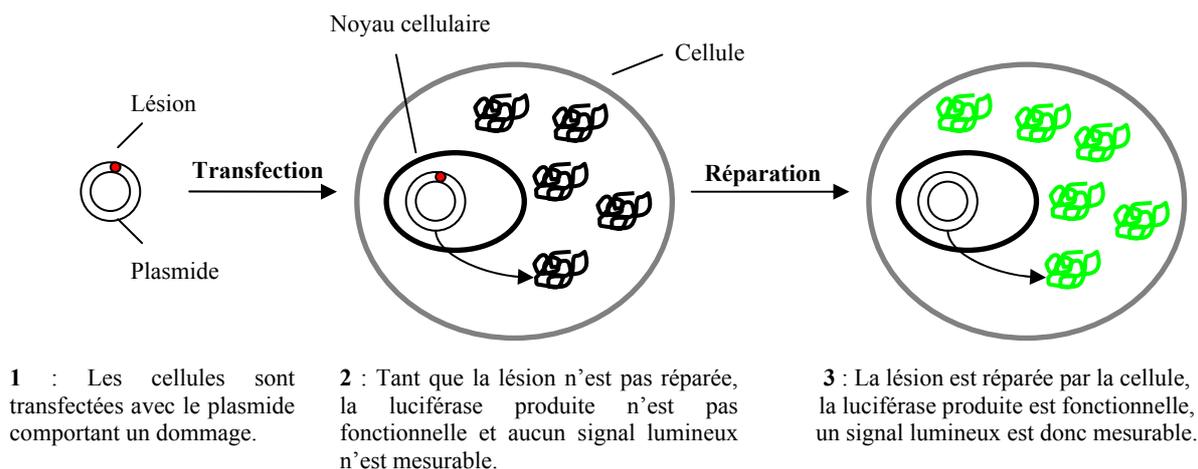


Figure 14 : Schéma simplifié du principe d'une expérience de réactivation plasmide lésé

Cette méthode permet théoriquement d'étudier tous les systèmes de réparation : REB, REN, réparation des mésappariements, O⁶-MGMT, à partir du moment où la lésion introduite est capable d'inhiber l'expression ou l'activité de la protéine rapportrice. Une variante de ce test a même été développée afin de mesurer la réparation des cassures double brin par les systèmes de réparation par recombinaison²¹⁵.

- Avantages et inconvénients :

Cette méthode offre plusieurs avantages. Tout d'abord celui de maîtriser parfaitement le type de dommage dont on va étudier la réparation, ainsi que sa quantité. En effet, l'introduction de la lésion dans la séquence d'ADN du gène rapporteur est réalisée par synthèse chimique, seul le type de dommage désiré sera donc présent. De plus la synthèse chimique offre l'autre avantage de choisir précisément le nombre de dommages introduits, et par conséquent permet de réaliser des sites multi-lésés, mais aussi d'introduire la lésion dans le brin transcrit ou non transcrit afin d'étudier la réparation couplée à la transcription.

Enfin la RPL présente l'avantage de permettre la mesure des activités de réparation de pratiquement tous les systèmes de réparation et ce *in cellulo*.

Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite la transfection de cellules, or toutes les cellules ne sont pas facilement transfectables. Se rajoute à cela le fait que la transfection n'est pas un événement neutre pour la cellule et qu'il peut modifier sa physiologie et donc biaiser la réponse observée.

b) La synthèse d'ADN non programmée (SANP) ou Unscheduled DNA synthesis (UDS)

- Principe :

Cette technique a pour but de mesurer la resynthèse d'ADN qui a lieu lors de la REN. Elle n'a jamais été utilisée pour mesurer l'étape de resynthèse de la REB bien que cela soit théoriquement possible.

Le principe de cette méthode a été décrit par A. Lehmann et S. Stevens dans un article publié en 1980²¹⁶. Il s'agit en premier lieu de traiter les cellules de telle façon qu'elles n'effectuent plus de synthèse d'ADN. Pour ce faire, les cellules sont cultivées à confluence dans un milieu dépourvu d'arginine, afin de limiter les divisions, puis elles sont traitées avec de l'hydroxyurée. Ce composé est un inhibiteur de la ribonucléotide diphosphate réductase, enzyme responsable de la formation de désoxynucléotides triphosphates à partir de ribonucléotides diphosphates. La concentration de désoxynucléotides triphosphates cellulaires se retrouve alors fortement réduite, empêchant la réplication d'avoir lieu. Cependant, il est important de noter que ce niveau faible en désoxynucléotides triphosphates n'empêche pas la synthèse d'ADN lors de la réparation¹.

Les cellules sont alors traitées afin de former des dommages dans leur ADN. Le traitement le plus couramment utilisé pour étudier la REN est une exposition aux UVB. Ensuite les cellules sont mises en présence de thymidine tritiée qui sera incorporée durant l'étape de resynthèse de la REN. Les cellules sont ensuite lavées afin d'éliminer la thymidine tritiée non incorporée, puis une autoradiographie est réalisée. La quantification de la réparation se fait enfin en comptant le nombre de points présents dans chaque noyau correspondant aux foyers de resynthèse (**Figure 15**).

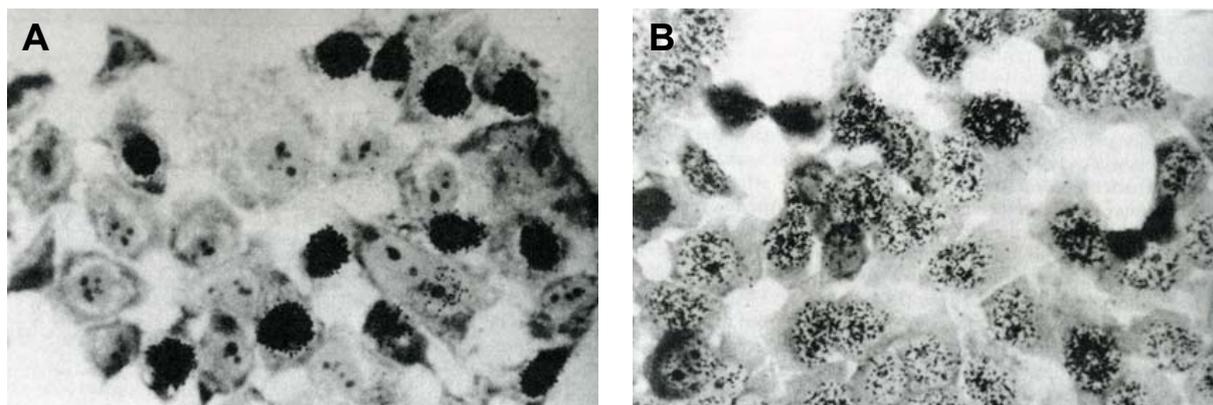


Figure 15 : Image obtenue après autoradiographie lors d'une expérience de synthèse d'ADN non programmée réalisée sur des cellules HeLa. En **A**, sur les cellules contrôles, on observe que les quelques cellules en phase S ont fortement incorporées de la thymidine tritiée, mais que les cellules en G₁ ne possèdent pas de foyers de réparation. En **B** les cellules ont été irradiées en UV à 10 J/m², on observe la présence d'un grand nombre de foyers de réparation (petits points noirs)¹.

Enfin il est à noter que cette technique est utilisée en France à l'Institut Gustave Roussy pour le diagnostic des personnes atteintes de *Xeroderma pigmentosum* et qu'un autre test découlant de cette méthode permet de mesurer la reprise de la synthèse d'ARN. Son principe est globalement similaire à celui de la SANP, excepté qu'il s'agit dans ce cas de mesurer l'incorporation d'uridine marquée radioactivement dans l'ARN. Cette méthode, quant à elle, est utilisée pour le diagnostic des personnes atteintes du syndrome de Cockayne.

- Avantages et inconvénients :

Le principal avantage de la synthèse d'ADN non programmée est qu'elle permet de mesurer, tout comme la méthode COMET et la RHC, la réparation *in cellulo*.

Cette technique a malheureusement beaucoup d'inconvénients. Le premier est l'utilisation de la radioactivité comme moyen de détection, qui rend lourde la mise en place d'expériences. De plus, le temps de l'expérience est très long et dure quinze jours et n'est absolument pas adapté à du haut débit. Enfin, le traitement appliqué aux cellules pour inhiber la resynthèse d'ADN non liée à la réparation peut être considéré comme un stress important qui peut fortement agir sur la réponse cellulaire observée. Enfin, les écarts types obtenus avec cette technique sont très importants, aussi si l'on veut caractériser un fibroblaste de patient XP il faut que la diminution de réparation par rapport au témoin soit au moins de 50%²¹⁶.

c) **Test *in vitro* d'excision resynthèse**

- **Principe :**

Le premier test *in vitro* permettant de mesurer l'activité de REN d'extraits cellulaires nucléaires a été décrit par R. Wood en 1988¹³. Cette méthode tire profit, tout comme la méthode de SANP, de l'étape de resynthèse d'ADN lors de la REN pour incorporer, dans un plasmide comportant une lésion, un nucléotide marqué radioactivement. Les plasmides sont ensuite précipités, puis une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée suivie d'une autoradiographie afin de mesurer la quantité de radioactivité incorporée lors de la réparation des plasmides.

La lésion portée par le plasmide peut être introduite de différentes manières, soit en incorporant dans le plasmide un oligonucléotide de synthèse comportant une ou plusieurs lésions, soit en traitant les plasmides chimiquement ou avec un rayonnement. Dans le second cas, la position et le nombre de lésions par plasmide sont plus délicats à contrôler.

Ce test peut aussi être réalisé en utilisant un dNTP marqué à la digoxigénine, la quantification se faisant alors par colorimétrie en utilisant des anticorps couplés à la phosphatase alcaline²¹⁷

Enfin, G.L. Dianov a montré que cette méthode est aussi utilisable pour mesurer la réparation par excision de base, en tirant là aussi parti de l'étape de resynthèse d'ADN²¹⁸.

- **Avantages et inconvénients :**

Ce test présente l'avantage d'être particulièrement sensible, aussi bien lorsqu'il est utilisé avec un marquage radioactif que colorimétrique, mais l'utilisation de la radioactivité peut être aussi considérée comme un inconvénient. Enfin, un autre inconvénient de ce test est qu'il ne donne pas accès à une mesure *in cellulo* de la réparation.

d) Test *in vitro* d'excision

- Principe

Le test *in vitro* d'excision permet de mesurer principalement les activités glycosylases de la REB. Son principe est tout d'abord de marquer radioactivement à une de ses extrémités, un oligonucléotide double brin portant une lésion. L'oligonucléotide est ensuite incubé avec des enzymes de réparation purifiées ou des extraits cellulaires. Si au cours de cette étape une excision a lieu, alors l'oligonucléotide portant la lésion sera coupé en deux. On fait ensuite migrer sur gel d'acrylamide dénaturant l'oligonucléotide, puis une autoradiographie du gel est réalisée. Si une excision a eu lieu, deux bandes distinctes seront observées, une correspondant à l'oligonucléotide portant la lésion non excisée, et l'autre correspondant au fragment d'oligonucléotide formé lors de l'excision. Il est alors possible de calculer des rendements réactionnels en quantifiant la radioactivité présente dans chaque bande, ou de réaliser des cinétiques de réparation^{219, 220}.

- Avantages et inconvénients :

Cette méthode offre plusieurs avantages. Premièrement, elle est très sensible car elle utilise la radioactivité. De plus, l'emploi d'oligonucléotides de synthèse permet de maîtriser parfaitement le nombre de lésions, mais aussi de réaliser des sites multilésés. Enfin, le fait que l'on puisse déterminer le rendement réactionnel, en connaissant à la fois la quantité d'oligonucléotide excisé et non excisé, permet le calcul de constantes biochimiques. Cependant cette technique présente comme inconvénient majeur d'utiliser la radioactivité.

3) Conclusion

Toutes les méthodes que nous venons de décrire présentent l'avantage de permettre une mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN. Mais elles partagent aussi pour certaines des inconvénients majeurs comme l'utilisation de la radioactivité, ou bien encore un temps de réalisation très long. Parfois même certaines méthodes combinent les deux.

Aucune d'entre elles ne permet de réaliser la mesure de la réparation de plusieurs dommages en une seule réaction et ce de manière spécifique, elles ne permettent donc pas de réaliser des expériences en haut débit. Les techniques que nous allons aborder maintenant présentent elles l'avantage de mesurer plusieurs paramètres en une seule réaction, cependant elles ne permettent pas une mesure directe des activités de réparation.

B) Mesure de la réparation : les biopuces

Nous venons de voir les outils de mesure de la réparation, basés sur la fonctionnalité enzymatique. Ici nous allons aborder deux techniques permettant une étude de la réparation, fondée soit sur la mesure du niveau d'expression d'ARNm avec les biopuces à ADNc, soit sur la mesure de la quantité de protéine avec les biopuces à anticorps. Ces deux méthodes tirent profit des récentes avancées technologiques dans différents domaines tels que l'imagerie, les molécules fluorescentes, l'automatisation, et la dispense de liquide à faibles volumes. La haute densité des dépôts présents sur les biopuces permet de diminuer le volume nécessaire pour réaliser le test, et surtout de mesurer un grand nombre de paramètres en une seule réaction. Tous ces facteurs font des biopuces un outil particulièrement puissant.

1) L'étude du transcriptome au moyen de biopuces

a) Principe et méthode

L'utilisation de cette méthode permet d'étudier le niveau d'expression des gènes, et part du postulat que le niveau d'expression des ARNm reflète la quantité de protéines présentes dans la cellule et donc les capacités de réparation. Plusieurs articles relatent l'utilisation de cette technique pour étudier l'expression des transcrits

impliqués dans différents systèmes de réparation de l'ADN : REN, RNH, O⁶-MGMT, réparation des mésappariements²²¹⁻²²⁵.

Bien que très récent, le concept des biopuces à ADN est né en fait il y a 25 ans en 1975 avec l'invention du Southern Blot, où pour la première fois des hybridations d'ADN étaient réalisées sur une membrane. Il faut attendre 1995 pour voir apparaître le premier article relatant la fabrication et l'utilisation d'une biopuce dédiée à l'étude du transcriptome²²⁶. Cette technologie est née du désir de pouvoir comparer les niveaux d'expression d'ARNm entre deux échantillons différents en utilisant le fait que deux séquences d'ADN complémentaires peuvent s'hybrider.

Les biopuces sont fabriquées en déposant les sondes ADNc des ARNm d'intérêt sur une lame de verre, ou une membrane de nylon. Les ADNc porteront le nom de cibles lors de l'étape d'hybridation, leur densité peut aller jusqu'à 1000 par cm². Le besoin de réaliser des dépôts en haute densité vient en partie de la nécessité d'économiser les échantillons biologiques souvent précieux ; en effet, plus la surface couverte par les dépôts est petite et moins la quantité d'échantillon à mettre en contact est grande.

En vue de réaliser le test, les ARNm des deux échantillons cellulaires à comparer sont purifiés ; une amplification par PCR est parfois nécessaire afin de pouvoir détecter les transcrits présents en faible quantité. Ensuite une étape utilisant la transcriptase inverse permet d'obtenir les ADNc des ARNm d'intérêt. Les ADNc des deux échantillons sont alors marqués chacun avec un marqueur fluorescent différent, typiquement Cy3 qui fluoresce dans le vert et Cy5 qui fluoresce dans le rouge. L'expérience est réalisée en déposant ensemble les ADNc des deux échantillons sur la puce. L'hybridation de chaque ADNc avec sa sonde va alors avoir lieu, cependant il y aura une compétition entre les ADNc des deux échantillons. La biopuce est alors lavée puis lue aux deux longueurs d'ondes des deux marqueurs fluorescents et les deux images obtenues sont superposées. Si la quantité d'ADNc de chaque échantillon qui a réagi avec un dépôt est identique alors le dépôt apparaîtra jaune car il y a autant de fluorescence verte que rouge. Si un ADNc était plus représenté dans un échantillon que dans l'autre alors la couleur du dépôt serait soit rouge ou soit verte (**Figure 16**). Des logiciels d'analyse dédiés permettent ensuite de traiter les données générées lors de l'expérience et de mettre en évidence les différences transcriptomiques des deux échantillons.

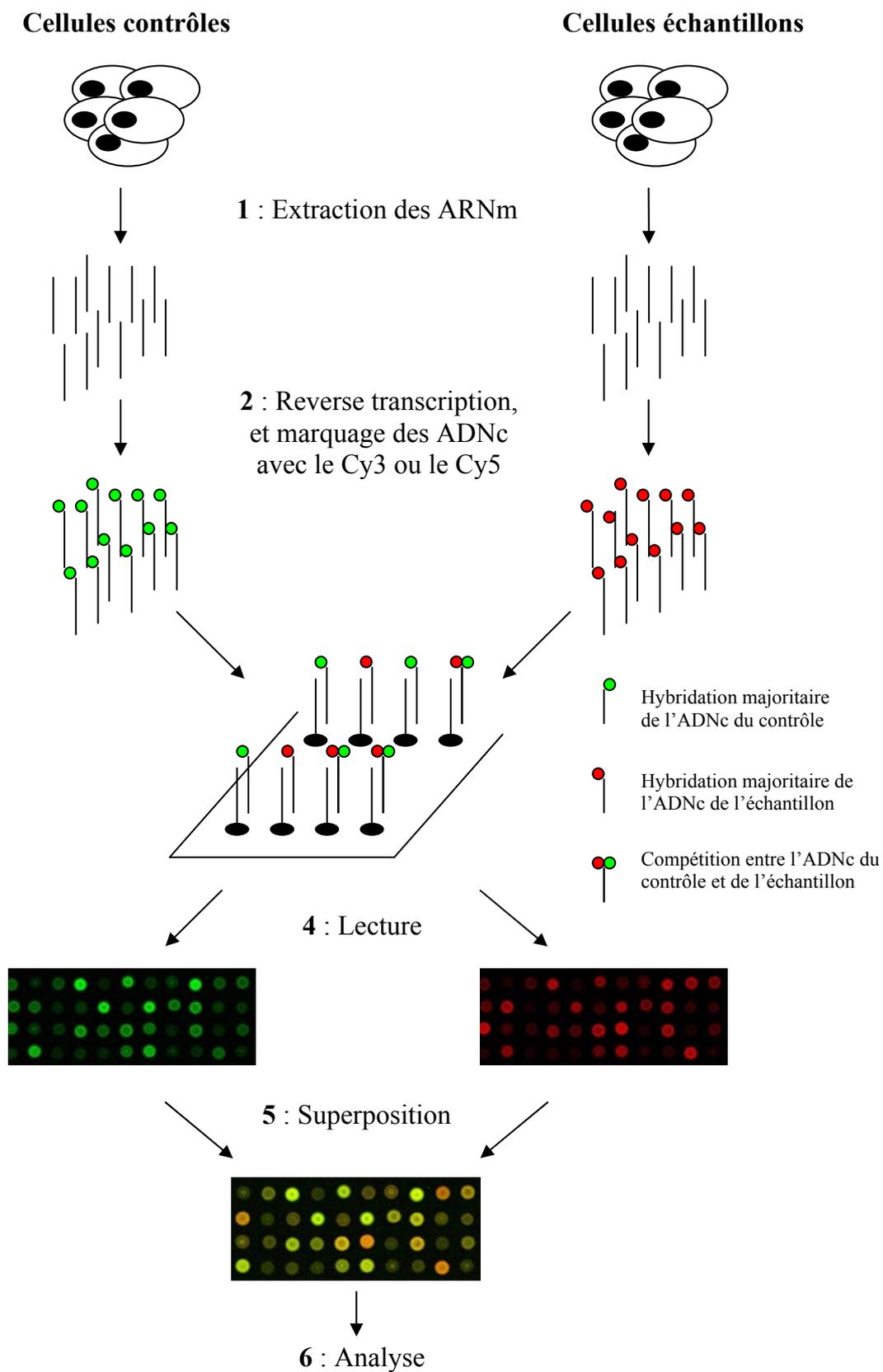


Figure 16 : Schéma du déroulement d'une expérience d'étude du transcriptome sur mice à ADN

b) Avantages et inconvénients

Cette technique est très sensible surtout si une étape d'amplification des ARN est utilisée. De par la haute densité des dépôts, elle permet d'analyser l'expression spécifique de milliers d'ARNm en une seule réaction et dans des volumes de l'ordre de la dizaine de microlitres, ce qui permet de réaliser des expériences en utilisant très peu d'échantillon. Enfin l'approche par hybridation compétitive permet de mettre élégamment en évidence les différences transcriptomiques de deux échantillons.

Cependant plusieurs critiques peuvent être émises. Premièrement l'étape de purification et d'amplification des ARNm est très délicate, et les quantités d'ADNc de chaque échantillon déposé sur la puce doivent être parfaitement contrôlées afin de ne pas introduire de biais. Enfin rien ne garantit que le niveau d'expression d'un ARN reflète entièrement le niveau d'expression protéique ainsi que l'activité enzymatique. Plusieurs facteurs comme le niveau de traduction des ARNm, la durée de leur demi-vie peuvent agir sur la quantité de protéine et ne sont pas pris en compte. De plus, beaucoup de modifications posttraductionnelles peuvent influencer sur l'activité d'une protéine (glycosylation, SUMOylation, phosphorylation, ubiquitination). Le niveau d'expression d'ARNm est un indicateur intéressant, mais il ne peut en aucun cas se substituer à un test fonctionnel.

2) Les puces à anticorps

a) Principe des puces à anticorps

Les biopuces à anticorps sont une évolution récente des puces à ADN, elle ont vu le jour en tirant profit des avancées technologiques acquises lors de la mise au point des biopuces à ADN. Le premier article présentant une biopuce à protéine est paru en 2000, ce qui fait que cette technologie est très jeune et très peu d'articles relatent son utilisation pour étudier la réparation de l'ADN. On peut toutefois noter que le niveau d'expression des protéines de la NER a été mesuré par cette technique dans des lymphocytes pour diagnostiquer une prédisposition au cancer de la tête et du cou à

cellules squameuses, mais aussi pour mesurer le niveau des protéines de la RNH durant une ischémie^{227, 228}.

Les biopuces à anticorps sont fabriquées en déposant des anticorps sur une lame de verre exactement de la même manière dont sont fabriquées les biopuces à ADN. Elles permettent de mesurer la quantité de protéines présentes dans un échantillon, en tirant profit de la grande spécificité de fixation des anticorps pour leur antigène, ici les protéines d'intérêt^{229, 230}.

Le déroulement d'une expérience réalisée avec une biopuce à anticorps est pratiquement identique à celui des biopuces à ADN. Les protéines de deux échantillons sont extraites, puis marquées avec soit du Cy3 soit du Cy5. Les deux échantillons sont ensuite déposés sur la puce à anticorps en quantité égale. Une compétition s'opère alors entre les protéines des deux échantillons pour se fixer sur l'anticorps spécifique de ces dernières. L'analyse conduit là aussi à la superposition de deux images obtenues après lecture, ces deux images correspondant à la fixation des protéines de chaque échantillon. Tout comme pour les puces à ADN, la couleur indique le niveau de fixation des protéines (**Figure 17**).

b) Les avantages et inconvénients des puces à anticorps

Cette technique est très sensible. Elle possède les mêmes avantages que les biopuces à ADN quant au très grand nombre de paramètres testés, ainsi que le faible volume d'échantillon nécessaire pour réaliser l'expérience. Cette méthode est aussi très spécifique, on sait exactement quelle protéine est présente, contrairement aux tests de fonctionnalité où l'on peut observer une augmentation de la réparation sans savoir quelle protéine a pu intervenir.

Cette méthode a plusieurs inconvénients. Tout d'abord les puces à anticorps sont coûteuses, car les anticorps étant souvent vendus très cher, une puce de plusieurs milliers de dépôts d'anticorps n'est pour le moment pas réalisable. Le nombre de dépôts sur ces biopuces reste pour le moment assez faible, ce qui pour certaines applications n'est pas forcément gênant. Enfin on ne mesure pas d'activité de réparation, mais la quantité de protéine, or ceci ne justifie pas forcément leur activité. Les modifications postraductionnelles peuvent moduler cette activité, tout comme l'épissage alternatif des ARN.

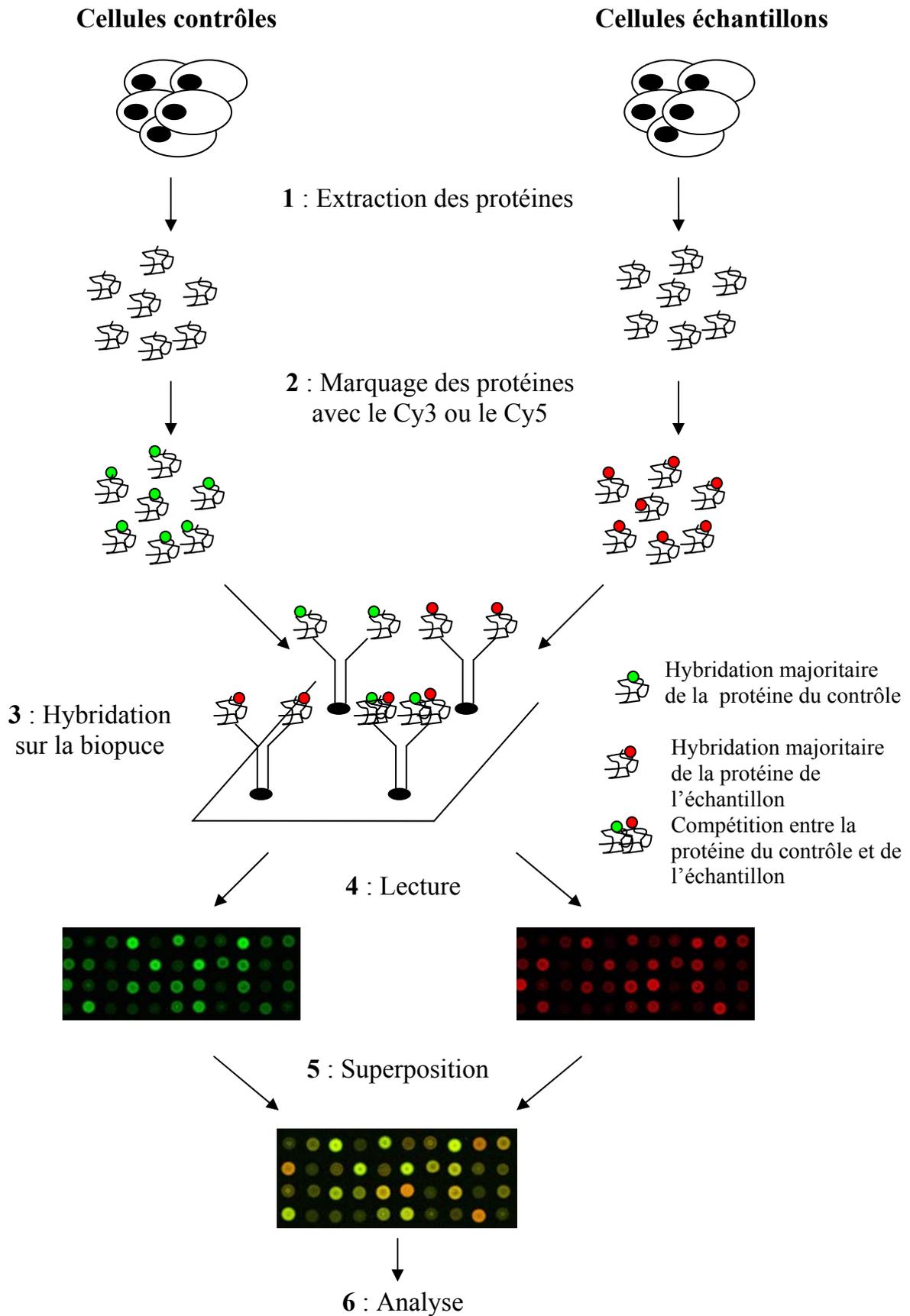


Figure 17 : Schéma du déroulement d'une expérience d'étude du protéome sur puce à protéines.

C) Conclusion sur les outils permettant d'étudier la réparation

Comme nous venons de le voir, deux types de test existent. D'un côté nous avons les tests qui permettent une mesure des activités de réparation qui ont pour avantage d'appréhender le niveau de réparation de l'échantillon, mais ces tests sont souvent longs, ou nécessitent l'utilisation de matières radioactives.

D'un autre côté nous avons les outils permettant de mesurer la quantité d'ARNm ou de protéine de l'échantillon afin d'estimer les capacités de réparation de l'ADN. Ces tests sont très spécifiques et ont l'avantage d'utiliser le format de biopuce qui permet de mesurer un grand nombre de paramètres en utilisant une très faible quantité d'échantillon. Cependant ils ne permettent pas d'appréhender directement le niveau d'activité de réparation. Le **Tableau 6** compare les différentes caractéristiques des outils d'étude de la réparation que nous avons présentés. Au vu de ces données, un test utilisant le format biopuce et permettant de mesurer les activités de réparation de manière spécifique combinerait les avantages des deux mondes et pourrait être un outil très puissant.

	Mesure activité enzymatique						Les biopuces	
	Indirecte			Directe			ARN	Protéines
Nom du test	COMET/ Elution Alcaline	CLHP- SM/SM	PCR- ML	RPL	UDS	Excision / Excision resynthèse <i>in vitro</i>		
Critères								
Durée	2 J	1 J	2 J	1 J	15 J	2 J	2 J	2 J
Mesure de la fonction	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non	non
Mesure	Qnc	Q	SQ	Qnc	Qnc	Qnc	Qnc	Qnc
Analyse multi-paramétrique	non	non	non	non	non	non	oui	oui
Spécificité	non	non	non	non	non	oui	oui	oui
Radioactivité	non	non	oui	non	oui	oui	non	non
<i>In cellulo / In vitro</i>	<i>In cellulo</i>	<i>In cellulo</i>	<i>In cellulo</i>	<i>In cellulo</i>	<i>In cellulo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>

Tableau 6 : Comparaison des différents outils utilisés pour l'étude de la réparation de l'ADN. Définition des critères :

Durée : temps nécessaire à la réalisation du test hors culture cellulaire.

Mesure de la fonction : mesure-t'on une activité enzymatique.

Mesure semi-quantitative (SQ) : mesure numérique portée sur une échelle arbitraire.

Mesure quantitative non calibrée (Qnc) : mesure numérique portée sur une échelle non calibrée

Mesure quantitative calibrée (Qc) : mesure numérique portée sur une échelle calibrée.

Analyse multiparamétrique : plusieurs paramètres sont-ils testés.

Spécificité : connaît-on précisément les protéines ou ARN impliqués dans le mécanisme de réparation mesuré.

Radioactivité : des composés radioactifs sont-ils utilisés lors du test.

In cellulo / in vitro : étape de réparation réalisée *in vitro* ou *in vivo*.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Depuis la découverte dans les années 60 par R. E. Rasmussen et R. B. Painter, chez l'Homme, de la réparation par excision de nucléotides, les recherches dans le domaine de la réparation de l'ADN se sont intensifiées. Les chercheurs ont en effet compris très tôt l'importance et l'implication des mécanismes de réparation dans le processus de carcinogenèse ainsi que dans les maladies génétiques comme *Xeroderma pigmentosum*, et le Syndrome de Cockayne. Les recherches ont par la suite conduit à la découverte d'autres systèmes de réparation tels que la réparation par excision de base, le système de réparation des mésappariements ou les systèmes de réparation des cassures de l'ADN.

Aujourd'hui la compréhension de ces mécanismes est approfondie chaque jour un peu plus, et l'existence d'interactions et de complémentarités entre les différents systèmes de réparation ont récemment été montrées. Cependant les tests fonctionnels dont on dispose pour étudier les mécanismes de réparation ne prennent pas en compte toute cette complexité. En effet, le plus souvent, ils sont basés sur la mesure de la réparation d'une seule lésion par un seul système de réparation. D'un autre côté, l'utilisation récente de biopuces à ADN et à anticorps permet grâce à leur format, d'appréhender cette complexité mais de manière indirecte en ne donnant pas d'indication sur les activités enzymatiques de réparation.

Le premier objectif de cette thèse était, en partant du constat précédant, de mettre au point un outil miniaturisé d'étude des systèmes de réparation de l'ADN, offrant une mesure parallélisée, fonctionnelle et spécifique de la réparation de plusieurs dommages. Pour ce faire, nous avons décidé d'adapter le test fonctionnel d'excision resynthèse décrit par R. Wood au format biopuce qui permet de faire des mesures parallélisées tout en utilisant de faibles volumes réactionnels. Par la suite, nous devons nous assurer de la validité du test. Dans ce but, nous avons réalisé des expériences permettant de montrer que les signaux mesurés correspondent bien, et ce de manière spécifique, à une activité de réparation de l'ADN. Enfin, une fois que cette étape de validation a été acquise, nous nous sommes proposé de réaliser deux expériences applicatives dans le but de démontrer l'utilité pratique de cette biopuce et ce dans deux domaines différents.

La partie expérimentale qui suit est découpée en cinq chapitres. Nous présenterons dans le chapitre I la mise au point de la fabrication de la biopuce, à travers le choix des lésions, le réglage du robot de dispense, et le choix du support. Dans le chapitre II sera abordé la méthode de quantification, ainsi que la mise au point de l'outil bioinformatique développé

spécifiquement pour normaliser les données générées lors du test. Seront aussi présentés les outils que nous utilisons pour analyser les résultats. Le chapitre III sera consacré à la mise au point du test biologique, à savoir les conditions de réaction, mais aussi les différentes méthodes de préparation d'extraits cellulaires et les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles. Dans le chapitre IV nous exposerons les différentes expériences qui ont été réalisées afin de valider la spécificité du test. Pour finir, dans le chapitre V seront présentées deux expériences montrant des applications possibles de ce test. La première est la mesure des activités de réparation dans différents types cellulaires humains issus de cultures primaires, kératinocytes, fibroblastes, ou prélevées directement sur le donneur : cellules mononuclées du sang périphérique. La seconde expérience applicative que nous avons réalisée porte sur l'irradiation de cellules lymphoblastiques par des rayons gamma, ceci afin d'étudier la régulation des systèmes de réparation et notamment la réponse adaptative cellulaire.

Partie expérimentale

Introduction à la partie expérimentale

Le test que nous nous sommes proposé de mettre au point devait posséder les avantages d'un test fonctionnel de mesure de la réparation, ainsi que ceux procurés par le format biopuce. Nous avons donc décidé de transposer le test d'excision resynthèse décrit par R. Wood au format biopuce. Le test d'excision resynthèse, que nous avons présenté dans le chapitre dédié aux outils de mesure de la réparation, tire profit de l'étape de resynthèse présente dans plusieurs systèmes de réparation (REB, REN, RH) pour incorporer dans le brin d'ADN réparé un nucléotide marqué. Si la lésion est réparée, alors il y a incorporation de nucléotides marqués, et donc apparition de signal (**Figure 18**). Le test d'excision resynthèse décrit par R. Wood est typiquement réalisé dans un tube comportant l'extrait cellulaire à tester en présence d'ADN lésé et du nucléotide marqué. Comme nous voulions une mesure parallélisée de la réparation de plusieurs dommages, nous avons utilisé le format biopuce. Nous avons donc réalisé des dépôts d'ADN sur support, chaque dépôt d'ADN comportant un dommage spécifique. La réaction du test a alors lieu en faisant réagir les extraits cellulaires d'intérêt sur la biopuce en présence de nucléotide marqué. Dans notre cas, et pour des questions pratiques, nous avons décidé d'utiliser un nucléotide marqué avec une molécule fluorescente de type Cy5 ou Cy3. L'utilisation de marqueur fluorescent nous a permis de bénéficier de tous les outils de lecture et d'analyse déjà existants développés pour les biopuces à ADN et à protéines. Afin d'avoir une vue d'ensemble du test, un schéma organisationnel est présenté sur la **Figure 19**.

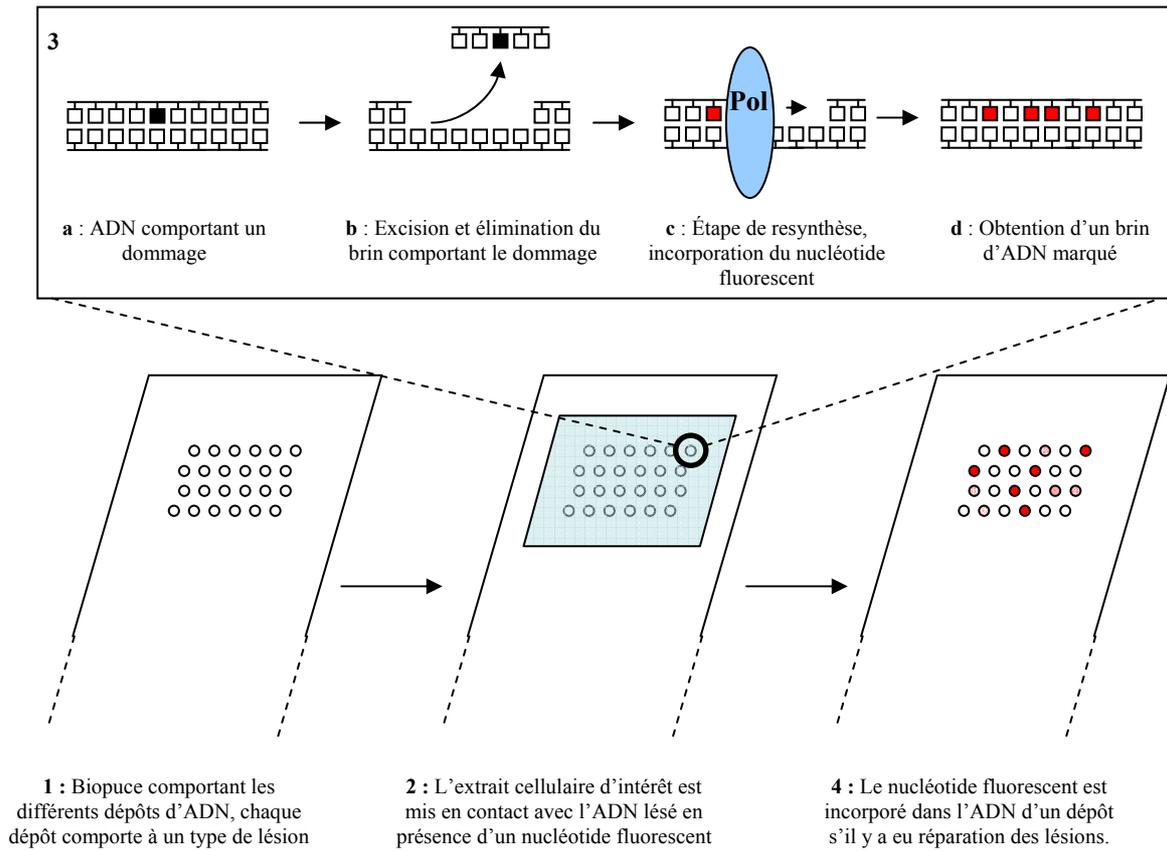


Figure 18 : Schéma explicatif du principe du test que nous avons développé.

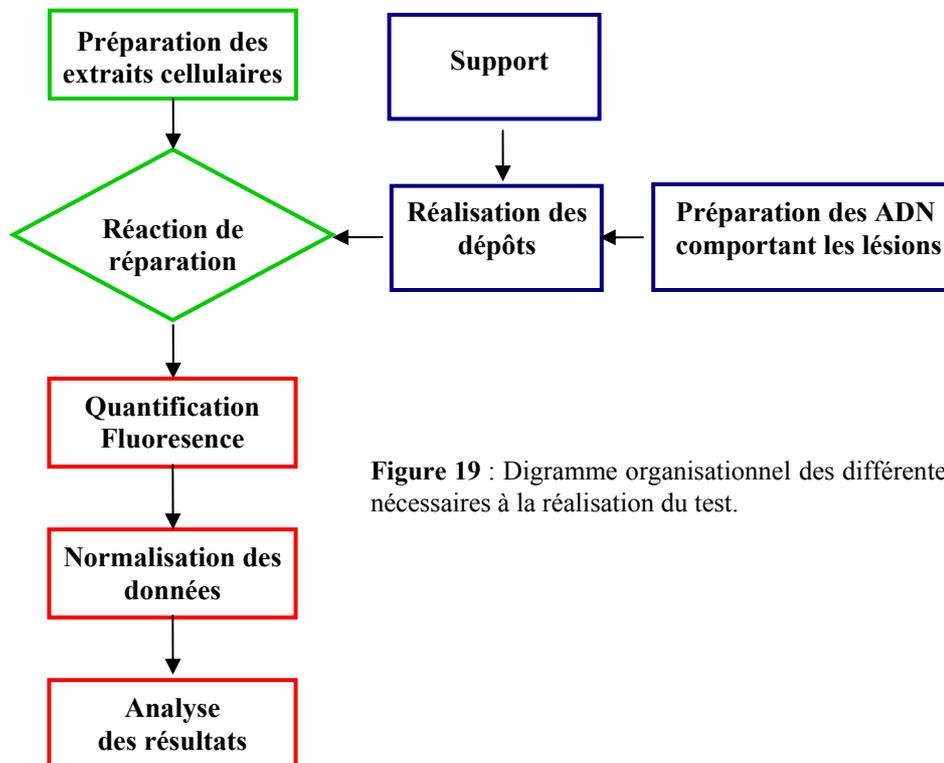


Figure 19 : Digramme organisationnel des différentes étapes nécessaires à la réalisation du test.

Chapitre I : Mise au point de la fabrication de la biopuce

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons traiter de la mise au point de la fabrication de la biopuce. Cela comprend plusieurs étapes. Tout d'abord nous présenterons les ADN lésés que nous avons choisi de déposer sur la biopuce, ainsi que les réactions utilisées pour les former. Dans une seconde partie nous aborderons comment ont été réalisées les dépôts d'ADN comportant les lésions, seront présentées toutes les étapes de mise au point du robot de. Enfin une dernière partie traitera des lames supports sur lesquelles ont été réalisées les dépôts. Les étapes qui vont être abordées dans ce chapitre sont présentées sur la **Figure 20**.

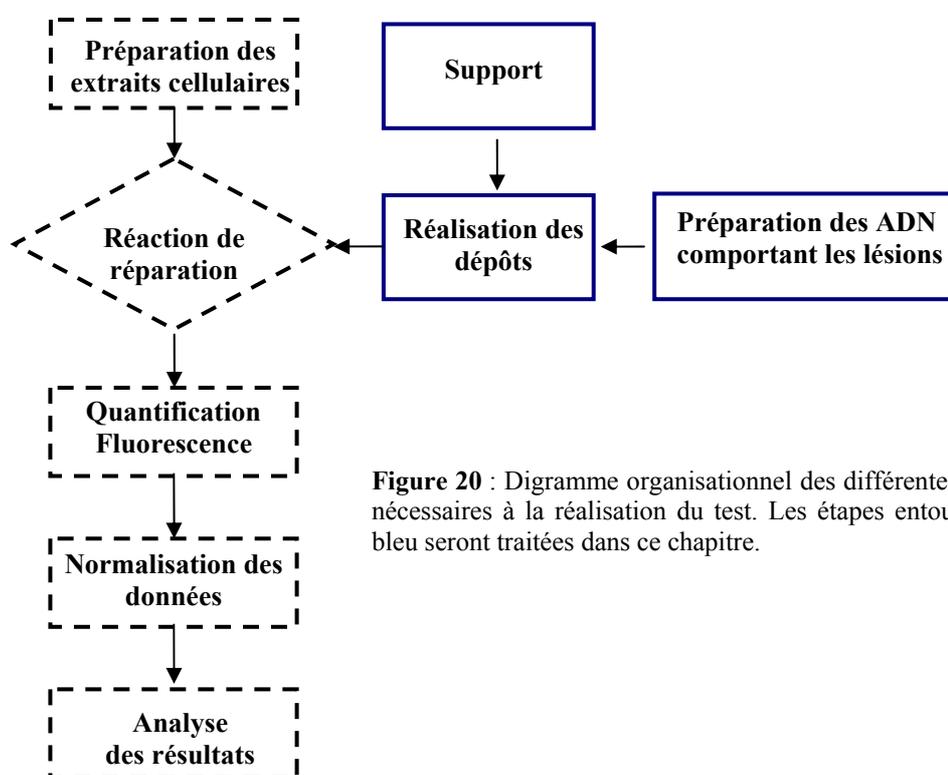


Figure 20 : Digramme organisationnel des différentes étapes nécessaires à la réalisation du test. Les étapes entourées en bleu seront traitées dans ce chapitre.

I) Les différentes lésions présentes sur la biopuce

A) L'ADN portant les lésions

Le choix du type d'ADN portant les lésions est important. Dans notre cas, nous avons choisi le même que celui qui est couramment utilisé lors des tests d'excision resynthèse, à savoir de l'ADN plasmidique. Cette conformation particulière de l'ADN possède plusieurs avantages non négligeables. Premièrement, étant sous forme circulaire, l'ADN plasmidique ne présente pas de bouts francs qui sont le substrat de réactions capables, en provoquant un signal non spécifique, de perturber la mesure des activités de réparation de l'ADN. De plus, les plasmides offrent aussi la particularité de pouvoir être super enroulés, qui est un meilleur substrat pour les enzymes de réparation que l'ADN linéaire. Enfin, les bactéries ont la capacité d'amplifier de manière très rapide les plasmides ce qui rend leur production très aisée et peu coûteuse.

B) Préparation des plasmides portant les lésions

1) La qualité des plasmides

Les plasmides peuvent perdre leur forme super enroulée notamment si une coupure simple brin est induite. L'apparition de ces cassures simple brin peut être spontanée, mais elles apparaissent principalement lors de certains traitements utilisés pour former les lésions. La présence de ces coupures peut conduire à des réactions non spécifiques. Nous avons donc apporté un grand soin à maintenir les plasmides dans leur conformation super enroulée car elle est garante de l'intégrité de leur structure, et nous assure que les réactions de réparation auront lieu sur une population homogène de plasmides.

Pour cela, nous avons tout d'abord effectué un contrôle qualité en réalisant une électrophorèse sur gels d'agarose des plasmides lésés. Cette étape permet de s'assurer de leur bonne conformation, à savoir s'ils étaient sous forme linéaire, circulaire, ou circulaire super enroulée. Dans le cas où les plasmides présentaient trop de cassures, notamment après avoir subi le traitement permettant de former les lésions, nous avons réalisé des purifications par ultracentrifugations sur gradient de sucrose. Cette

technique nous a permis de séparer les plasmides en fonction de leur conformation spatiale et ainsi de purifier spécifiquement ceux sous forme super enroulée.

2) La qualité des lésions

La qualité des lésions est un facteur très important, nous devons nous assurer du nombre de lésions par plasmide et du type de lésions présentes. En effet, si un traitement forme en plus de la lésion attendue d'autres types de dommages, cela fait perdre toute spécificité au test. C'est pour cela qu'à chaque fois que cela était possible, un dosage des lésions par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM) a été réalisé au laboratoire par Thierry Douki et Jean-Luc Ravanat. Le nombre de dommages par plasmide a ainsi pu être calculé grâce à l'utilisation de solution standard permettant de calibrer le spectromètre de masse. Pour certaines lésions nous n'avions pas de standard et nous n'avons donc pas pu réaliser cette quantification.

3) Choix du nombre de lésions par plasmide

Le choix de la quantité de dommages par plasmide a été déterminé de manière empirique en réalisant des expériences de mesure de la réparation d'extraits nucléaires HeLa commerciaux qui nous ont servi de standard. Lors de ces expériences, nous avons ajusté la quantité de dommages de chaque plasmide afin d'avoir un signal de réparation équilibré entre les différentes lésions. Nous ne voulions pas que le niveau de réparation très élevé d'un dommage masque le niveau de réparation plus faible d'un autre dommage.

Nous avons cependant rencontré des problèmes avec les dommages formés par le cisplatine et le psoralène. En effet le niveau de réparation des lésions formées par ces deux composés était très faible. Nous avons essayé de former plus de dommages par plasmide en augmentant le temps de traitement ou la quantité de cisplatine ou de psoralène utilisée pour former les lésions, mais cela n'était pas corrélé avec une augmentation de signal, et surtout générait un grand nombre de cassures. Pour ces deux types de dommage, nous avons arbitrairement pris le choix d'utiliser les conditions de traitement générant un pourcentage de cassures inférieur à 10%.

C) Les différents plasmides présents sur la biopuce

Nous avons pour ambition de pouvoir mesurer les activités de réparation de plusieurs systèmes de réparation, par conséquent, nous avons décidé de couvrir un large spectre de dommages allant des petites lésions de bases aux pontages inter et intra-brin en passant par les lésions UV induites. Pour cela nous avons traité des plasmides afin de produire le plus spécifiquement possible chaque lésion.

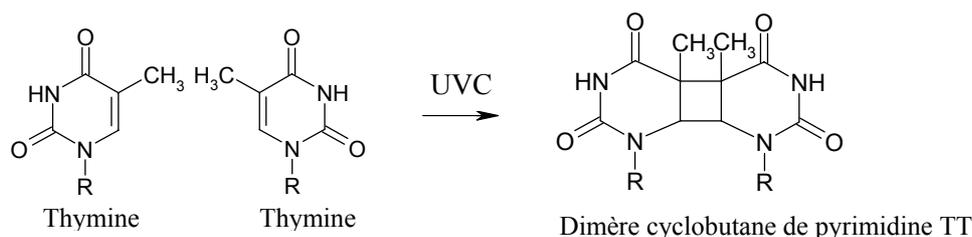
1) Plasmide contrôle

Afin de pouvoir mesurer le niveau des activités enzymatiques non spécifiques lors du test, nous avons déposé sur la biopuce un plasmide ne comportant pas de lésions : pControl. Ce plasmide sert aussi de référence lors du dosage CLHP-SM/SM des lésions afin de vérifier l'efficacité des traitements utilisés pour former les différents dommages.

2) Plasmide portant les dimères de cyclobutane de pyrimidine et les photoproduits(6-4)

Les bases de l'ADN présentent la particularité d'absorber le rayonnement UV, principalement aux longueurs d'onde des UVC et des UVB. Cette absorption d'énergie peut conduire à la formation des DCP et des pp(6-4) qui sont des pontages entre les bases pyrimidiques (**Figure 21**).

Dimère cyclobutane de pyrimidine TT :



Photoproduit (6-4) TT :

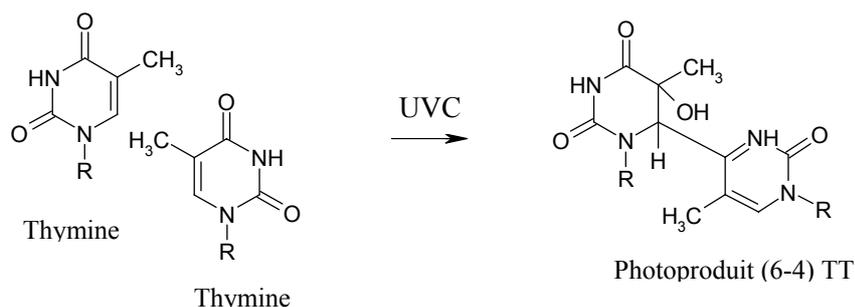


Figure 21 : Exemples de DCP : Thymine Thymine et de pp(6-4) : Thymine Thymine

Il semblait intéressant que ces dommages soient présents sur la biopuce. En effet leur réparation est particulièrement étudiée, premièrement parce qu'ils sont formés par le rayonnement UV auquel nous sommes tous exposés, mais aussi car ils sont responsables de cancers cutanés. Enfin ces lésions sont typiquement prises en charge par le système de réparation par excision de nucléotides, donc la réparation peut être mesurée à l'aide de notre test.

Nous avons choisi de former les DCP et les pp(6-4) en irradiant les plasmides avec une lampe UVC. Cette méthode permet de générer rapidement et facilement ces lésions, cependant elle ne permet pas de former spécifiquement les DCP ou les pp(6-4). Les plasmides comportent donc un mélange des deux lésions. Lors du dosage des lésions par CLHP-SM/SM, nous avons observé, tardivement, que de la 8-oxoG était aussi formée. Aussi quelques expériences de cette étude ont été réalisées sur des biopuces dont le plasmide, portant les lésions DCP et les pp(6-4), a été obtenu par cette méthode, il est nommé pCPD-64*.

Par la suite, nous avons pu diminuer fortement la quantité de 8-oxoG formée en irradiant les plasmides en solution congelée, ce qui permet de bloquer le déplacement des espèces réactives de l'oxygène responsables de la formation de la 8-oxoG (**Tableau 7**). Ce plasmide est nommé pCPD-64.

	pp(6-4)	DCP	8-oxoG
pControl	0	0	0.2
pCPD-64*	26.7	34.1	1.7
pCPD-64	25.7	34.5	0.1

Tableau 7 : Nombre de lésions pp(6-4), DCP, 8-oxoG par plasmide (3000 pb) , pControl, pCDP-64* et pCPD-64

3) Les plasmides portant des produits d'oxydation de bases

Le métabolisme de nos cellules, qui a lieu dans les mitochondries, est basé sur l'utilisation d'oxygène, et génère de manière endogène des espèces réactives de l'oxygène : peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle. Ces molécules électrophiles sont très réactives et peuvent réagir avec de nombreux composés cellulaires dont l'ADN. L'oxydation des bases conduit à la formation de toute une famille de lésions dont deux sont particulièrement étudiées : la 8-oxoG et les diols de thymines.

a) Plasmide portant la 8-oxoG

La 8-oxoG est une petite lésion issue de l'oxydation de la guanine. Elle est prise en charge par la réparation par excision de base. Dans un premier temps nous avons réalisé les lésions 8-oxoG en utilisant un endoperoxyde de naphthalène qui agit comme source d'oxygène singulet pour oxyder la Guanine²³¹. Cependant, lorsque nous avons réalisé le dosage par CLHP-SM/SM des lésions, nous nous sommes aperçu, de manière tardive, qu'il y avait pratiquement autant de 8-oxoG présente dans le plasmide traité que dans le plasmide contrôle, et que des lésions diols de thymines et HmdU étaient formées (**Tableau 8**). Les conditions de ce traitement sont très délicates à mettre au point et, nous pensons que la HmdU mesurée correspondent à des produits de sur-oxydation de la 8-oxoG formée. De plus l' endoperoxyde de naphthalène s'est avéré être instable dans le temps ce qui a rendu son utilisation compliquée. Quelques expériences de cette étude ont été réalisées sur des biopuces dont le plasmide portant la lésion 8-oxoG a été obtenu par cette méthode. Dans ce cas précis il est nommé p8oxo*.

Fort de ce constat, nous avons alors décidé de former la 8-oxoG par une autre voie. Nous avons alors utilisé la riboflavine, cette molécule est un photosensibilisateur qui est activé par la lumière visible. Une fois activée, elle a la capacité d'oxyder les bases de l'ADN en produisant de manière majoritaire de la 8-oxoG (**Figure 22**).

8-oxoG :

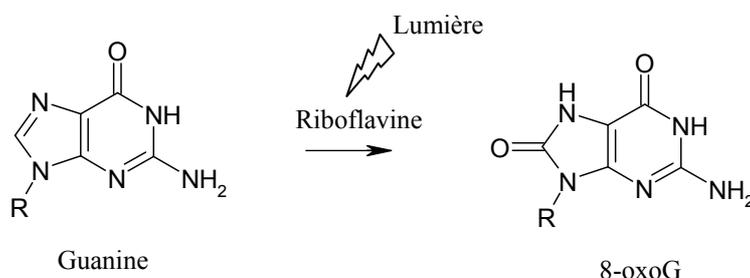


Figure 22 : Formation de la 8-oxoG par l'oxydation de la guanine par la riboflavine

Avec le dosage des lésions, nous avons pu nous assurer que le traitement à la riboflavine, contrairement à celui utilisant de l'endoperoxyde de naphthalène, ne formait pas d'autres dommages oxydatifs, notamment ceux de la thymine (**Tableau 8**). Le plasmide portant la lésion 8-oxoG obtenue par le traitement à la riboflavine est nommé p8oxo.

	8-oxoG	diols de thymines	hmdU
pControl	0.2	0	0
p8oxo*	0.3	0.5	0.1
p8oxo	3.7	0.0	0.0

Tableau 8: Nombre de lésions de 8-oxoG, diols de thymines et hmdU par plasmide p8oxo

b) Plasmides portant les diols de thymines

Les diols de thymines sont des petites lésions issues de l'oxydation de la thymine. Elles existent sous quatre formes isomères, deux sous la forme cis et deux sous la forme trans. Tout comme la 8-oxoG, elles sont réparées par la REB. Nous avons appelé le plasmide comportant les diols de thymines pThymG.

Pour produire ces lésions, nous avons utilisé un traitement à base de KMNO_4 qui permet d'oxyder spécifiquement la thymine et plus faiblement les cytosines^{232, 233}.

Lors de la réaction, Mn^{2+} réagit avec la double liaison carbone-carbone des pyrimidines pour former les diols de thymines (**Figure 23**).

Diols de thymines :

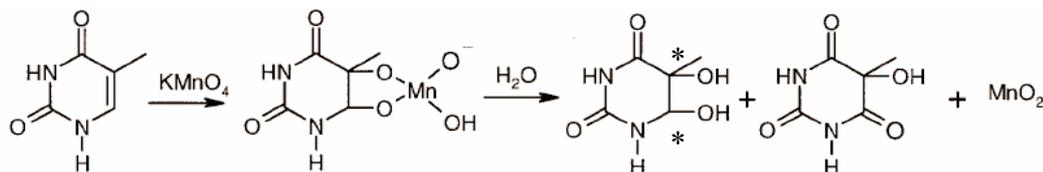


Figure 23 : Réaction de formation des diols de thymines à partir de l'oxydation de la thymine par le permanganate, des cétones peuvent aussi être formés selon les conditions mais ne sont pas le produit majoritaire

Le dosage des lésions par CLHP-SM/SM a permis de montrer que le traitement au permanganate permettait de produire spécifiquement des diols de thymines ; en effet, bien qu'étant un produit d'oxydation de la thymine, nous n'avons pas pu mesurer de hmdU. De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence non plus d'oxydation de la guanine. Il est important de noter toutefois que nous n'avons pas mesuré les diols de cytosines qui sont aussi produits au cours de cette réaction. De plus leur dégradation conduit à la formation de 5OHdC et de diols d'uridine. Il ne faut donc pas négliger la présence de ces lésions (**Tableau 9**).

	diols de thymines	8-oxoG	hmdU
pControl	0	0.2	0
pThymG	1.1	0.2	0

Tableau 9 : Nombre de lésions de diols de thymines, 8-oxoG et hmdU par plasmide pThymG

4) Plasmide portant des bases alkylées

L'alkylation des bases, ou l'ajout d'une chaîne alkylée, est un phénomène qui a lieu naturellement dans les cellules, notamment à travers les méthylations de bases, mais ce n'est pas le seul mécanisme. En effet, les lipides de la membrane cellulaire, tout comme l'ADN, subissent quotidiennement des oxydations par les ERO. Cette oxydation porte le nom de peroxydation lipidique et peut conduire à la formation d'aldéhydes tels que le 4-HNE et le DDE qui ont la particularité d'être très réactifs et de pouvoir réagir avec les bases de l'ADN²³⁴⁻²³⁶. Ces réactions conduisent, entre autres, à la formation de bases modifiées, présentant un adduit exocyclique éthéno

possédant ou non une chaîne alkylée (**Figure 24**). La réparation de ces dommages est attribuée à la REB, des glycosylases étant spécifiques de ce type d'adduit. Cependant, on peut penser que si l'adduit est de grande taille (présence d'une chaîne alkylée), la REN pourrait alors intervenir.

EthénoGuanine :

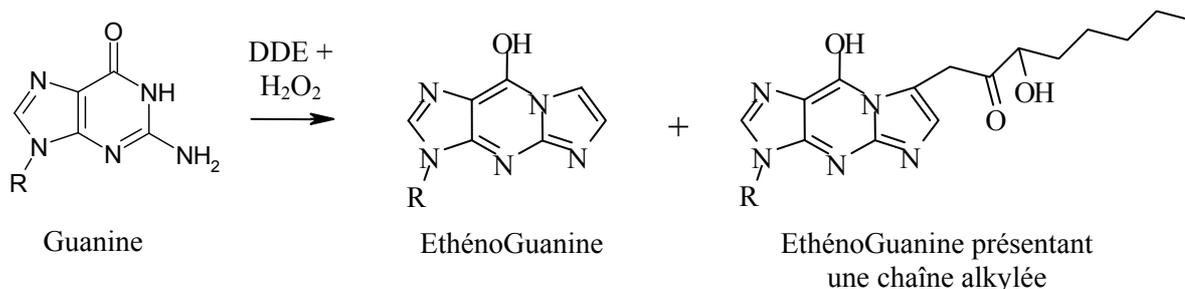


Figure 24 : Réaction de formation de l'éthénoGuanine grâce à la réaction de DDE sur la guanine.

Le plasmide présent sur la biopuce et comportant ces bases alkylées est nommé pAlkB. Pour former les bases alkylées ayant un adduit exocyclique, nous avons utilisé le DDE. Lors du dosage des lésions par CLHP-SM/SM, nous avons quantifié uniquement les adduits éthéno de la guanine et de l'adénine ne présentant pas de chaîne alkylée. Comme nous pouvons le constater, le DDE forme majoritairement de l'EthénoGuanine et très peu d'EthénoAdénine, néanmoins il a aussi la particularité de former quelques diols de thymines (**Tableau 10**).

	EthénoGuanine	EthénoAdénine	diols de thymines
pControl	0	0	0
pAlkB	10.9	0	0.3

Tableau 10: Nombre de lésions de EthénoGuanine, EthénoAdénine, diols de thymines par plasmide pAlkB

5) Les plasmides portant des pontages

Les agents chimiques créant des pontages intra et inter-brins sont pour certains très largement utilisés dans de traitement de cancers. Etre capable de mesurer les capacités de réparation cellulaire de ces dommages peut donc se révéler intéressant, par exemple pour l'étude de la résistance aux chimiothérapies. Nous avons donc choisi de mettre sur la biopuce un plasmide comportant des adduits réalisés avec le CDDP (pCisP), mais aussi un plasmide comportant des adduits réalisés avec le 8-methoxyypsoralène (pPso).

a) Plasmide portant des pontages et des adduits CDDP

Le CDDP est une molécule qui a la capacité de former plusieurs types de dommages. Tout d'abord, elle peut faire des adduits monofonctionnels sur la guanine qui évoluent cependant rapidement en adduits bifonctionnels. Les adduits bifonctionnels peuvent conduire à des pontages intra-brin entre une guanine et une adénine adjacente (intra-1,2-d(ApG)), mais aussi entre deux guanines adjacentes (intra-1,2-d(GpG)) ou séparée par un nucléotide (intra-1,3-d(GpNpG)). Le pontage inter-brins quant à lui a lieu entre deux guanines appartenant chacune à un brin différent (inter-d(GpC)d(GpC)). Les proportions des différents types de pontages sont présentés dans le **Tableau 11**. Notons que les pontages inter-brins sont très minoritaires (<2%)¹¹⁵.

Type de pontage		Pourcentage
Intra-1,2-d(GpG)	TCTA <u>GG</u> CCTTCT AGATCCGGAAGA	65%
Intra-1,2-d(ApG)	TCTT <u>AG</u> TTCTCT AGAATCAAGAGA	25%
Intra-1,3-d(GpNpG)	TCT <u>GTG</u> CACTCT AGACACGTGAGA	5-10%
Inter-d(GpC)d(GpC)	TCCTT <u>G</u> CTCTCC AGGAAC <u>G</u> AGAGG	2%

Tableau 11 : Pourcentage des différents types de pontages réalisés par le CDDP

Le plasmide portant ces dommages a été nommé pCisP. Nous n'avons pas pu doser le nombre d'adduits du CDDP que nous avons sur le plasmide pCisP.

b) Plasmide portant des pontages et des adduits de 8-methoxypsoralène (8-MOP)

Le 8-methoxypsoralène est un composé qui nécessite d'être photoactivé pour réaliser des adduits sur l'ADN. Cette caractéristique le rend particulièrement adapté au traitement de maladies cutanée telle que le psoriasis. Il est cependant aussi utilisé dans le traitement de certains cas de lymphomes, il est alors photoactivé lors du passage du sang du patient dans un système circulatoire externe²³⁷.

Cette photoactivation a lieu aux longueurs d'onde des UVA (320-400 nm). Elle conduit, si le 8-MOP est intercalé dans l'ADN, à la formation de pontages inter-brins. Ces pontages ont lieu entre deux thymines appartenant à deux brins différents. Des monos adduits peuvent aussi être formés sur une seule thymine²³⁸(**Figure 25**).

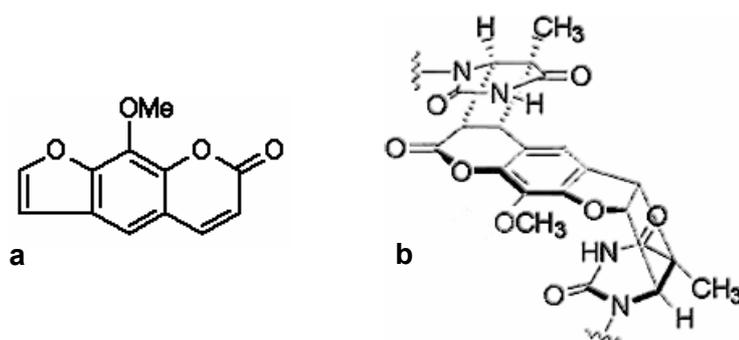


Figure 25 : En **a** molécule de 8-MOP, en **b** pontage inter-brins de deux thymines par le 8-MOP

La réparation des mono adduits est entièrement prise en charge par la REN, alors que les pontages, tout comme ceux produits par le cisplatine, sont dans une première étape excisés par la REN, puis la RH ou la RNH finissent le processus de réparation.

Sur la biopuce le plasmide comportant ce type de lésion est nommé pPso. Nous n'avons pas pu doser le nombre de pontages que nous avons par plasmide, car la méthode de mesure par CLHP-SM/SM de ces lésions n'est pas au point.

6) Plasmide portant des sites abasiques

Le plasmide qui porte les sites abasiques est nommé pAbaS. Ils font partie des lésions qui se forment spontanément dans l'ADN, et leurs conséquences peuvent être graves car ils sont potentiellement mutagènes et bloquent la transcription ainsi que la

réplication¹¹². Dans la cellule, ils sont pris en charge par la réparation par excision de bases.

Les conditions que nous avons utilisées pour former les sites abasiques sont basées sur une forte température et un pH acide. Dans ces conditions, leur formation spontanée est fortement accélérée (**Figure 26**).

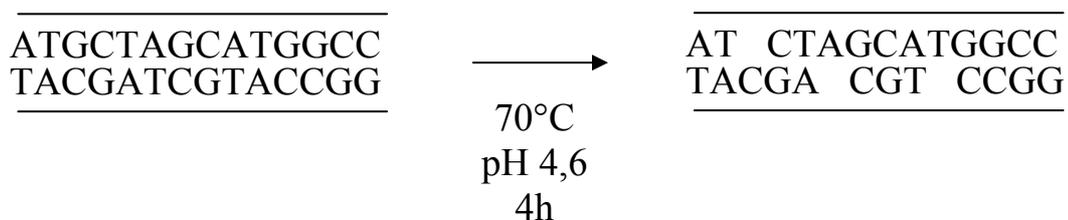


Figure 26 : Principe de formation des sites abasiques

Pour réaliser les dosages des sites abasiques, nous les avons tout d'abord digérés avec l'Endo VII ou la T4 endonucléase, puis nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose des plasmides. Si un plasmide possède un site abasique et que ce dernier est digéré alors le plasmide passe de la forme circulaire super enroulée à la forme circulaire qui migre moins rapidement lors de l'électrophorèse. A l'aide de cette méthode, nous avons pu montrer que 50% des plasmides traités présentaient un site abasique, et que, par conséquent, la population de plasmides pAbaS comporte 0,5 sites abasiques.

D) Organisation des dépôts sur la biopuce

Au cours de cette étude, deux formats ont principalement été utilisés. Un format que nous appellerons 9x9 (4 mm x 4 mm) formant un carré de neuf dépôts par neuf dépôts, et un autre format de vingt dépôts par quatre nommé 20x4 (8,5 mm x 1,5 mm). L'agencement des dépôts de chaque format a été dicté par le format des chambres d'incubation que nous avons utilisées pour réaliser les réactions. Dans le cas du format 9x9 les chambres de réaction, de par leur taille, ne permettaient de faire que trois biopuces par lames, et leur volume était de 25 μ l. Le format 20x4 a alors été adopté lorsque nous avons fait faire des caches comportant six chambres de réaction,

permettant donc réaliser six biopuces par lame support avec un volume réactionnel de 20 µl.

Les deux types de dépôt sont composés des plasmides précédemment décrits, à savoir pControl, pCPD-64 (pCPD-64* pour le format 9x9), p8oxo (p8oxo* pour le format 9x9), pAlkB, pCisP, pPso, pAbaS, pThymG (parfois non présent sur les biopuces au format 9x9). Dans les deux formats, les plasmides comportant les dommages sont déposés en tripliqua et en trois dilutions 1/2, 3/4 et 1 respectivement appelées A, B, et C. Les dilutions des plasmides sont réalisées dans du plasmide contrôle afin de garder constante la quantité d'ADN du dépôt. Ces dilutions permettent de vérifier que les activités enzymatiques sont dépendantes de la quantité de dommages, ce qui renseigne sur la spécificité de la réaction. Dix huit dépôts de pControl sont présents sur le format 9x9, alors que dix sept sont déposés pour le format 20x4. Le plan de dépôt des deux formats est présenté ci-dessous **Figure 27**.

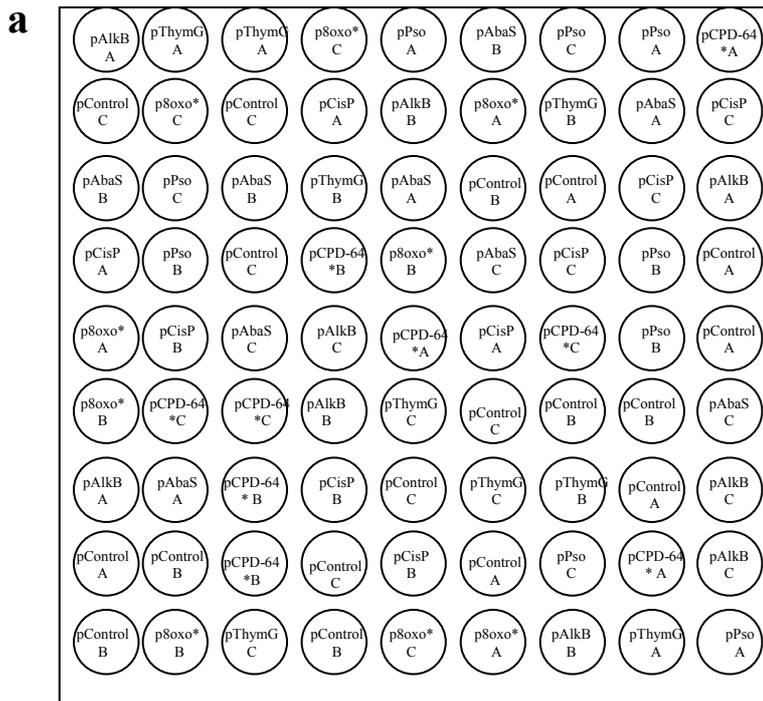
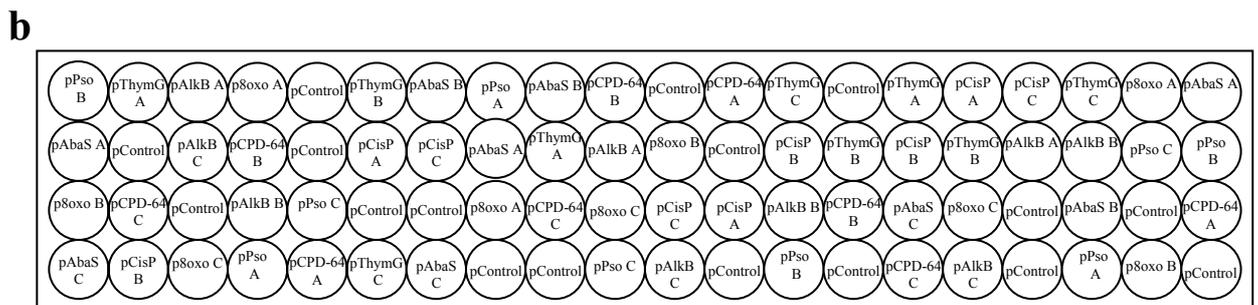


Figure 27 : Présentation des deux formats de dépôts : en **a** le format 9x9 ayant les plasmides pCPD-64* et p8oxo*. En **b** est présenté le format 20x4.



II) Réalisation des dépôts à l'aide du robot de dispense

A) Le robot de dispense ScieFlexarrayer

1) Présentation du robot et caractéristiques techniques

Pour réaliser les dépôts sur support, nous avons utilisé le robot de dispense ScieFlexarrayer de la société Scienion. Ses caractéristiques techniques sont :

- La possibilité de déposer des échantillons sur 24 lames support
- L'utilisation de la technologie piézoélectrique pour réaliser la dispense.
- L'utilisation de servos magnétiques linéaires pour les déplacements du bras mobile (vitesse de déplacement : 16 cm.s^{-1} ; précision : $5 \text{ }\mu\text{m}$).
- Les déplacements de liquide sont tous réalisés à l'aide de pompes péristaltiques, que ce soit pour le lavage de la buse ou pour l'aspiration/évacuation de l'échantillon.
- Une enceinte de protection évite que les particules présentes dans l'air ne se déposent sur la zone de travail, et permet de maintenir, à l'aide d'un humidificateur, une hygrométrie constante.

2) Fonctionnement du robot

Le robot de dispense est composé de plusieurs organes décrits sur la **figure 28**. La réalisation des dépôts se déroule comme suit :

C'est au niveau de la buse de dispense en verre (1) que les gouttes de solution à déposer sont émises. Un bras mobile permet de déplacer la buse de dispense (2), et ainsi d'aller prélever l'échantillon au niveau de la plaque 96 puits (3) grâce à la pompe péristaltique d'aspiration/évacuation (4). Une caméra (5) permet alors de s'assurer que la buse dispense de manière correcte les gouttes. Le dépôt des plasmides sur les lames supports peut alors avoir lieu (6). Une fois que les dépôts d'un échantillon ont été réalisés, la buse de dispense est alors nettoyée au niveau de la station de lavage (7), l'extérieur de la buse est lavé par de l'eau envoyée par la pompe péristaltique de lavage (8), l'intérieur de la buse est aussi nettoyé par de l'eau mais envoyée par la pompe d'aspiration/évacuation. Le processus reprend alors pour l'échantillon suivant.

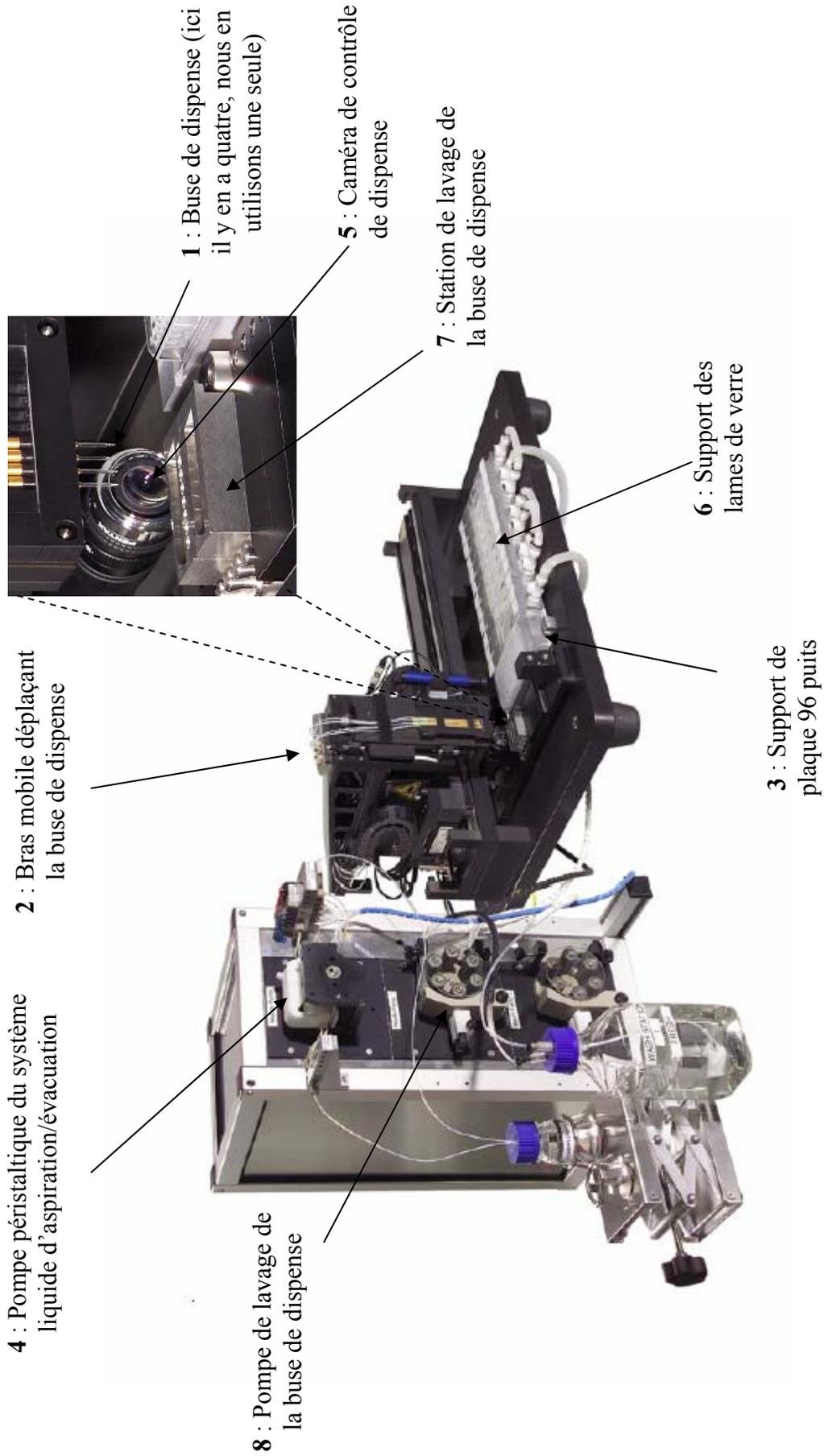


Figure 28 : Photo du robot ScieFlexarray que nous utilisons pour réaliser les dépôts, il est présenté sans son enceinte de protection

3) La technologie de dispense piézoélectrique

La technologie piézoélectrique est une technologie de pointe pour la réalisation de dispense de volume de l'ordre du pico litre. Elle a été développée à la base pour les imprimantes à jet d'encre et bénéficie donc de longues années de développement et d'améliorations techniques. Lorsque les biologistes ont voulu réaliser des dispenses de faible volume, c'est tout naturellement qu'une partie d'entre eux s'est tournée vers cette méthode, l'autre partie s'étant tournée vers la réalisation des dépôts par contact.

Cette technologie tire profit des caractéristiques physiques des cristaux piézoélectriques qui ont la capacité de se contracter s'ils sont parcourus par un courant électrique. C'est cette contraction qui est utilisée au niveau de la buse de dispense en verre pour expulser sous forme de gouttes le liquide que l'on veut déposer. On peut observer sur la **Figure 29** la formation et l'éjection au niveau de la buse d'une goutte de liquide.

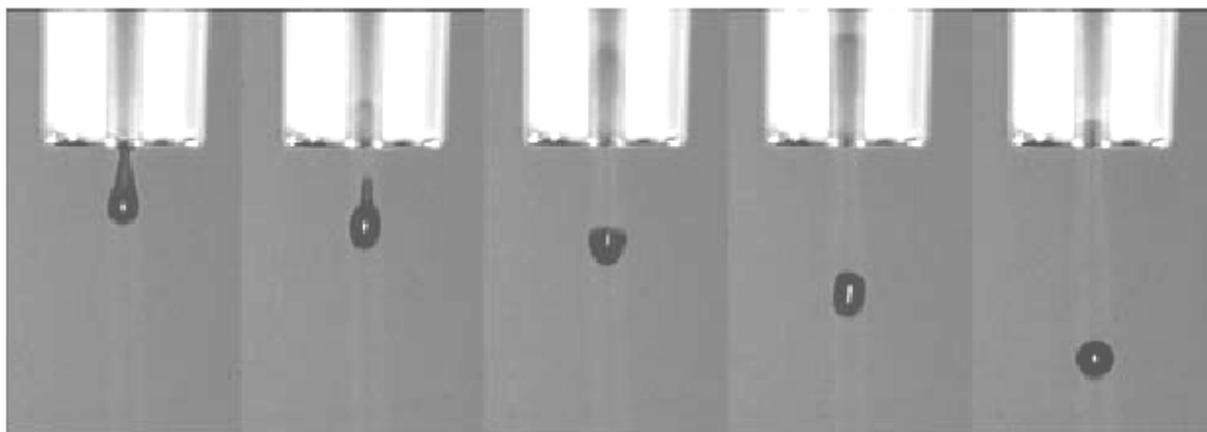


Figure 29 : Images obtenues à l'aide de la caméra du robot montrant la formation et l'expulsion des gouttes au niveau de la buse de dispense. Le diamètre de la buse de dispense est de 50 μm .

Le fait que l'éjection de la goutte soit produite par un courant électrique donne à l'utilisateur la possibilité de contrôler plusieurs paramètres. Ainsi, avec le logiciel de pilotage du robot, on peut facilement choisir le nombre de gouttes que l'on veut réaliser par dépôt. Mais nous avons aussi accès aux paramètres de réglage agissant sur les caractéristiques physiques de la goutte. En jouant sur le voltage et la durée du courant qui est envoyé au cristal piézoélectrique, il nous est possible de régler le volume et la vitesse de sortie de la goutte. Le volume typique des gouttes que nous utilisons est de 500 pl.

Le système de dispense piézoélectrique présente de nombreux avantages. Tout d'abord, comme nous venons de le voir, il offre un contrôle total sur les caractéristiques physiques des gouttes et donc du volume du dépôt. De plus, la dispense piézoélectrique est très rigoureuse, à savoir que le volume des gouttes expulsées est assez stable au cours des différentes dispenses. Enfin, le dernier avantage est qu'il n'y a pas de contact lors de la réalisation du dépôt. Cet avantage est particulièrement important dans notre cas car nous avons choisi de déposer les plasmides sur un gel potentiellement fragile.

Cette technologie souffre cependant d'un inconvénient majeur lié aux problèmes inévitables de micro-fluidiques qui apparaissent dès que des faibles volumes de solution doivent être déplacés dans des capillaires de diamètre réduit. Aussi, la formation de bulles d'air ou l'accumulation de particules contaminantes peuvent perturber fortement la dispense du liquide. Lors de l'utilisation du robot, une attention toute particulière doit donc être apportée à ces sources potentielles de problèmes.

B) Mise au point des paramètres de dépôt

Avant de fabriquer les biopuces, nous avons dû régler le robot et nous assurer que nous étions dans des conditions optimales. Plusieurs éléments ont été vérifiés et sont présentés dans cette partie.

1) Le lavage de la buse de dispense

Le lavage de la buse de dispense est très important car c'est une étape qui doit permettre d'éliminer toute trace de l'échantillon qui vient d'être déposé, et ainsi éviter la contamination des dépôts de l'échantillon suivant. Le lavage doit donc permettre l'élimination du volume d'échantillon aspiré ainsi que les molécules qui peuvent rester piégées dans les microporosités de la buse de dispense.

Le robot offre la possibilité de laver l'extérieur de la buse de dispense, mais aussi l'intérieur. Pour le lavage de l'intérieur de la buse, l'aspiration de l'échantillon se fait grâce au système liquide qui est sous le contrôle de la pompe péristaltique d'aspiration/évacuation. Ce système liquide est composé d'eau, il existe donc par

conséquent une interface entre l'eau et l'échantillon d'intérêt. Lorsque la pompe du système liquide vide l'échantillon, il est le premier à être éliminé, puis c'est l'eau du système liquide qui sort (**Figure 30**).

Le premier paramètre que nous pouvons régler est la durée et la puissance avec laquelle l'échantillon est vidé, ceci permet de contrôler le lavage interne de la buse : plus ce temps est long et plus de l'eau du système liquide aura nettoyé les parois de la buse. Le second paramètre est la puissance de la pompe de lavage et la durée pendant laquelle la buse est lavée, on peut ainsi régler le débit de l'eau de lavage qui va nettoyer l'extérieur de la buse.

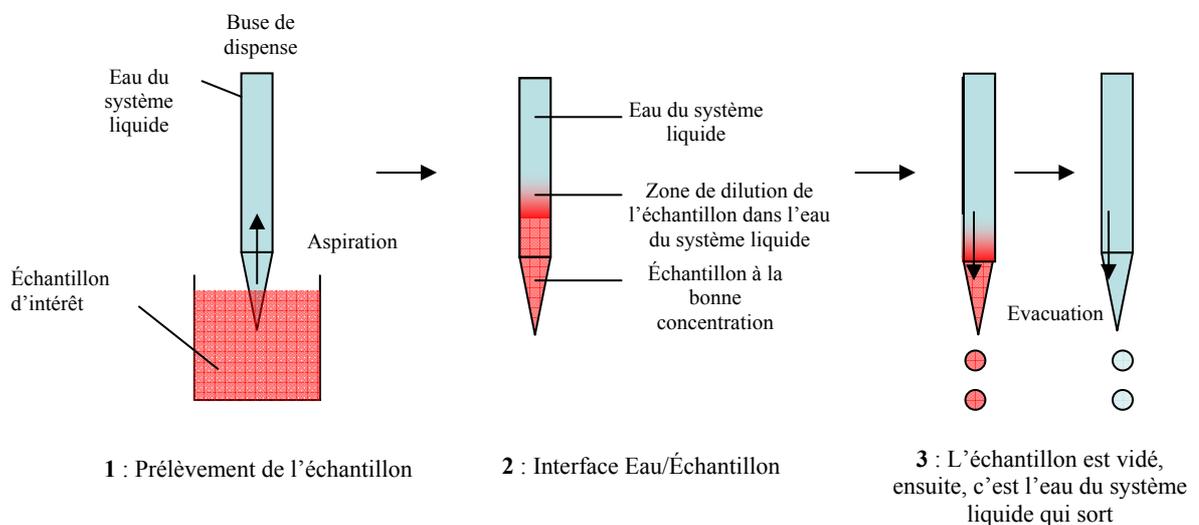


Figure 30 : Fonctionnement du système d'aspiration et de vidage de l'échantillon

Nous avons choisi de mettre au point un lavage long et basé sur deux étapes, afin de diminuer au maximum les contaminations. Voici brièvement son déroulement :

- Tout d'abord, la buse de dispense vide son contenu au dessus de la station de lavage.
- La buse est ensuite plongée dans la station de lavage où de l'eau nettoie l'extérieur du capillaire. Pendant ce temps la buse continue de vider son contenu tout en étant soniquée.

Pour tester l'efficacité de ce lavage, nous avons réalisé des dépôts alternés de solutions de nucléotide fluorescent (dUTP-Cy5) et d'eau : le robot déposant d'abord une solution de nucléotide fluorescent puis l'eau. Les résultats de l'expérience sont présentés sur la **Figure 31**. On observe qu'il n'y a pas de signal fluorescent au niveau des dépôts de solution d'eau. Ceci nous indique donc que le programme de lavage de

la buse de dispense que nous avons mis au point est suffisamment efficace pour qu'il n'y ait pas de contamination lors des prélèvements successifs de solutions.

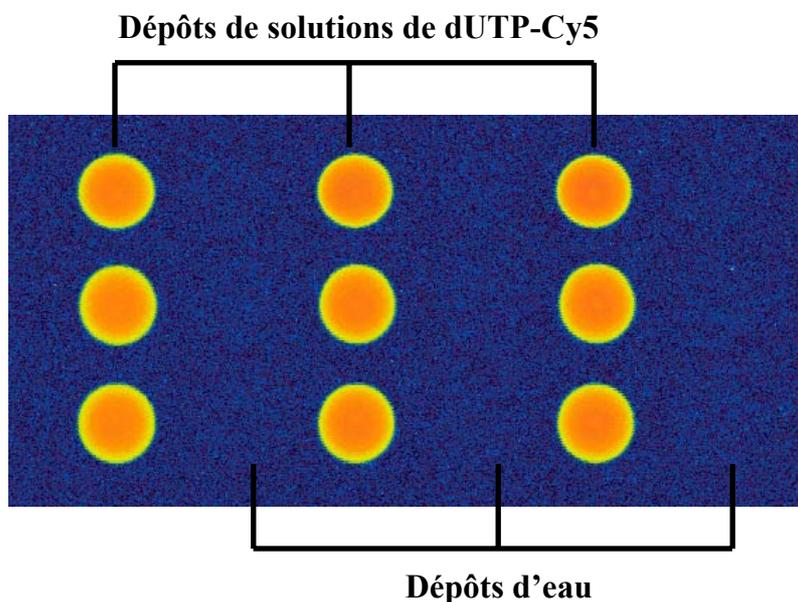


Figure 31 : Test du programme de lavage utilisé lors de la réalisation de dépôts. Trois solutions de dUTP-Cy5 1 mM au 1/20000 ont été déposées en alternance avec des solutions d'eau sur une lame d'hydrogel. La lecture a été effectuée avec un gain PMT de 430 et une puissance de laser de 100%

2) Choix du nombre de gouttes par dépôt

La technologie piézoélectrique offre la possibilité de choisir le nombre de gouttes que l'on veut par dépôt. Dans un souci d'optimisation, nous avons voulu savoir si le nombre de gouttes pouvait avoir une influence sur la qualité des dépôts. Nous avons donc mis au point une expérience qui nous a permis de mesurer l'écart-type des dépôts intra et inter-biopuces. Pour cela, nous avons réalisé trois séries de biopuces en duplicate. Sur la première série, les dépôts sont réalisés à partir d'une seule goutte, de deux gouttes sur la deuxième et de trois gouttes sur la troisième. L'échantillon que nous avons utilisé est une solution de dUTP-Cy5 à 1 mM, qui a été déposée sur chaque biopuce en quatre dilutions : 1/64000, 1/16000, 1/8000, 1/4000, pour chaque dilution six dépôts sont présents par biopuce et permettent ainsi de calculer des écarts-types.

Nous avons tout d'abord étudié l'effet du nombre de gouttes sur la variabilité de la fluorescence des dépôts intra-biopuce. Pour cela, le pourcentage d'écart-type des dépôts d'une même dilution a été calculé pour chaque série de biopuce, et reporté sur la **Figure 32**. Le pourcentage d'écart type correspond au pourcentage de la valeur de l'écart-type par rapport à la valeur de l'intensité de fluorescence.

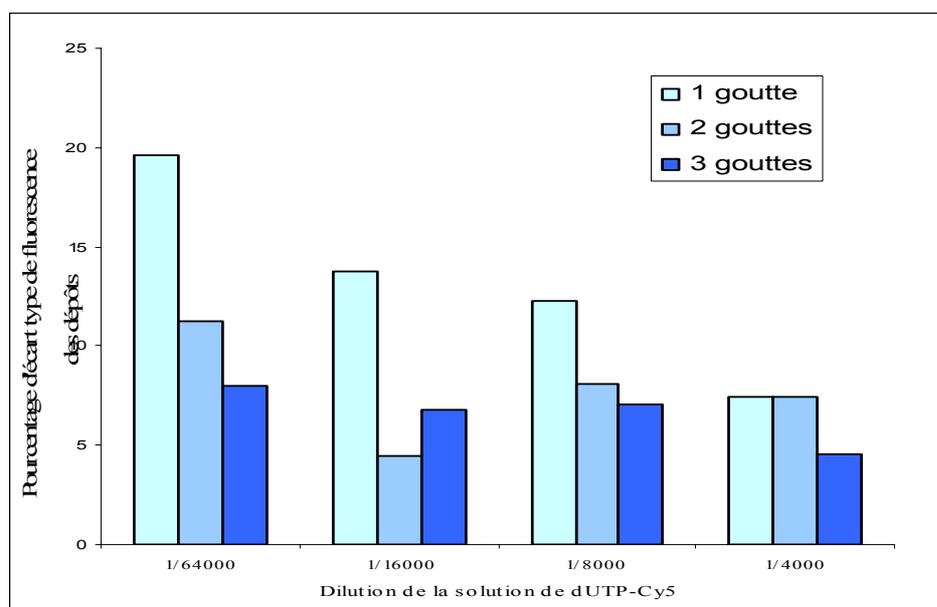


Figure 32 : Test de l'effet du nombre de gouttes sur le pourcentage d'écart-type de fluorescence des dépôts d'une même biopuce. L'historgramme présente le pourcentage d'écart-type de fluorescence des dépôts de différentes dilutions de solution de dUTP-Cy5 obtenus avec 1, 2 ou 3 gouttes par dépôt.

On constate que pour les dépôts réalisés avec une seule goutte, le pourcentage d'écart type est dépendant de la dilution et qu'il est supérieur à celui des dépôts réalisés avec deux gouttes ou trois gouttes. Ce lien entre les pourcentages d'écart-type des dépôts et la dilution de la solution de Cy5 disparaît à mesure que le nombre de gouttes augmente. Avec trois gouttes par dépôt, on observe un pourcentage d'écart-type inférieur à 10% et indépendant de la dilution.

Nous avons ensuite comparé les signaux de fluorescence obtenus entre les deux biopuces dupliqua d'une même série, afin d'observer si le nombre de gouttes par dépôt avait aussi un effet sur la reproductibilité inter biopuces. Sur la **Figure 33** est présenté le niveau de fluorescence des dilutions des dupliquas de chaque série de biopuces.

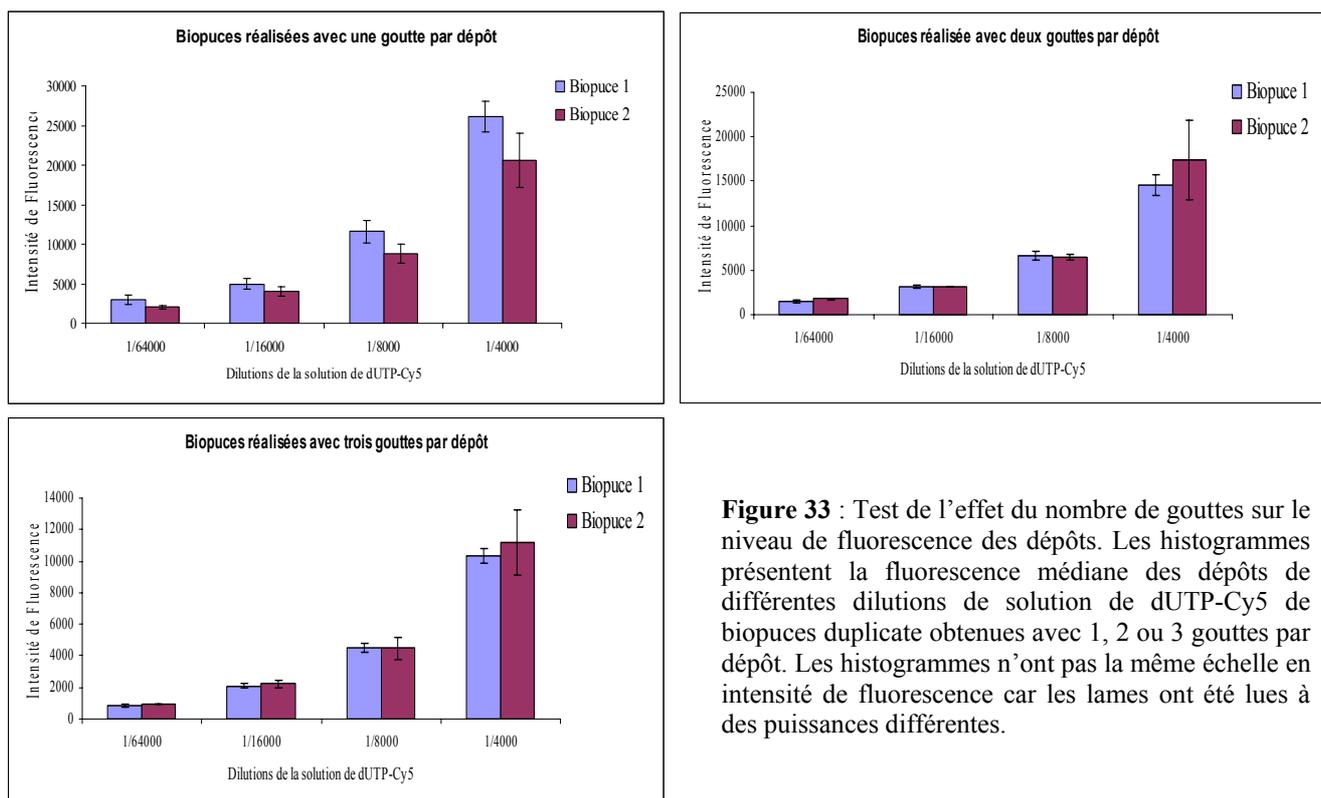


Figure 33 : Test de l'effet du nombre de gouttes sur le niveau de fluorescence des dépôts. Les histogrammes présentent la fluorescence médiane des dépôts de différentes dilutions de solution de dUTP-Cy5 de biopuces duplicate obtenues avec 1, 2 ou 3 gouttes par dépôt. Les histogrammes n'ont pas la même échelle en intensité de fluorescence car les lames ont été lues à des puissances différentes.

On observe que le nombre de gouttes par dépôt a aussi un effet sur la reproductibilité des signaux inter biopuces. Lorsque les dépôts sont réalisés avec une goutte, le niveau de fluorescence des biopuces en dupliqua n'est pas identique : on observe un écart d'environ 18%, lorsque le nombre de gouttes par dépôt est augmenté cet écart diminue. Pour les dépôts réalisés avec trois gouttes, il n'y a pratiquement plus d'écart entre le niveau de fluorescence de deux biopuces de la même série.

Nous pensons que ces effets observés, en rapport avec le nombre de gouttes par dépôt, sont dus à de petites erreurs de volume qui peuvent avoir lieu lors de la dispense. Le fait d'augmenter le nombre de gouttes par dépôt diminue l'effet de ces erreurs car elles sont alors réparties de manière statistiquement homogène sur l'ensemble des dépôts des biopuces.

3) Choix du volume de prélèvement

Le volume de prélèvement de l'échantillon à déposer est un facteur non négligeable. Bien souvent l'échantillon est précieux, et on désire en consommer le moins possible afin de faire plusieurs séries de biopuces. Cependant il faut être sûr que

le volume de prélèvement que l'on utilise est suffisant pour réaliser le nombre de dépôts désiré. En effet, étant donnée la conception du robot, il est très aisé de déposer plus de liquide que ce qu'il avait été aspiré d'échantillon, dans ce cas précis des dépôts d'eau du système liquide sont réalisés.

Nous avons calculé le volume total théoriquement nécessaire pour réaliser les dépôts d'une solution sur 24 lames possédant chacune six biopuces ayant trois gouttes déposées par dépôt et les dépôts répétés six fois. A ce volume s'ajoute le volume des gouttes dispensées devant la caméra pour s'assurer du bon fonctionnement de la buse. Nous avons trouvé qu'un volume théorique de 1,5 μl de solution était nécessaire. Ce volume est le volume minimal. Il ne faut pas perdre de vue qu'une zone d'interface entre l'échantillon et l'eau du système liquide existe, et qu'elle conduit à la dilution de l'échantillon. Cette dilution est en plus dépendante du temps, elle sera plus faible lorsque le robot réalisera les dépôts sur la lame 1 que lorsqu'il réalisera les dépôts sur la lame 24. Dans un souci de sécurité, nous avons décidé de prélever 4 μl de solution.

Afin de vérifier si ce volume était suffisant nous avons réalisé les dépôts de trois solutions de dUTP-Cy5 sur 24 lames, nous avons ensuite comparé les valeurs de fluorescence des spots de la première lame avec ceux de la dernière lame. Les résultats sont présentés sur la **Figure 34**.

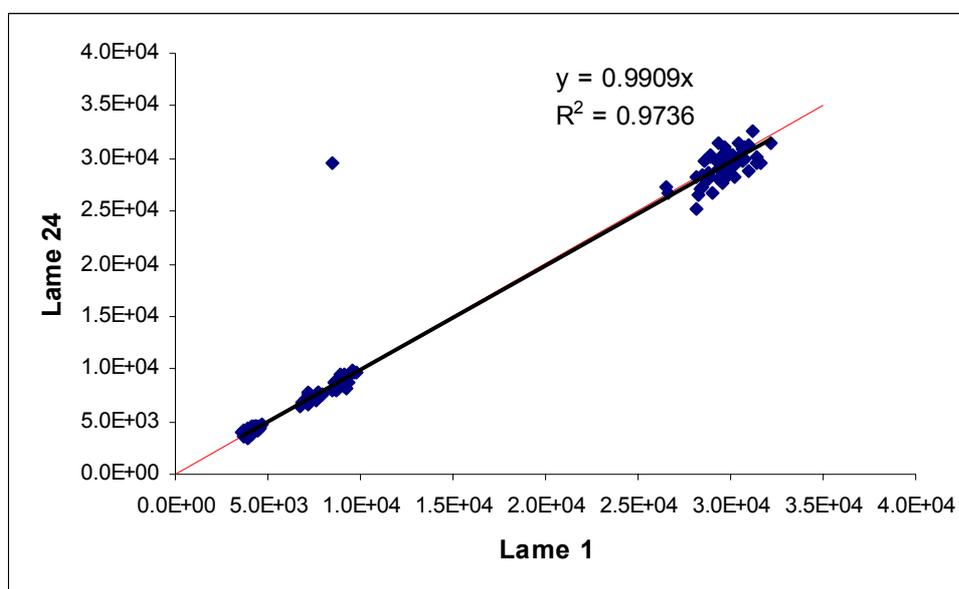


Figure 34 : Test du volume de prélèvement, trois solutions de dUTP-CY5 1 mM au 1/20000, 1/40000, 1/80000 sont déposées sur la lame 1 et 24. Les lames ont été lues avec un gain PMT de 430 et une puissance de laser de 100%. En abscisse sont représentées les valeurs de fluorescence médiane de la lame 1, en ordonnée celles de la lame 24.

Il est remarquable d'observer que la droite de régression des nuages est pratiquement égale à $Y=X$ avec un R^2 proche de 1, ce qui indique que la lame 24 ne présente pas une fluorescence inférieure à celle de la lame 1. La quantité d'échantillon aspirée pour la réalisation des biopuces est donc suffisante.

4) Conditionnement de la buse de dispense et reproductibilité

Le conditionnement de la buse de dispense en verre est un processus complexe que nous allons brièvement aborder. Ce phénomène est lié à des réactions qui peuvent modifier les propriétés de chimie de surface du verre de la buse. Le conditionnement de la buse joue directement sur la reproductibilité des dépôts. Aussi, avant toute série de dépôt, il est conseillé de faire dispenser plusieurs minutes de l'eau du système liquide afin de conditionner de la buse. Nous avons observé lors de l'utilisation du robot que l'écart-type du niveau de fluorescence de dépôts d'une solution de dUTP-Cy5 1 mM au 1/20000 peut aller de 16% avec une buse de dispense non conditionnée à 3% avec une buse conditionnée. Avant toute série de dépôts, nous nous sommes imposé d'avoir un écart type de dépôt inférieur à 6%.

III) Le support utilisé pour réaliser la biopuce

Le choix du support est un élément déterminant lors de la réalisation d'une biopuce, il doit répondre à plusieurs critères :

- Permettre au dépôt d'avoir une bonne morphologie
- Avoir un faible niveau de bruit de fond
- Avoir un pouvoir de fixation des molécules déposées important
- Permettre une bonne conservation du matériel déposé

Une très grande gamme de supports a été développée spécialement pour les applications biopuces. Généralement, ce sont des lames de verre du même format que celles utilisées en microscopie, possédant un traitement de surface spécifique.

Les toutes premières utilisées furent les lames recouvertes de Poly-L-Lysine, les charges positives dues à la présence de Lysine sur leur surface en font d'excellentes lames pour fixer de l'ADN. D'autres lames ont été développées possédant différentes chimies de surface : aldéhydes, époxy, or.

Récemment, la société Perkin Elmer a développé un nouveau type de lames recouvertes d'une fine couche d'hydrogel (20 μm). Cette technologie destinée à la fabrication de biopuces à protéines présente l'avantage d'offrir un véritable maillage en trois dimensions permettant aux réactions enzymatiques d'avoir lieu dans de meilleures conditions.

A) Lames de Poly-L-Lysine ou lames Hydrogel

1) Morphologie des dépôts

Lors de la mise au point de la biopuce, nous avons testé deux types de support, les lames de Poly-L-Lysine et les lames Hydrogel. Le premier facteur que nous avons testé était la morphologie des dépôts obtenus avec l'un ou l'autre des deux supports. Pour cela, nous avons déposé une solution de dUTP-Cy5 1 mM au 1/20000 sur chacun des deux supports, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 35**.

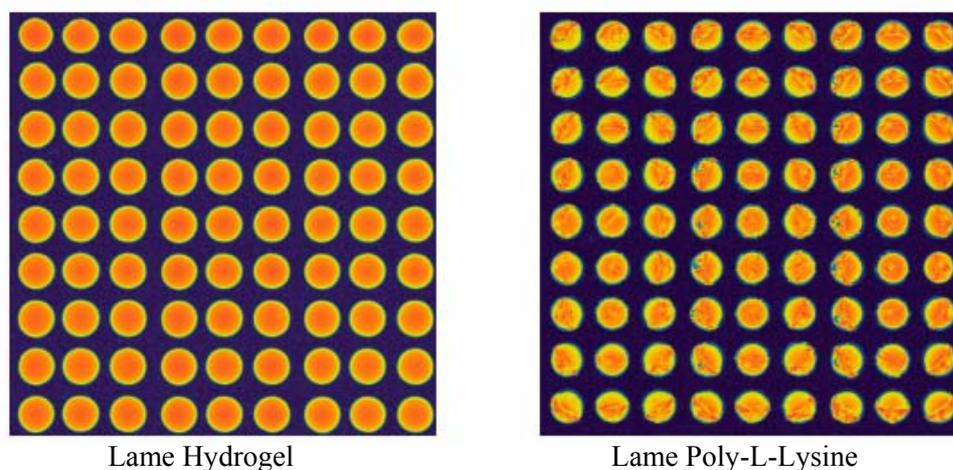


Figure 35 : Comparaison des dépôts d'une solution de dUTP-Cy5 1 mM au 1/20000 obtenus soit sur une lame Hydrogel, soit sur une lame de Poly-L-Lysine.

Il est frappant de constater que la lame Hydrogel présente des dépôts d'une morphologie très ronde et homogène, alors que ceux de la lame de Poly-L-Lysine ne sont pas homogènes et de formes moins circulaires. La morphologie des dépôts et la répartition du matériel est très importante car elle peut avoir un effet lors de la quantification.

2) Signal de réparation obtenu

Nous avons ensuite réalisé une série de dépôts de plasmides comportant des lésions sur chacun des types de lame afin d'observer le signal obtenu. Les lames, avant d'être utilisées, ont été stockées au réfrigérateur à 4°C. Avec les lames de Poly-L-Lysine, un signal spécifique est obtenu même si le test est fait le jour même de la réalisation des dépôts (**Figure 36**). En effet, excepté pour le cisplatine et le psoralène, les niveaux de réparation sont supérieurs à celui du plasmide non lésé, et ils sont dépendants de la quantité de dommages présents sur les plasmides. Il est aussi intéressant de noter que le bruit de fond n'est pas homogène sur la lame, il a tendance à se concentrer autour des dépôts.

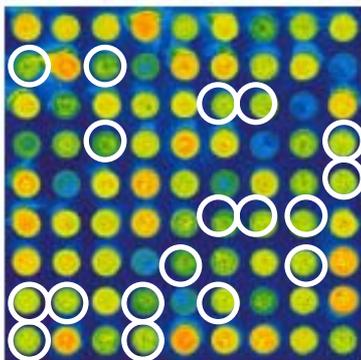
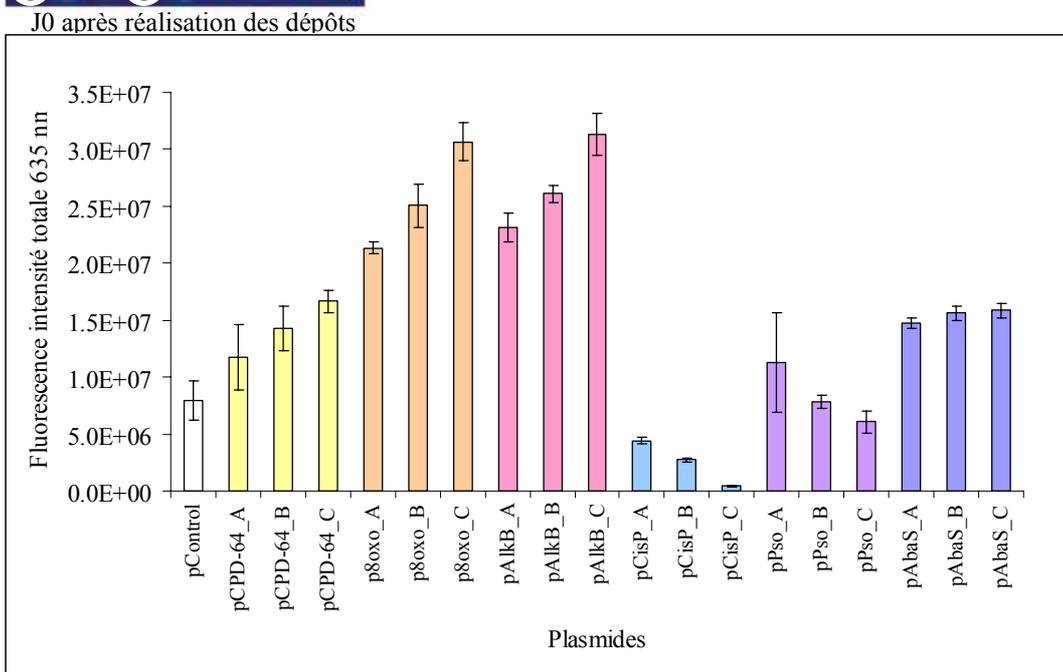
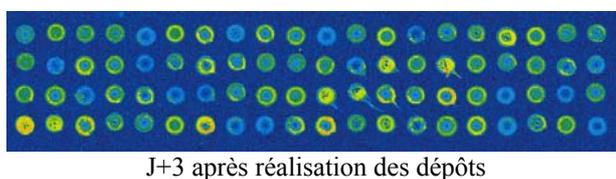


Figure 36 : Test d'activité de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml final pendant 3h à 30°C sur une biopuce au format 9x9 réalisée sur lame de Poly-L-Lysine. Le test est réalisé le jour même de la réalisation des dépôts J0. A gauche, l'image obtenue après lecture de la biopuce, les plasmides pControl sont cerclés en blanc. En bas, le profil de réparation des différentes lésions présentes sur la biopuce.

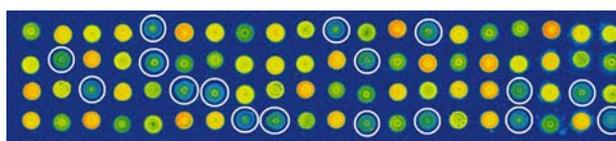


Dans le cas des lames hydrogel, elles ne sont pas utilisables directement après que les dépôts aient été réalisés. Comme on peut le constater sur la **Figure 37**, les signaux de réparation obtenus à J3 après la réalisation des dépôts sont particulièrement faibles. Nous avons observé qu'une période était nécessaire afin d'avoir un signal fort. Dans

l'exemple de la **Figure 36**, ils sont obtenus à J+10. Cette période correspond à la durée nécessaire pour la fixation par absorption des plasmides sur le support, elle est variable en fonction des lots de lames hydrogel et peut aller d'une semaine à un mois. Une fois que cette période est dépassée, les signaux de réparation obtenus sont spécifiques car ils sont dépendants de la quantité de lésions. De plus, le niveau de réparation du plasmide contrôl est particulièrement bas (**Figure 37**). Enfin le bruit de fond est faible et homogène sur l'intégralité de la surface de la biopuce. Ici, nous comparerons les profils de réparation obtenus avec les lames Poly-L-Lysine et hydrogel, les deux formats de biopuce étant différents.

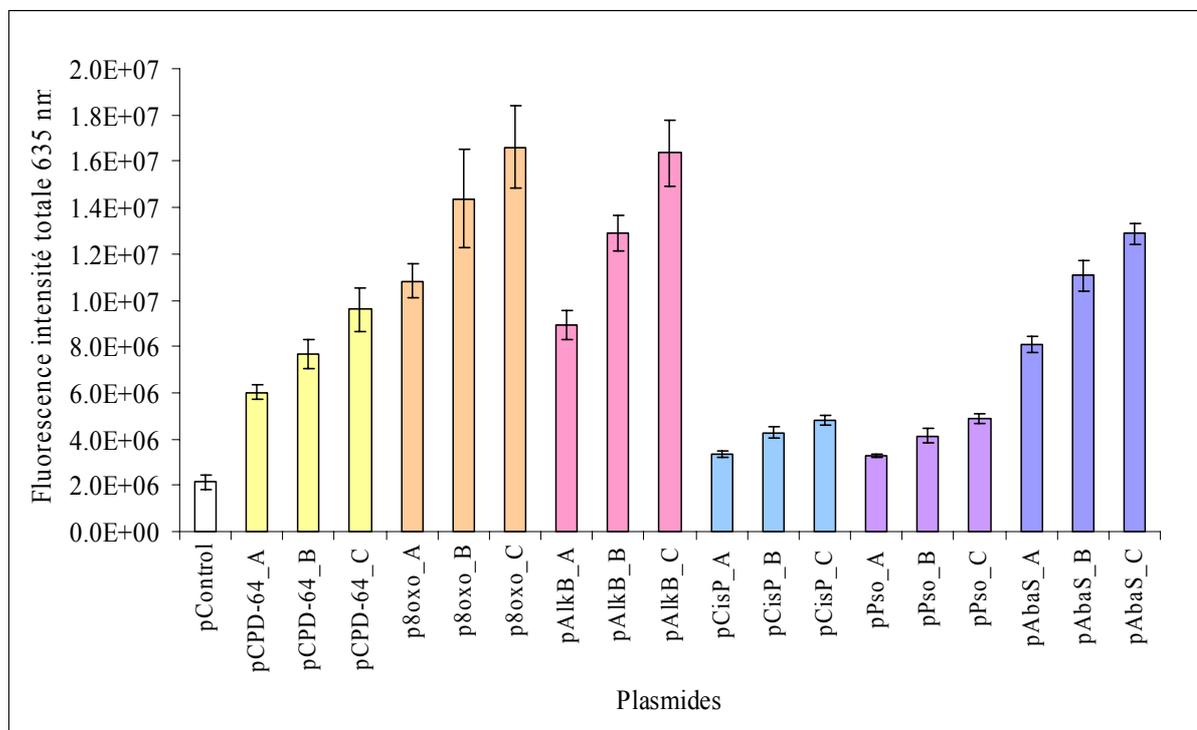


J+3 après réalisation des dépôts



J+10 après réalisation des dépôts

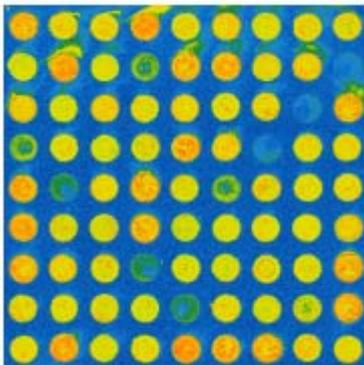
Figure 37: Test d'activité de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml pendant 3h à 30°C sur une biopuce au format 20x4 réalisée sur lame Hydrogel. A gauche images obtenues après la lecture des biopuces, les plasmides pControl sont cerclés en blanc. La réaction de réparation a été faite soit 3 jours après la réalisation des dépôts, soit 10 jours après. En bas, le profil de réparation d'extraits nucléaires HeLa obtenu lors de la réaction faite 10 jours après la réalisation des dépôts.



3) Conservation des plasmides sur le support

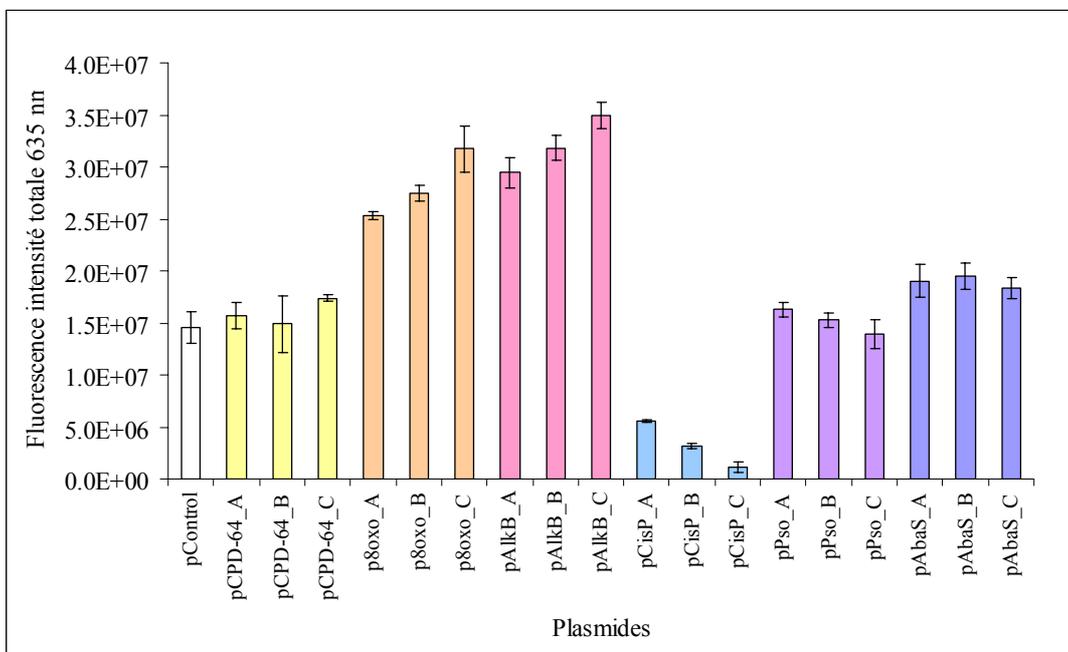
Nous avons ensuite voulu savoir quelles étaient les capacités de conservation des plasmides sur l'un et l'autre des supports, pour cela, nous avons répété l'expérience à J+1 pour la lame de Poly-L-Lysine, et J+11 pour la lame Hydrogel.

Dans le cas des lames de Poly-L-Lysine, le profil de réparation obtenu à J+1 montre que le niveau de réparation du plasmide témoin a fortement augmenté, de plus, la réparation n'est plus dépendante du nombre de lésions par plasmide (**Figure 38**). Tout ceci indique une mauvaise conservation des plasmides sur lame de Poly-L-Lysine. Le fait que la réponse ne soit plus spécifique suggère que les plasmides doivent être endommagés, probablement par des cassures simples ou double brin.



J+1 après réalisation des dépôts

Figure 38 : Test d'activité de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml pendant 3h à 30°C sur biopuce au format 9x9 réalisée sur lame de Poly-L-Lysine. Le test est réalisé un jour après la réalisation des dépôts (J+1). A gauche, l'image obtenue après lecture de la biopuce. En bas, le profil de réparation des différentes lésions présentes sur la biopuce.



Dans le cas des lames hydrogel (**Figure 39 a**), le profil de réparation obtenu à J+11 est identique à celui obtenu à J+10 (**Figure 39 b**). Le niveau de fluorescence du plasmide contrôle reste bas, et la réparation est toujours dépendante du nombre de dommages par plasmide. Sur la **Figure 39 c**, on constate que la droite de régression du nuage de point des expériences à J+10 et J+11 est pratiquement égale à $Y=X$ ($Y=1,023X$) avec un R^2 proche de 1 (0,9425). Ceci nous montre que les deux expériences donnent des résultats similaires.

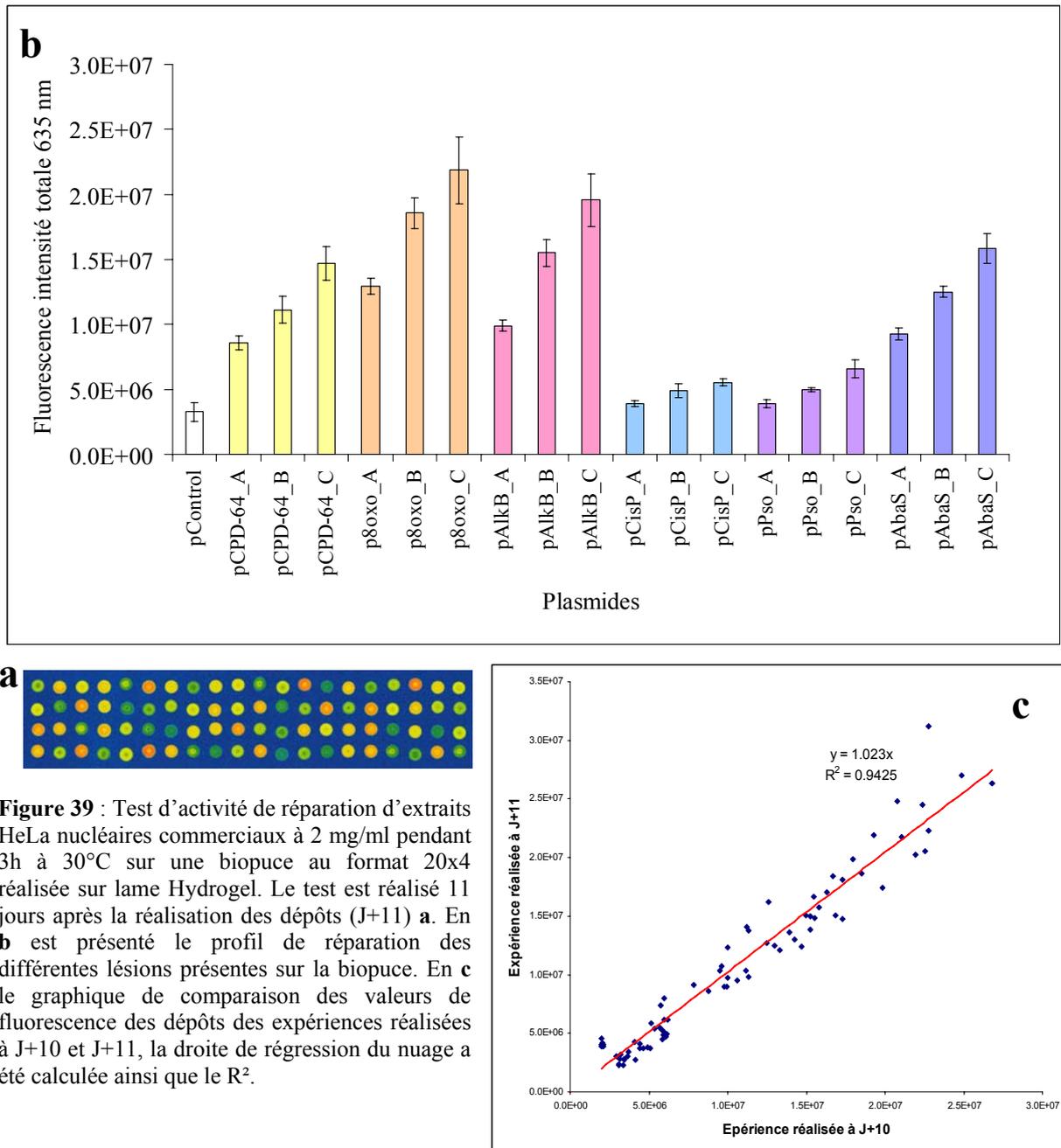


Figure 39 : Test d'activité de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml pendant 3h à 30°C sur une biopuce au format 20x4 réalisée sur lame Hydrogel. Le test est réalisé 11 jours après la réalisation des dépôts (J+11) **a**. En **b** est présenté le profil de réparation des différentes lésions présentes sur la biopuce. En **c** le graphique de comparaison des valeurs de fluorescence des dépôts des expériences réalisées à J+10 et J+11, la droite de régression du nuage a été calculée ainsi que le R^2 .

Pour étudier l'effet du vieillissement à plus long terme des biopuce réalisées sur lame hydrogel, nous avons comparé deux expériences de réparation indépendantes, une à

J+13 après réalisation des dépôts, et une 27 jours plus tard à J+40 (**Figure 40 a**). Comme on peut le constater sur le profil de réparation, l'expérience réalisée à J+40 présente un niveau de réparation de tous les dommages légèrement plus élevé que celui de l'expérience réalisée à J+13. La régression du nuage de points des deux expériences (**Figure 40 c**) est pratiquement égale à $Y=X$ avec un R^2 proche du 1 ce qui indique que les deux expériences présentent une bonne reproductibilité.

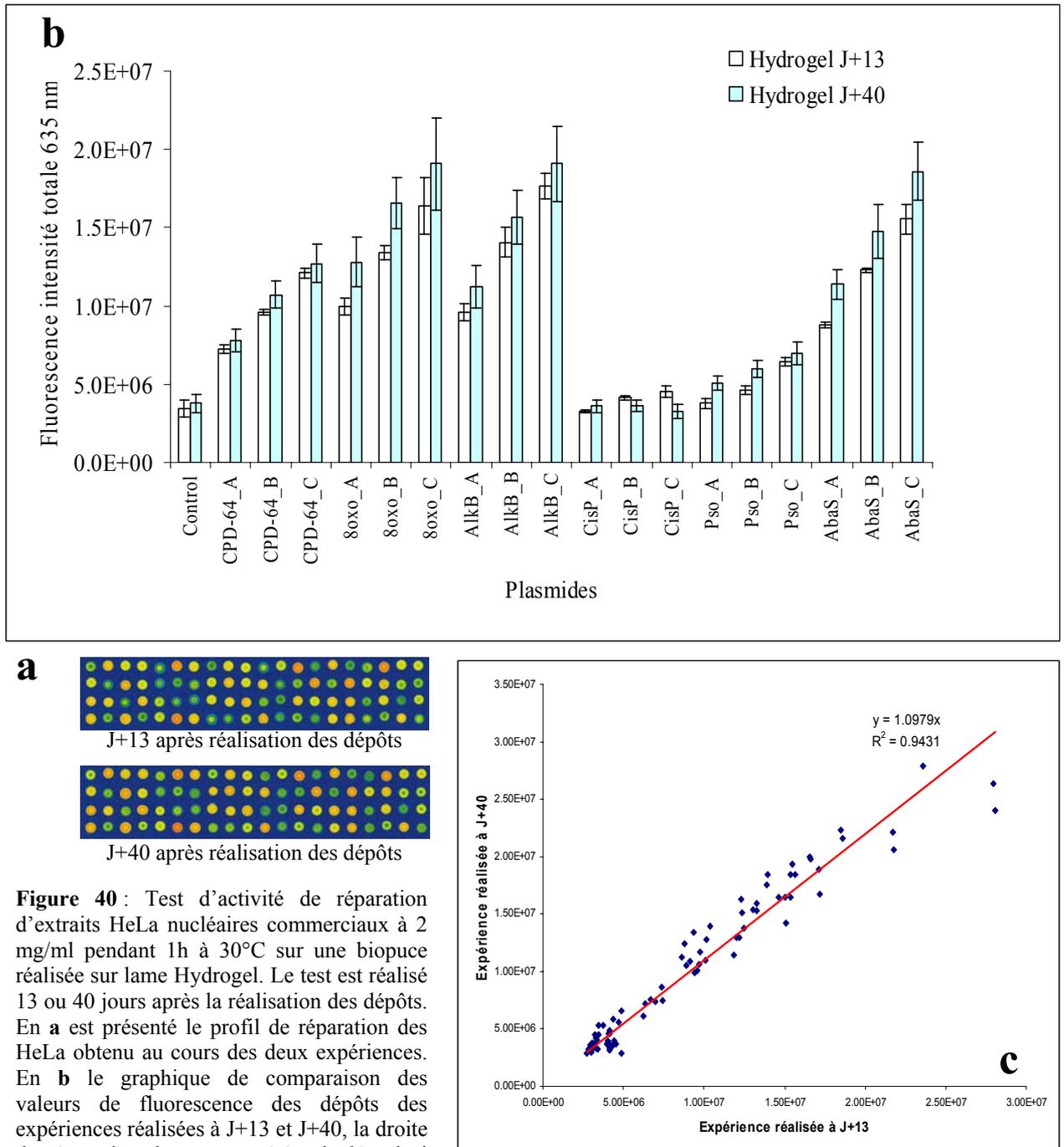


Figure 40 : Test d'activité de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml pendant 1h à 30°C sur une biopuce réalisée sur lame Hydrogel. Le test est réalisé 13 ou 40 jours après la réalisation des dépôts. En **a** est présenté le profil de réparation des HeLa obtenu au cours des deux expériences. En **b** le graphique de comparaison des valeurs de fluorescence des dépôts des expériences réalisées à J+13 et J+40, la droite de régression du nuage a été calculée ainsi que le R^2 .

Expliquer la source exacte de l'écart observé entre les deux expériences peut se relever très délicat, on peut être tenté de l'attribuer au vieillissement des biopuces, mais d'autres facteurs entrent aussi en jeu tels que :

- L'erreur liée aux différences qui existent entre deux lames hydrogel
- L'erreur liée aux manipulateurs : pipetage
- L'erreur liée à la lecture des lames
- L'erreur liée à la solution de nucléotide marqué

Il est donc difficile de conclure sur l'effet que peut avoir le vieillissement sur les biopuces réalisées sur lame d'Hydrogel avec cette expérience, du moins il faudrait réaliser l'expérience plusieurs fois et ce sur plusieurs durées de temps. Cependant l'écart observé sur une période de 27 jours ne semble pas si important compte tenu des nombreux facteurs qui en sont responsables. Nous verrons plus loin que nous avons développé une méthode de normalisation permettant de réduire ces écarts.

4) Conclusion

Pour la suite de l'étude, nous avons donc choisi d'utiliser les lames Hydrogel comme support, ces dernières présentant des avantages en termes de morphologie des dépôts, de bruit de fond, et de conservation que les lames de Poly-L-Lysine n'offrent pas.

B) Analyse par microscopie confocale du support

Nous avons ensuite étudié comment étaient distribués les plasmides dans le gel et où avait lieu la réaction de réparation. L'outil le plus approprié pour réaliser ce type d'étude est la microscopie confocale. Nous avons utilisé la plateforme de microscopie confocale du Département de Réponse et Dynamique Cellulaires (DRDC) du CEA Grenoble dirigée par Didier Grunwald.

1) Présentation de la microscopie confocale

La microscopie confocale a été une véritable révolution du siècle passé dans le domaine de la microscopie optique. Cette technique est basée sur une architecture élaborée comprenant des lasers, des éléments optiques, des dispositifs de balayage rapide et des ordinateurs qui traitent numériquement les images. La microscopie confocale permet à l'utilisateur d'analyser l'intérieur des objets microscopiques et de les visualiser en trois dimensions.

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de pallier à ces inconvénients puisque son principe est de réaliser des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan.

Son principe est le suivant (**Figure 41**): le rayon laser excitateur pénètre dans l'échantillon marqué et excite les molécules fluorescentes. Il y a alors émission de rayons fluorescents au niveau de différents plans de la préparation. Grâce à un diaphragme variable qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner la fluorescence émise par un seul plan de la préparation. Ces rayons sont alors filtrés pour ne garder que la longueur d'onde d'intérêt, ils arrivent enfin à un système de détection par photomultiplicateurs.

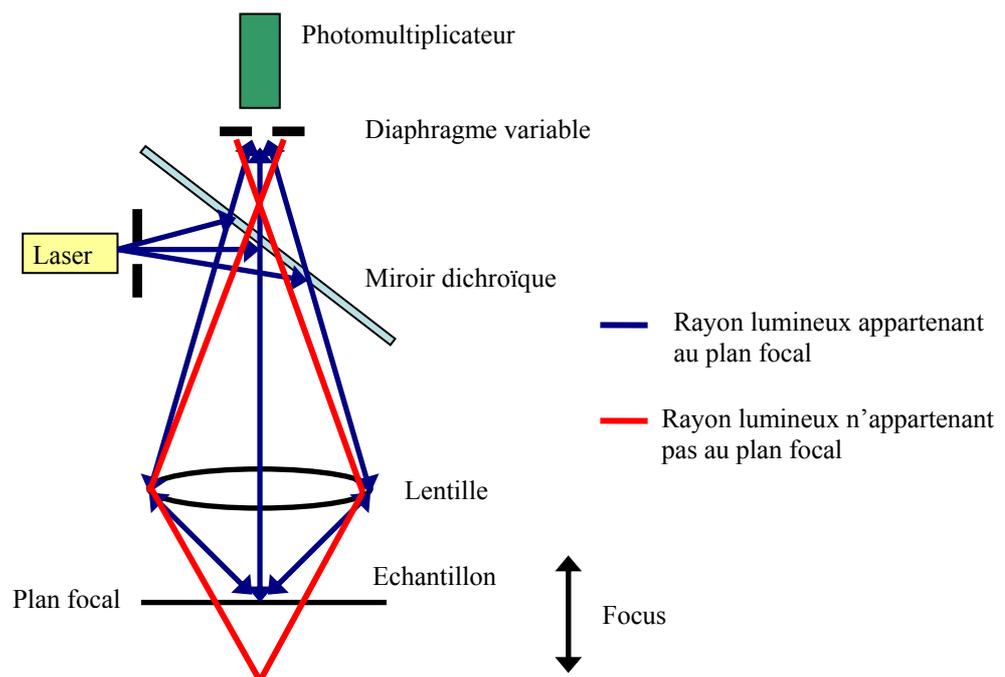


Figure 41 : Principe du microscope confocal

2) Localisation des plasmides et de la réparation dans l'Hydrogel

Pour visualiser comment étaient répartis les plasmides dans le gel, et où avait lieu la réparation, nous avons préparé une biopuce comportant des dépôts de plasmides pCPD-64* mélangés avec des plasmides pControl préalablement marqués au dCTP-Cy3 par « nick translation ». Nous avons ensuite réalisé une réaction de réparation avec des extraits HeLa nucléaires commerciaux en présence de dCTP-Cy5. Nous avons alors la possibilité de mesurer soit la fluorescence émise par le Cy3 qui correspond aux plasmides déposés, soit la fluorescence émise par le Cy5 qui correspond à la réparation. Nous avons ensuite, à l'aide du microscope confocal, réalisé des coupes virtuelles de 0,3 μm dans l'axe Z des dépôts (**Figure 42**).

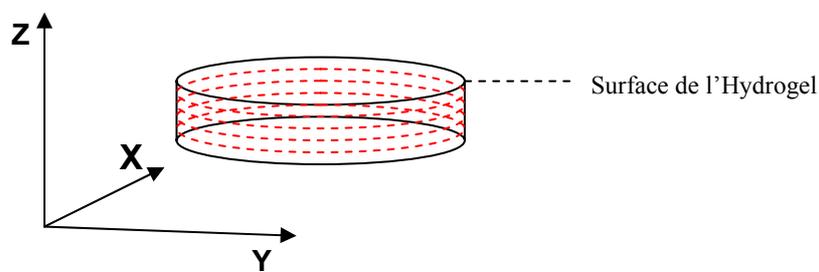


Figure 42 : Schéma présentant l'orientation des coupes réalisées dans le dépôt.

A l'aide du logiciel d'analyse d'image du microscope confocal, il est possible, à partir des différents plans focaux obtenus dans l'axe Z, de reconstituer l'image en coupe du dépôt (**Figure 43**). Les plasmides marqués avec du dCTP-Cy3 apparaissent en rouge alors que le dCTP-Cy5 incorporé lors de la réparation apparaît en bleu. On observe que les plasmides, lorsque les dépôts sont réalisés, pénètrent assez profondément dans le gel, puisqu'on les retrouve jusqu'à 8 μm en dessous de la surface. La réparation quant à elle n'a lieu que dans les trois premiers micromètres du gel. On peut penser que les enzymes de réparation pénètrent difficilement dans les zones profondes à cause du maillage du gel qui peut freiner leur déplacement, ou bien que leur fixation sur les dommages les focalise dans cette zone de surface. Une grande partie des plasmides déposés sur le gel n'est donc pas accessible aux enzymes de réparation et n'est jamais réparée lors des réactions.

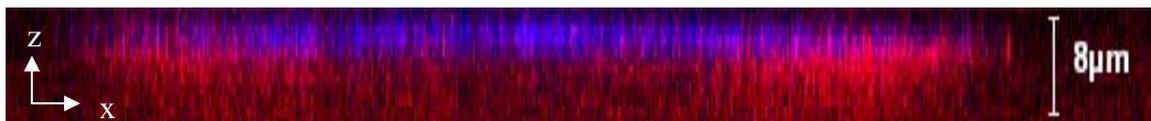


Figure 43 : Reconstitution de la coupe dans l'axe Z d'un dépôt, le signal rouge correspond à la fluorescence des plasmides comportant du dCTP-Cy3, le bleu correspond au signal de fluorescence du dCTP-Cy5 incorporé dans les plasmides pCPD-64 lors de leur réparation. L'échelle de l'axe Z est grossie 2,5 fois. La réaction de réparation a été réalisée avec des extraits HeLa nucléaires commerciaux à 2 mg/ml pendant 3h à 30°C.

Nous avons ensuite renouvelé l'expérience, cette fois afin de réaliser une reconstitution en trois dimensions d'un dépôt et ainsi observer sa forme dans l'espace. Cette reconstitution a été réalisée à l'aide du logiciel de traitement et d'analyse d'images ImageJ et de sa fonction VolumeJ. La **Figure 44** montre trois vues différentes du dépôt reconstitué en trois dimensions. La couleur rouge correspond à la fluorescence du dCTP-Cy5 et donc à la réparation, alors que le vert correspond au signal de fluorescence des plasmides marqués au dCTP-Cy3. On constate que la surface du gel est parfaitement plane et ne présente pas d'aspérités (**Figure 44 a**), mais que contrairement à la coupe du dépôt de la figure précédente, la réparation est répartie sur le bord (**Figure 44 b**) et qu'à ce niveau elle descend plus profondément. Enfin le dessous du dépôt présente un grand nombre d'aspérités qui correspondent à des zones locales du gel où les plasmides sont descendus plus profondément lorsque l'on a réalisé le dépôt (**Figure 44 c**).

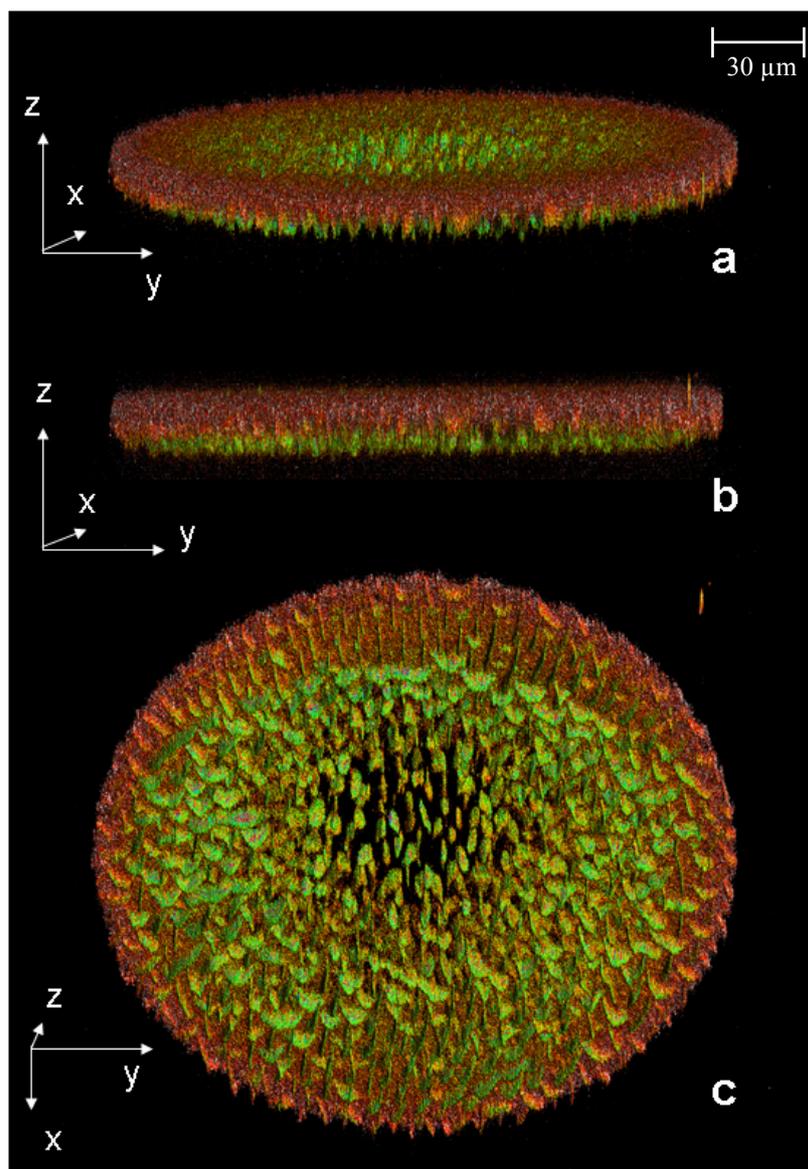


Figure 44 : Reconstitution en trois dimensions du dépôt. Le rouge correspond au signal de fluorescence du dCTP-Cy5 incorporé dans les plasmides pCPD-64 lors de leur réparation. Le vert correspond à la fluorescence des plasmides comportant du dCTP-Cy3. Trois vues différentes sont présentées : **a**, **b**, **c**. L'échelle de l'axe Z a été grossie 2,5 fois.

Au vu des résultats obtenus par microscopie confocale, les lames hydrogel remplissent pleinement leur fonction. Les réactions de réparation ont lieu dans un espace en trois dimensions qui permet, théoriquement, de maximiser l'accessibilité des plasmides aux enzymes de réparation par rapport aux lames supports classiques.

C) Fabrication de lames hydrogel

1) Problèmes rencontrés avec les lames Perkin Elmer

Bien que les lames hydrogel de Perkin Elmer soient un support particulièrement bien adapté à notre application, nous avons rencontré des problèmes lors de l'utilisation de certains lots. Notamment des problèmes liés à la qualité de fabrication des lames :

- Présence de voiles au niveau du gel
- Microcoupures de la surface du gel
- Zones de la lame présentant un bruit de fond plus élevé
- Perte d'accroche des plasmides sur le support
- Mauvaise reproductibilité entre le haut et le bas du gel d'une lame
- Mauvaise reproductibilité entre les lames d'un même lot

Tous ces problèmes de qualité ont conduit Perkin Elmer à arrêter la vente et la production des lames hydrogel pendant une période de plusieurs mois, ce qui nous a incité à vouloir réaliser nous-mêmes nos propres lames hydrogel.

2) Mise au point de lames hydrogel

a) Méthode de fabrication de la microcouche de gel

Les lames hydrogel présentant une couche très fine d'hydrogel (polymère hydraté), nous avons donc dû trouver une méthode simple permettant de la réaliser. Pour cela nous avons choisi d'utiliser les lamelles de microscope qui servent à faire les montures sur lame de verre. Dans notre cas, nous déposons l'hydrogel sous forme liquide sur la lame support, puis nous plaçons ensuite la lamelle par-dessus. Cette dernière étale alors de manière homogène l'hydrogel sur la lame. Une fois que le gel est polymérisé, la lamelle est retirée, puis la lame hydrogel est mise à sécher.

b) Choix de la lame support

Le choix du support est important car dans notre cas il doit permettre une accroche suffisante pour que, lorsque l'on retire la lamelle de microscope, le gel reste accroché à la lame support. Dans un premier temps nous avons utilisé des lames recouvertes de Poly-L-Lysine qui offrent une accroche du gel plus importante que des lames de verre classiques. Cependant, des problèmes de décrochage de gel existaient toujours. Pour pallier définitivement à ce problème, nous avons choisi de réaliser une fonctionnalisation de la lame support avec des groupements silane qui peuvent réaliser des liaisons covalentes avec les fonctions OH ou NH₂ du polymère d'acrylamide.

c) Composition de l'hydrogel

Nous ne connaissons pas la composition de l'hydrogel des lames Perkin Elmer, nous savions cependant qu'il contenait de l'acrylamide. Nous avons tout d'abord réalisé des lames avec des hydrogels comportant différentes concentrations en acrylamide (5 et 8%), mais nous avons rencontré des problèmes lors du retrait de la lamelle de verre qui s'avérait particulièrement délicat. Nous avons donc voulu ajouter un composé favorisant le démoulage de la lamelle, et pour cela, nous avons d'abord utilisé du glycérol. L'ajout de 25% de glycérol dans la solution d'hydrogel permet un très bon retrait de la lamelle, mais cette substance rend alors le gel hydrophobe, et les dépôts réalisés par la suite sur ce type de lame sont très petits.

Nous avons finalement ajouté de l'agarose à la solution d'acrylamide, et testé différentes combinaisons de concentrations : 5% acrylamide-0,8% agarose, 5% acrylamide-1,25% agarose, 10% acrylamide- 0,8% agarose, et 10% acrylamide-1,25% agarose. La combinaison de concentration que nous avons retenue est 5% acrylamide-1,25% agarose, car cette dernière permet d'avoir le profil de réparation présentant le meilleur rapport signal de réparation sur signal contrôle. Nous avons comparé les profils de réparations obtenus avec une biopuce réalisée sur un hydrogel Perkin Elmer ou sur l'hydrogel que nous avons mis au point (**Figure 45**). Pour cela nous avons déposé une même série de plasmides sur l'un et l'autre des hydrogels. On constate que le niveau de fluorescence des signaux de réparation est beaucoup plus élevé avec notre hydrogel que celui de chez Perkin Elmer (**Figure 45 a et b**). Nous avons ensuite quantifié les deux biopuces et normalisé les intensités de fluorescence obtenues avec la biopuce ayant notre hydrogel comme support par rapport à l'intensité du plasmide

control de la biopuce réalisée sur l'hydrogel Perkin Elmer, ceci dans le but de pouvoir comparer les deux profils de réparation (**Figure 45 c**).

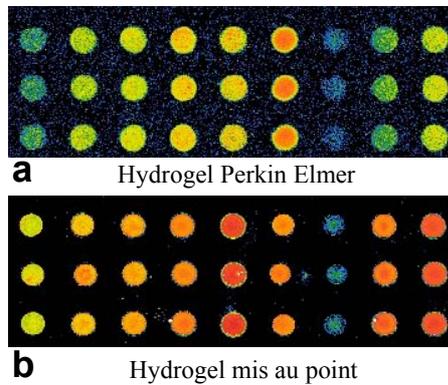
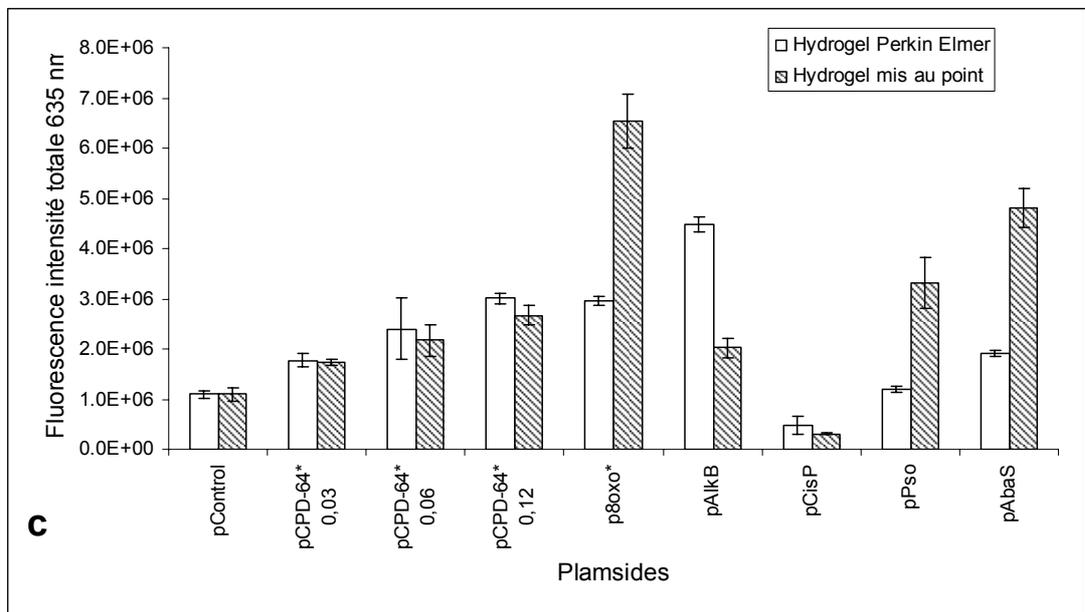


Figure 45 : Comparaison des profils de réparation d'extraits HeLa nucléaires commerciaux (2 mg/ml) obtenus sur un hydrogel de chez Perkin Elmer, ou sur l'hydrogel que nous avons mis au point. Cette expérience est réalisée sur un format de puce particulier, de gauche à droite : pControl, pCPD-64* obtenue à trois doses d'irradiation UVC (0,03 ; 0,06 ; 0,12 J/cm²), p8oxo*, pAlkB, pCisP, pPso, pAbaS. Chaque plasmide est en tripliqua sur la biopuce. Les deux biopuces ont été lues avec les mêmes réglages **a**, **b**. En **c** les profils ont été normalisés par rapport au niveau de fluorescence du pControl afin de pouvoir les comparer.



On constate que les deux profils de réparation sont différents. La réaction réalisée sur l'hydrogel Perkin Elmer présente un niveau de réparation plus élevé pour pAlkB, cependant elle présente un niveau de réparation inférieur pour p8oxo*, pPso et pAbaS. Le fait que les deux profils ne sont pas identiques pourrait s'expliquer par la composition des deux hydrogels qui conduit notamment à des maillages de gel différents. Certains dommages pourraient alors être plus ou moins bien réparés en fonction de la taille des enzymes qui le prennent en charge.

d) Problème lié à la fabrication de lames hydrogel

Nous avons rencontré un problème important lors de la fabrication de lames hydrogel. Il est lié à l'étape de fabrication de la couche mince de gel. La méthode que nous avons utilisée pour réaliser cette couche est très rudimentaire, et bien qu'elle soit assez efficace, elle ne permet pas d'obtenir une couche d'une épaisseur constante. Quand nous avons testé la reproductibilité des signaux obtenus à l'intérieur d'une même lame, nous nous sommes aperçu qu'un effet de lame très important était présent (**Figure 46**). Ceci rend l'utilisation de ce support très délicate, et montre qu'une technologie bien spécifique, que nous ne possédons pas, est nécessaire pour réaliser la couche d'hydrogel.

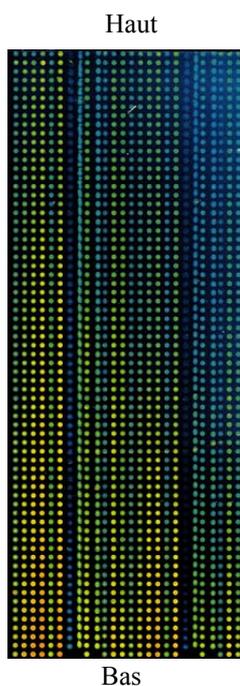


Figure 46 : Image obtenue après lecture d'une biopuce réalisée sur l'intégralité de l'hydrogel support. La réaction de réparation a été réalisée avec des extraits HeLa nucléaires commerciaux. Le haut et le bas de la biopuce sont indiqués.

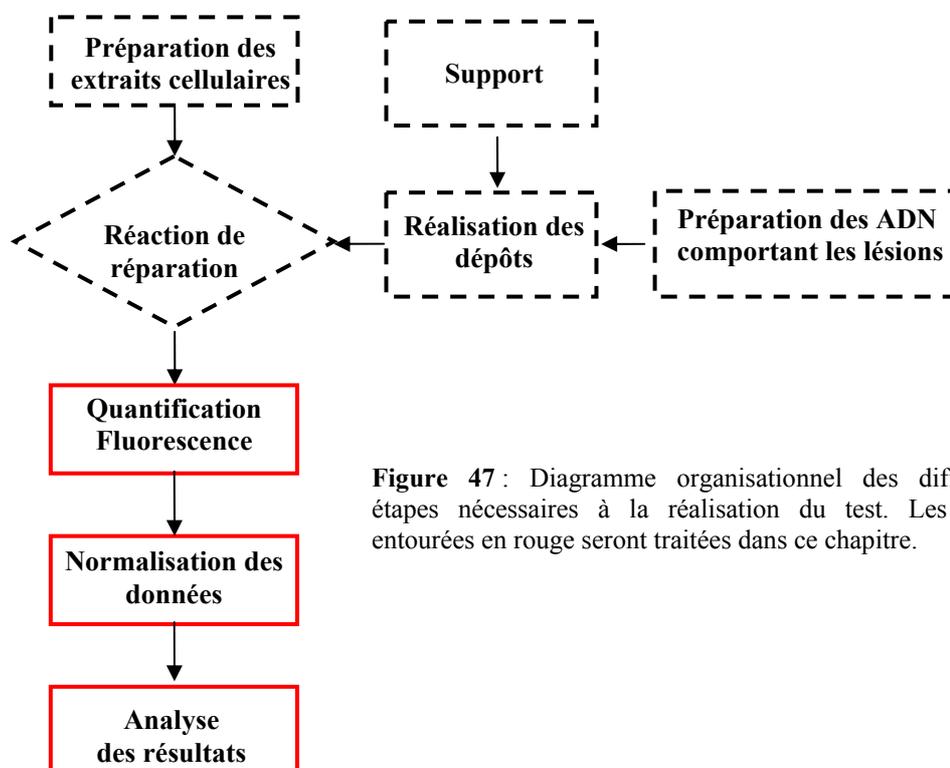
IV) Conclusion

La qualité de fabrication des biopuces est un élément clé du test car elle peut influencer directement sur les résultats obtenus. Nous avons montré que plusieurs facteurs sont à maîtriser au cours de leur fabrication. Tout d'abord, lors de la préparation des plasmides lésés, nous devons nous assurer que nous formons de la manière la plus spécifique possible les différents dommages. En effet, la présence de plusieurs types de lésions sur un même dépôt supprimerait la spécificité du test. Nous avons aussi mis en évidence que les différents réglages du robot doivent être optimales dans le but de réduire le plus possible les erreurs lors de la dispense des plasmides. Enfin pour notre test, l'utilisation de lames d'hydrogel Perkin Elmer permet, de par leurs caractéristiques, d'améliorer la morphologie des dépôts ainsi que la conservation des plasmides. Cependant la réalisation au laboratoire de telles lames est très délicate, et nous n'avons pu maîtriser leur fabrication.

Chapitre II : Mise au point de la quantification de la fluorescence, de la normalisation des données et de l'analyse des résultats

Introduction

L'utilisation de tests miniaturisés comme les biopuces a permis d'augmenter de manière très significative le nombre de paramètres testés lors des expérimentations. Bien que la biopuce que nous avons mis au point présente un nombre faible de dépôts en comparaison à une puce haute densité, elle n'en échappe pas moins au même problème de traitement des données. La principale utilisation de biopuces en biologie a été jusqu'alors consacrée à l'étude du transcriptome, pour laquelle un grand nombre de méthodes de traitement de données et de normalisation ont été développées. Malheureusement, ces méthodes ne sont pas toutes adaptables à notre test car elles sont généralement dédiées à des mesures d'expression relatives (rapport ou ratio d'expression). Aussi nous avons dû développer et mettre au point une partie de cette chaîne d'analyse de traitement des données que nous allons présenter dans ce chapitre. Un logiciel de normalisation a notamment été développé en étroite collaboration avec Nicolas Ugolin et Guillaume Arras du Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE) qui ont respectivement mis au point la méthode mathématique de normalisation et conçu le logiciel. Les différentes étapes abordées dans ce chapitre sont présentées sur la **Figure 47**.



I) Quantification de la fluorescence

A) Lecture des biopuces et reconnaissance des dépôts

Le premier maillon de la chaîne d'analyse des résultats est la lecture de la biopuce à l'aide du scanner Axon 4200B et de son logiciel dédié Genepix 5.1. Cette étape permet d'obtenir une image au format TIF composée de pixels représentant chacun l'intensité de fluorescence de la zone scannée à laquelle ils appartiennent. L'intensité des pixels est corrélée à une couleur afin de rendre l'image plus facilement interprétable par l'utilisateur. Au cours de nos travaux, nous avons utilisé une représentation de type « arc-en-ciel » allant du noir pour une intensité de fluorescence faible au rouge pour une intensité de fluorescence forte, le blanc quant à lui correspond aux pixels saturants (**Figure 48**).

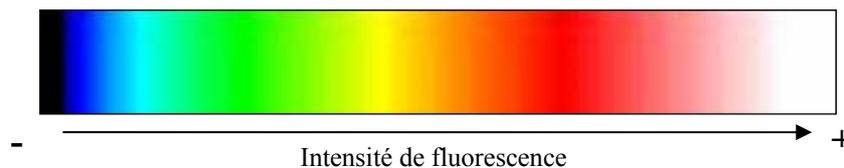


Figure 48 : Echelle de couleur arc-en-ciel correspondant à l'intensité de fluorescence du pixel

Il est à noter que la résolution maximale du scanner est de 5 μm , un pixel correspond donc à une zone de 5 μm sur 5 μm . Une fois cette image acquise, la quantification de la fluorescence peut être réalisée. Pour cela il faut déterminer où se localisent les dépôts sur l'image et les délimiter. Cette étape est réalisée à l'aide du logiciel Genepix, en utilisant un fichier GAL qui permet de générer une grille de quantification composée de cercles correspondant aux dépôts de la biopuce. Cette grille est alors apposée grossièrement sur l'image, puis le logiciel l'ajuste de manière à ce que chaque dépôt soit reconnu et délimité par le cercle qui lui correspond (**Figure 49**).

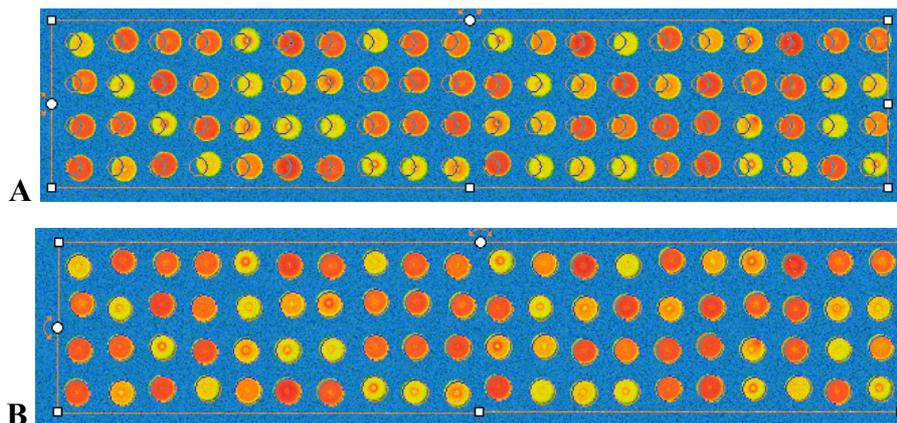


Figure 49 : En **A**, l'image au format TIF après lecture avec le scanner, la grille de quantification est apposée, mais n'est pas ajustée. En **B**, la grille de quantification est ajustée aux dépôts.

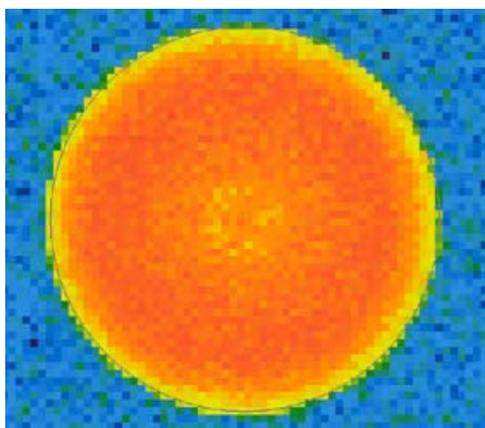


Figure 50 : Image d'un dépôt scanné à la résolution de 5 μm . La grille de quantification est ajustée, elle délimite la séparation entre le signal de fluorescence au niveau du dépôt et celui dû au bruit de fond. On constate que la répartition de la fluorescence au sein du dépôt est imparfaite, la couronne ainsi que le centre présentent une fluorescence légèrement inférieure.

Tous les pixels à l'intérieur des cercles sont alors considérés par le logiciel comme du signal de fluorescence appartenant aux dépôts, tous les pixels à l'extérieur des cercles sont eux considérés comme du bruit de fond. Nos dépôts, de 255 μm de diamètre en moyenne, contiennent généralement 2000 pixels (**Figure 50**).

B) Choix de la méthode de mesure de la fluorescence des dépôts

Une fois que la grille de quantification a été correctement placée, le logiciel d'analyse quantifie alors la fluorescence de chaque pixel de chaque dépôt. Différentes méthodes de calcul sont alors possibles pour caractériser la fluorescence d'un dépôt, la médiane de fluorescence et la fluorescence totale du dépôt.

La médiane de fluorescence correspond à la médiane de la fluorescence de tous les pixels d'un dépôt. Cette valeur est utilisée lors de l'analyse de la plupart des applications biopuce notamment les puces à transcriptome. Elle a plusieurs avantages, le premier est de ne pas dépendre du nombre de pixels présents dans le dépôt, ce qui peut aussi être un inconvénient dans certains cas. Le second est qu'elle permet de soustraire aisément la valeur de bruit de fond. On peut facilement calculer la médiane de fluorescence du bruit de fond sur un nombre n de pixels, et la soustraire. Le logiciel d'analyse Genepix propose d'ailleurs la valeur de la médiane de fluorescence des dépôts corrigée par la médiane de fluorescence du bruit de fond.

La fluorescence totale, quant à elle, correspond à la somme des intensités de fluorescence des pixels d'un dépôt. On comprend alors que cette valeur dépend directement du nombre de pixels du dépôt et par conséquent de son diamètre. Un inconvénient majeur de cette méthode est qu'il est plus difficile de calculer et de soustraire le bruit de fond. De surcroît, le logiciel d'analyse ne permet pas d'avoir accès à la valeur de la fluorescence totale corrigée par la valeur du bruit de fond.

Pour l'analyse de nos résultats, nous avons eu à faire un choix entre l'une ou l'autre de ces méthodes de calcul. Nous avons vu qu'un facteur distingue la fluorescence totale de la médiane de fluorescence : la première dépend du diamètre du dépôt alors que la seconde non. Aussi, si l'on observe la répartition des diamètres des dépôts réalisés sur une lame hydrogel d'une solution de dCTP-Cy5 au 1/20000, on constate qu'une partie non négligeable des dépôts présente un diamètre qui s'écarte de manière significative de la moyenne (255 μm) (**Figure 51**).

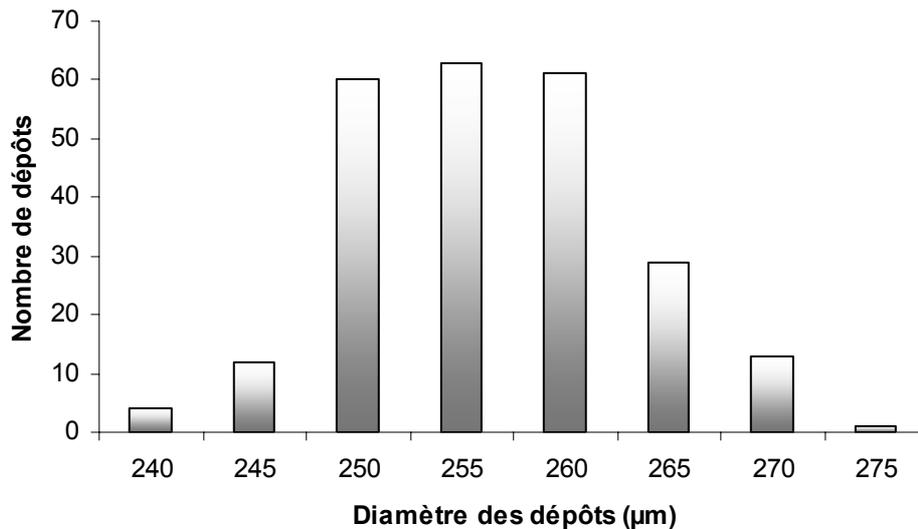


Figure 51 : Histogramme représentant la répartition des diamètres des dépôts d'une solution de dCTP-Cy5 au 1/20000 sur lame hydrogel. Cet histogramme rassemble les jeux de données de trois biopuces soit 243 dépôts.

Cette variabilité au niveau des diamètres est multifactorielle et s'explique en partie par des imperfections de surface de la lame hydrogel ainsi que par des défauts d'alignement des gouttes d'un même dépôt. Cette variabilité des diamètres a un impact direct sur les valeurs de fluorescence obtenues avec l'une ou l'autre des deux méthodes. Si l'on regarde le **Tableau 12**, on constate qu'avec la mesure de la fluorescence totale, on a un écart-type de 3% alors qu'il est de 7% avec la médiane de fluorescence. Cette différence correspond pratiquement à l'écart-type de la valeur des diamètres qui est de 3%.

	Médiane de fluorescence	Fluorescence totale	Diamètre
Moyenne	37813	74017877	256
Ecart Type	2475	2247277	7
Ecart Type (%)	7	3	3

Tableau 12: Tableau regroupant les moyennes et les écarts types des valeurs de la médiane de fluorescence, de la fluorescence totale et du diamètre des 243 dépôts.

En utilisant le même jeu de données que celui de l'expérience précédente, on a construit maintenant le graphique représentant la valeur de la médiane de fluorescence ou celui de l'intensité totale de fluorescence des dépôts, en fonction du diamètre des dépôts (**Figure 52**).

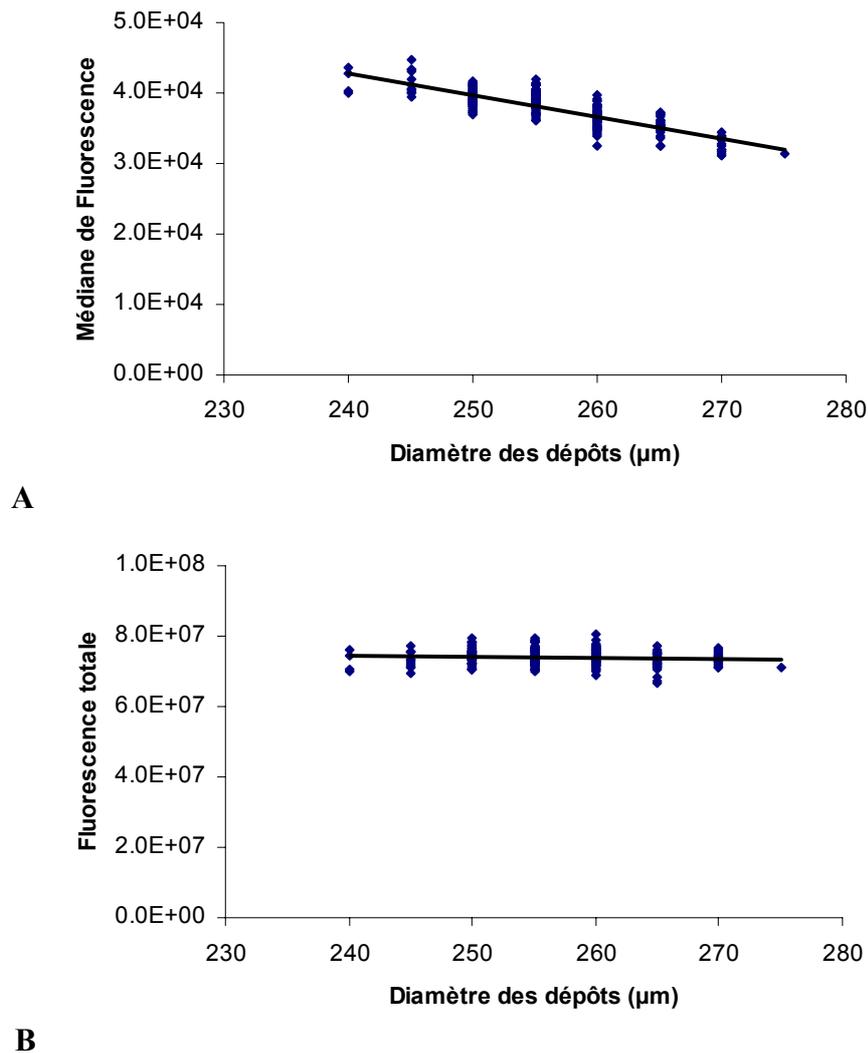


Figure 52 : En **A** est représentée la médiane de fluorescence en fonction du diamètre des dépôts, en **B** la fluorescence totale en fonction du diamètre des dépôts.

Il est remarquable de constater que, pour la médiane de fluorescence, le niveau de fluorescence des dépôts dépend directement de leur diamètre et qu'au contraire, la fluorescence totale ne varie pas en fonction du diamètre des dépôts.

En gardant à l'esprit le fait que la fluorescence d'un dépôt dépend du diamètre des spots, on peut facilement expliquer ce phénomène. En effet, plus un dépôt est petit et plus la quantité de plasmides qu'il contient est répartie sur une surface réduite. A l'inverse, plus un spot est grand et plus la quantité de plasmides qu'il contient est répartie sur une surface grande. Le niveau de fluorescence étant directement lié à la densité de plasmides déposés, plus ces derniers sont sur une surface petite et plus le dépôt aura un signal fort et inversement.

Lorsque la fluorescence totale est calculée, on somme toutes les intensités de fluorescence d'un dépôt. Par conséquent, un spot petit ayant une fluorescence plus forte aura un nombre de pixels moins important, ce nombre plus petit de pixels compensera leur forte intensité lorsque la somme de leur intensité de fluorescence sera calculée. L'inverse est aussi vrai pour un dépôt de diamètre supérieur à la moyenne qui contient un nombre plus important de pixels mais qui possède une intensité de fluorescence plus faible. C'est cette dépendance au diamètre des dépôts qui permet à la fluorescence totale de ne justement pas varier en fonction du diamètre des dépôts. On comprend alors que c'est la méthode de choix pour une mesure quantitative de la fluorescence par rapport à la médiane de fluorescence. C'est cette méthode que nous avons décidé d'utiliser, cependant quelques expériences présentées dans cette étude ont été quantifiées en utilisant la fluorescence médiane, ce qui est précisé dans la légende.

II) Normalisation des données

La normalisation des données obtenues à partir de biopuces est une étape cruciale. Avant d'interpréter nos résultats, nous devons nous assurer que les variations que nous observons sont bien dues aux conditions que nous avons testées et non pas aux erreurs générées au cours de l'expérience. L'étape de normalisation nous permet d'une part de s'assurer de la qualité avec laquelle a été réalisée l'expérience, et d'autre part de corriger en partie les erreurs et biais introduits. En effet, au cours de notre test, un nombre important de facteurs peut introduire des biais dans les données :

- Le pipetage manuel : lors de l'expérience mais aussi lors de la préparation des puces.
- La réalisation des dépôts par le robot : volume des gouttes déposées, volume d'échantillon prélevé.
- Les défauts de surface des lames hydrogel.
- Les défauts de lecture des biopuces liées au scanner.

A la vue de cette liste, on saisit alors mieux toute l'importance de la démarche de normalisation. Nous allons présenter ici la méthode de normalisation mise au point en collaboration avec le Laboratoire de Cancérologie Expérimentale (LCE). Pour ne pas rendre cette partie trop complexe, nous attacherons plus d'importance au principe de

cette méthode de normalisation qu'à certain de ses aspects mathématiques qui sont très largement abordés dans la partie Matériels et Méthodes.

Lorsque nous avons réalisé les expériences, nous nous sommes efforcés à chaque fois que cela était possible de répéter en triplicata chaque condition testée. La méthode de normalisation que nous avons mise au point tend à corriger le biais de chacun des répliquas en les comparant entre eux. Pour ce faire, les jeux de données des répliquas (nommé ici 1,2 et 3) sont tout d'abord comparés par permutation deux à deux dans un repère orthonormé d'axe X et Y (**Figure 53**).

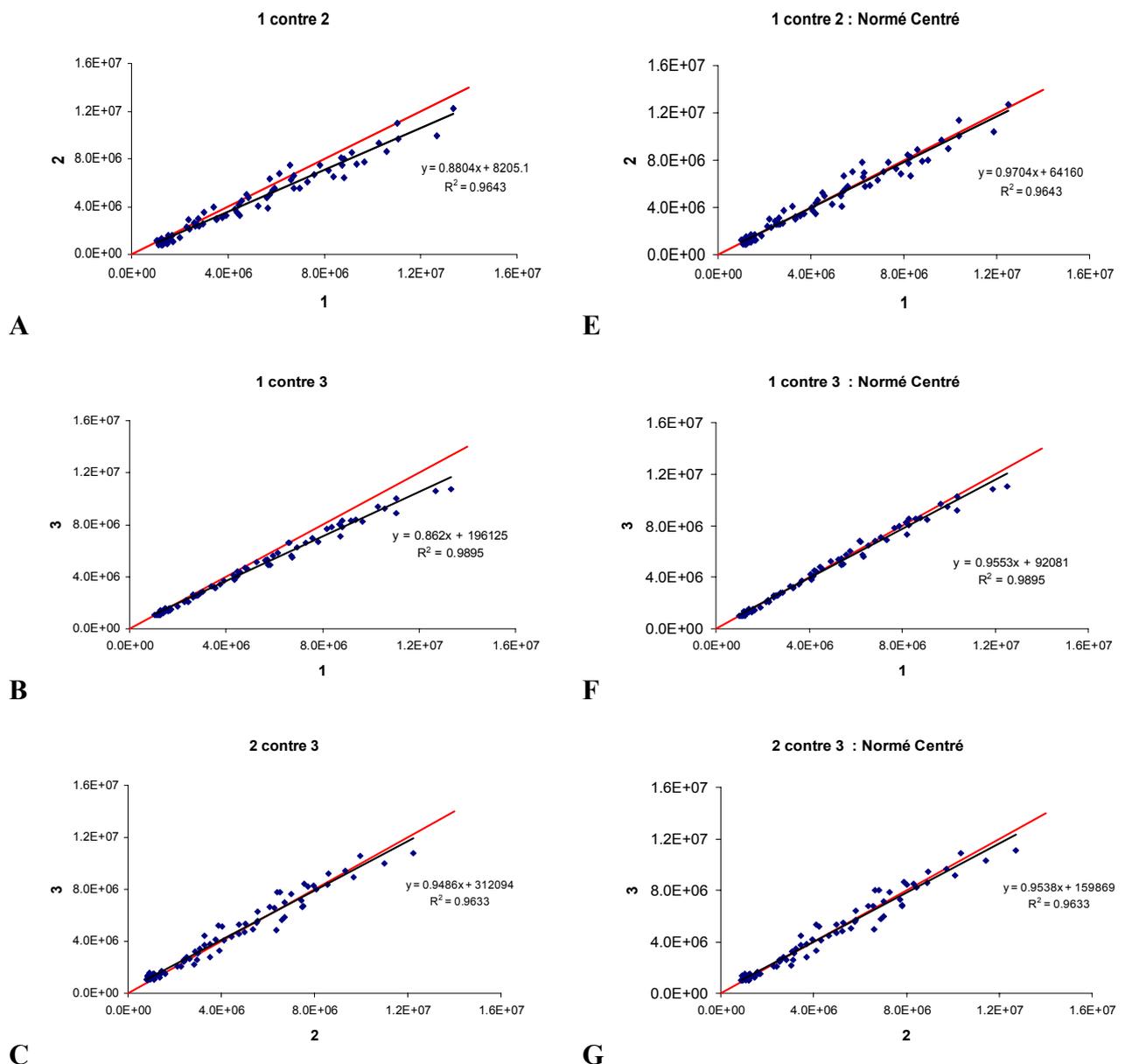


Figure 53 : Exemple de comparaison de répliquas par permutation. En **A** le répliqua 1 est comparé au 2, en **B** le répliqua 1 est comparé au 3, en **C** le répliqua 2 est comparé au 3. De **D** à **F** sont présentés les mêmes graphiques mais avec les données ayant été normées et centrées. En rouge est représentée la droite $Y=X$.

Au cours d'une expérience théoriquement parfaite, tous les points devraient se trouver sur la droite $y=x$ et ce pour toutes les permutations. Nous constatons que ce n'est pas le cas ; de plus, les droites de régression des nuages ne sont pas confondues non plus avec la droite $y=x$. Ceci reflète les biais que nous allons devoir corriger.

Les données des répliquas sont tout d'abord centrées et normées afin qu'elles aient le même écart type et la même moyenne. En effet, en partant du principe que les jeux de données d'un tripliqua représentent un même phénomène, alors leur écart type et leur moyenne doivent être identiques.

On constate alors sur la **Figure 53** que les nuages de points sont recentrés sur la droite $y=x$, cependant leur droite de régression n'est toujours pas confondue avec cette dernière. C'est avec des étapes de régressions linéaires récursives des différents couples de répliquas que nous réalisons cet ajustement ; avant chaque étape de régression est aussi calculé le facteur de reproductibilité. Ce facteur de reproductibilité permet d'une part de pondérer la régression en fonction de la reproductibilité de chaque mesure et d'autre part, d'estimer l'erreur sporadique faite sur chaque point de mesures (l'erreur sporadique représentant la dispersion du nuage de points autour de la droite de régression). Le facteur de reproductibilité est calculé pour chaque dépôt, et défini par un chiffre compris entre 0 et 1. Plus le dépôt sera reproductible (proche de la droite de régression) et plus le facteur de reproductibilité tendra vers 1 ; inversement, moins le dépôt sera reproductible (éloigné de la droite de régression) et plus le facteur de reproductibilité tendra vers 0.

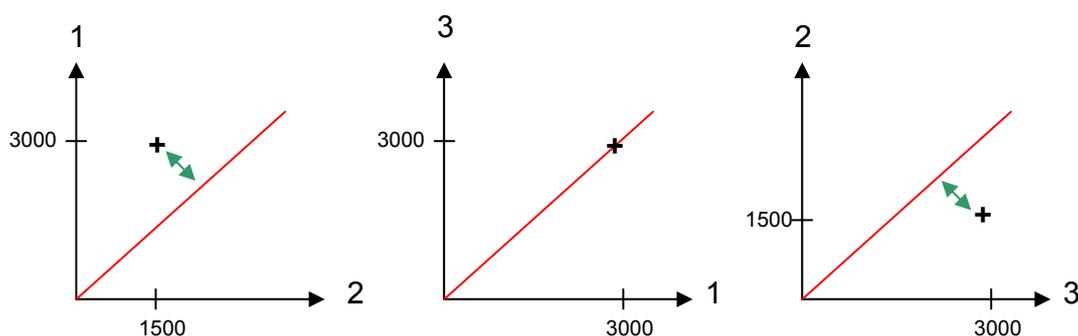


Figure 54 : Sur cette figure théorique sont présentés les différents couples de permutation d'un dépôt du tripliqua (1,2 et 3). Les axes représentent l'intensité de fluorescence. La double flèche verte indique l'éloignement à la droite $y=x$.

La **Figure 54**, qui représente les différents couples de permutation d'un dépôt appartenant à un tripliqua, permet d'appréhender cette notion de reproductibilité. Pour

le couple de permutation (1-3), l'intensité de fluorescence des deux dépôts est identique car le point qu'ils forment se situe sur la droite $y=x$. Au contraire, pour les deux autres couples de permutation (1-2) et (2-3), les points sont éloignés d'une certaine distance de la droite $Y=X$. Ceci nous indique que le répliqua 2 n'a pas la même intensité de fluorescence que les répliquas 1 et 3. Les répliquas 1 et 3 sont donc fortement reproductibles, leur facteur de reproductibilité sera proche de un, alors que le répliqua 2 n'est pas reproductible, son facteur de reproductibilité tendra vers zéro. L'étape finale de la normalisation consiste à regrouper l'ensemble des données de chaque tripliqua et de les pondérer par leur facteur de reproductibilité respectif. On obtient alors un seul jeu de données normalisées pondérées.

Il est à noter que la méthode que nous avons développée permet aussi la normalisation de n répliquas ; cependant, dans le cas de dupliquas, il n'est alors pas possible de calculer un facteur de reproductibilité. Afin de rendre plus aisée la normalisation des données, une interface utilisateur *NormalizeIT* a été développée afin de prendre en charge automatiquement la normalisation des fichiers de quantifications obtenus après la lecture des biopuces.

Pour conclure, des améliorations de la méthode de normalisation restent à être apportées, car elle ne permet pas de normaliser les intensités de fluorescence de conditions et d'expériences différentes, ce qui devrait être développé dans l'avenir.

III) Analyse des résultats

A la suite de la normalisation, les données peuvent directement être analysées à l'aide d'un tableur de type Excel ; cependant nous avons aussi utilisé le logiciel Acuity dédié à l'analyse des données de biopuces. Acuity permet de réaliser la « carte de couleur » d'une expérience, mais aussi le regroupement de données (clustering). Cette technique est un outil indispensable à toute personne désireuse de pouvoir extraire d'un grand nombre de données les informations essentielles. Il n'existe pas une méthode de regroupement de données mais plusieurs, qui ont cependant toutes le même objectif, regrouper entre elles toutes les données qui varient de la même manière au cours d'une expérience. C'est la même méthodologie qui permet de construire les arbres phylogénétiques dans lequel on classe par homologie les espèces, les séquences d'ADN etc.

Bien que les différentes méthodes de regroupement de données soient toutes basées sur le même principe, elles diffèrent par la manière de regrouper les données en fonction de leurs similitudes. Il n'y a donc pas une méthode meilleure que les autres, chacune d'entre elles a ses propres spécificités, avantages et inconvénients et permet de mettre en valeur certaines facettes des résultats. Au cours de nos travaux nous avons principalement utilisé deux méthodes : celle de Pearson et le K-Médian.

La méthode de Pearson est un regroupement hiérarchique de données, c'est-à-dire qu'il va ordonner et subdiviser les données en fonction de leurs homologues et ainsi construire une arborescence appelée dendrogramme. Toutes les données du dendrogramme sont reliées entre elles mais à des degrés de similarité différents. Cette méthode est très exploratoire, elle est surtout utilisée lorsque l'on a peu d'idées sur la manière dont vont se regrouper les données (**Figure 55**).

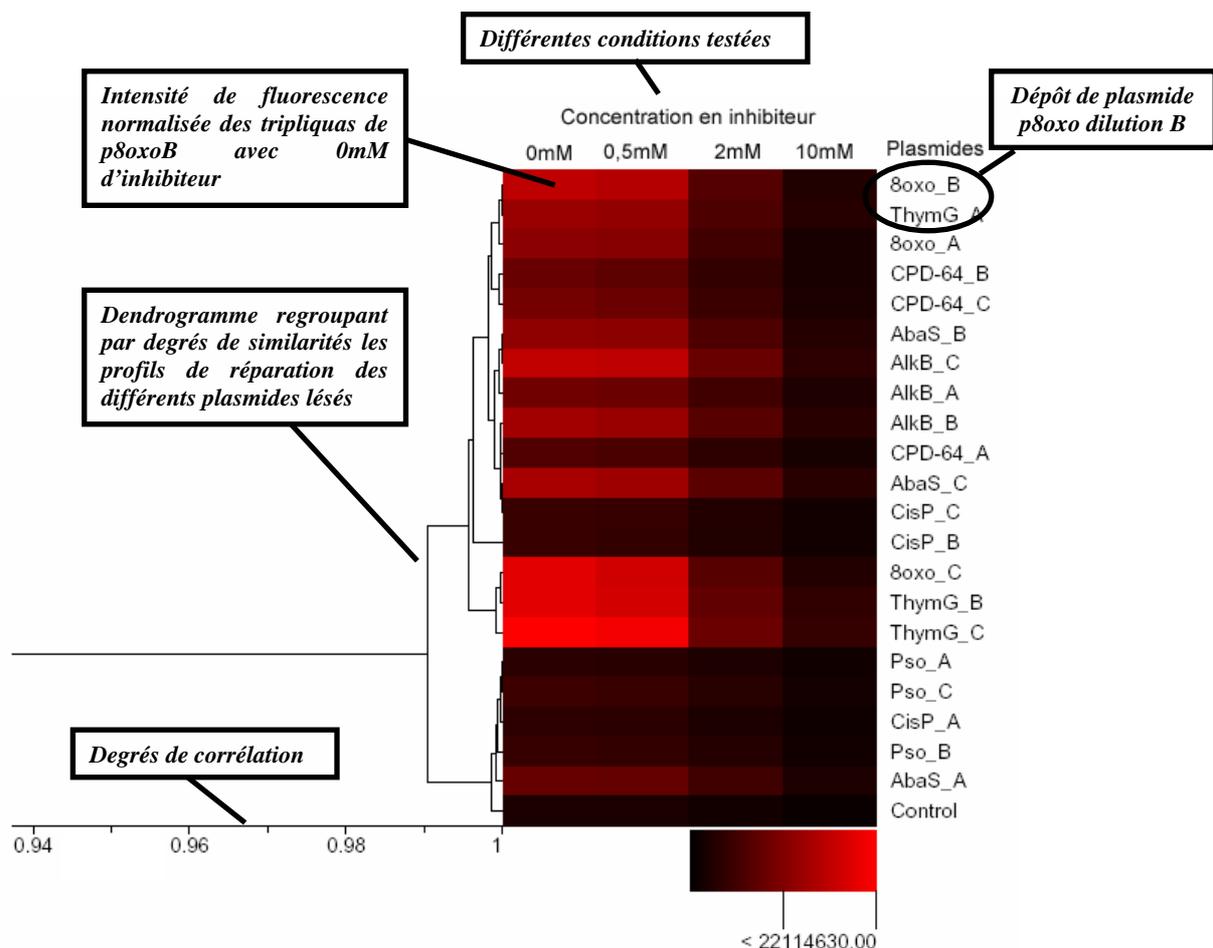


Figure 55 : Carte des couleurs hiérarchisée par la méthode de Pearson centrée. Quatre concentrations d'inhibiteurs ont été testées.

Le K-Médian quant à lui n'est pas une méthode de regroupement hiérarchique, toutes les données ne seront pas reliées entre elles, mais subdivisées en groupes. Le nombre de groupe doit être prédéfini par l'expérimentateur avant de lancer le processus de calcul. On comprend alors que cette méthode est moins exploratoire que celle de Pearson (**Figure 56**).

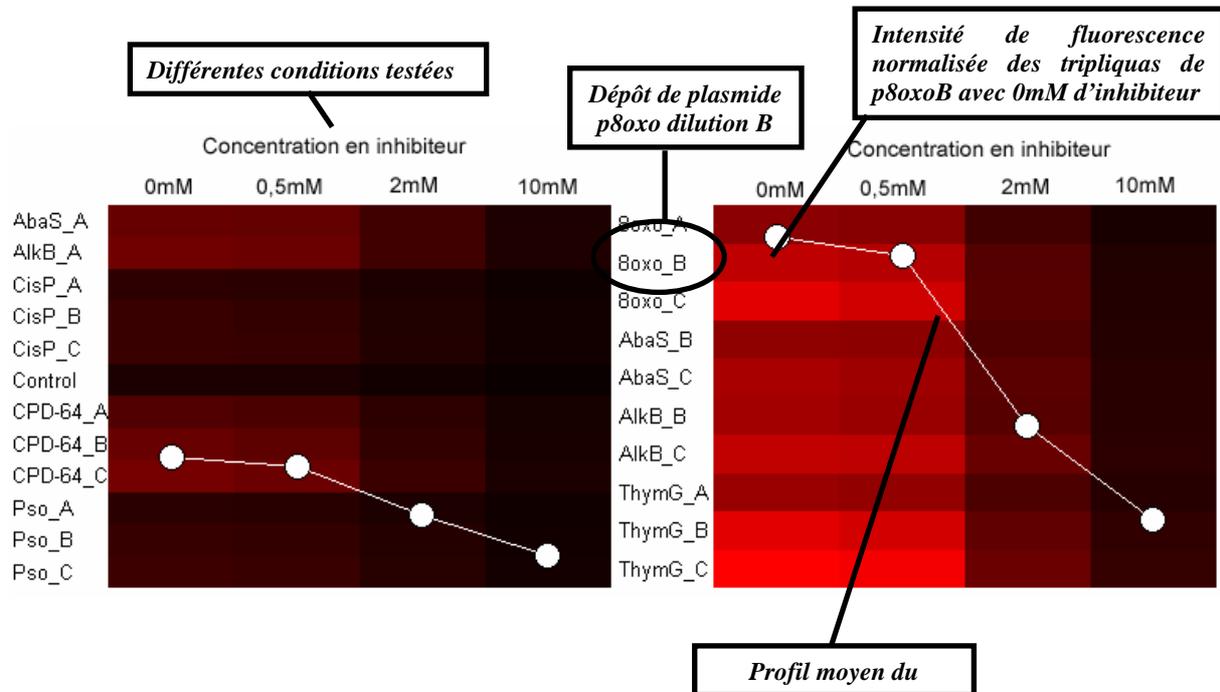


Figure 56 : Détermination de deux groupes par la méthode du K-médian. Quatre concentrations d'inhibiteurs ont été testées.

IV) Conclusion

Nous avons montré que l'intensité de fluorescence totale est la méthode de quantification la plus adaptée à notre application car elle permet d'avoir une mesure quantitative qui ne dépend pas du diamètre des dépôts. Nous pouvons ainsi éliminer une partie de la variabilité due au défaut des dépôts. Nous avons mis en évidence que des erreurs existent entre les répliquas d'une même condition. Ces erreurs sont liées à de multiples facteurs comme la dispense, le support, le pipetages etc. Cette constatation nous a donc conduits à développer une méthode de normalisation par régression linéaire multiple permettant de minimiser le biais qu'il existe entre les répliquas d'une condition. Cependant, il sera nécessaire de mettre au point une méthode permettant de normaliser des données issues de conditions différentes.

Chapitre III : Mise au point des conditions de réaction du test et de la préparation des extraits cellulaires

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter les différentes mises au point des conditions de réactions biologiques que nous avons effectuées afin de nous assurer que nous étions dans des conditions optimales de mesure des activités enzymatiques de réparation. Elles concernent la composition du tampon réactionnel, la quantité d'extraits nécessaire, et la durée du temps réactionnel. Par la suite, nous aborderons les différentes méthodes de préparation des extraits cellulaires que nous avons utilisés afin de réaliser des expériences sur différents types cellulaires ou sur des cellules traitées. Les étapes abordées dans cette partie sont présentées sur le diagramme organisationnel du test (**Figure 57**).

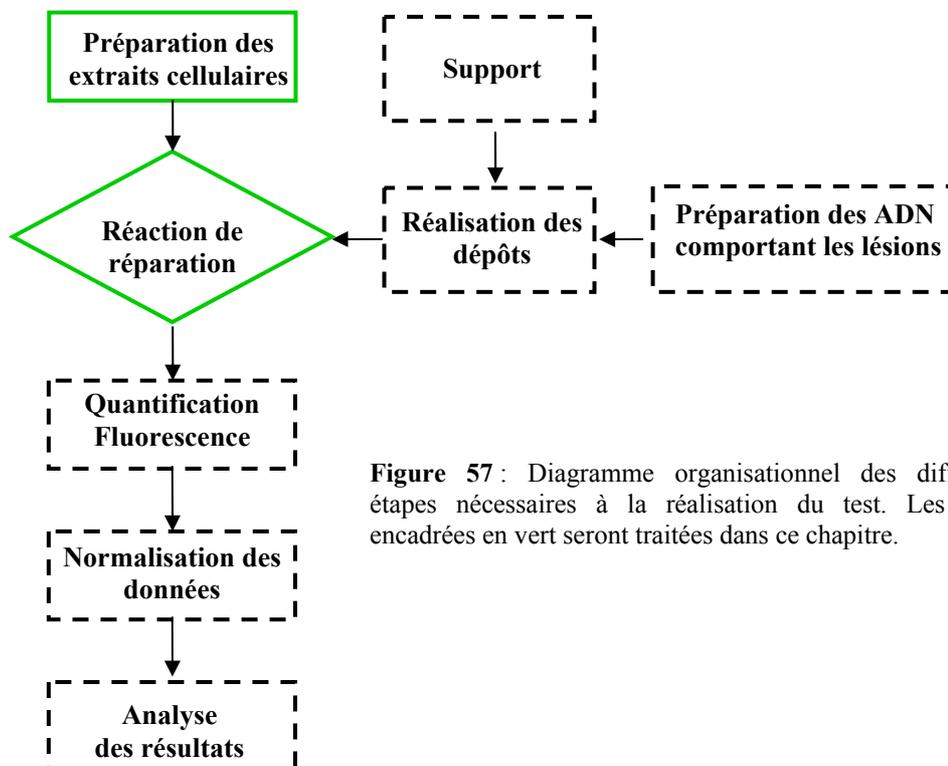


Figure 57 : Diagramme organisationnel des différentes étapes nécessaires à la réalisation du test. Les étapes encadrées en vert seront traitées dans ce chapitre.

I) Mise au point des conditions de réaction du test

A) La composition de la solution de réparation

Les réactions biologiques nécessitent souvent des conditions bien particulières pour atteindre leur rendement maximum. Sur la biopuce, notre but est de mesurer différentes activités de réparation qui pourraient ne pas partager forcément les mêmes conditions optimale de réaction. Nous avons utilisé comme point de départ des conditions de réaction décrites par Bernard Salles²³⁹. Pour nous assurer que ces conditions étaient adaptées à notre test et qu'elles permettaient une bonne mesure des différents systèmes de réparation, nous avons fait varier la concentration de certains composés du tampon de réaction.

1) Effets de la concentration en MgCl₂

Afin d'étudier les effets de la concentration finale en MgCl₂, nous avons réalisé une expérience avec trois concentrations différentes de ce soluté : 2 mM, 5 mM, 7 mM. On observe sur la **Figure 58** que les activités de réparation des différents dommages sont dépendantes de MgCl₂. Il est en effet intéressant de constater qu'une faible concentration en MgCl₂ (2 mM) ne permet pas aux réactions de réparation d'avoir lieu. Ce résultat peut s'expliquer de plusieurs manières. Premièrement la présence de Mg²⁺ est nécessaire car elle permet aux réactions consommant de l'ATP d'avoir lieu. Il est connu que l'ion Mg²⁺ est chélaté par les phosphates de l'ATP, cette chélation modifie la conformation spatiale des triphosphates ce qui permet alors aux enzymes de rompre la liaison phosphatidique. Une concentration trop basse en Mg²⁺ inhiberait donc les réactions ATP dépendantes. L'ion Mg²⁺ peut aussi avoir un effet l'activité de certaines enzymes de réparation. L'activité de l'endonucléase XPG de la REN est dépendante en Mg²⁺, par conséquent une concentration trop faible de cet ion peut avoir comme conséquence une diminution des activités d'excision de la REN. On peut aussi concevoir que des enzymes impliquées dans d'autres systèmes de réparation peuvent aussi être Mg²⁺ dépendantes et donc sensibles à la concentration en MgCl₂.

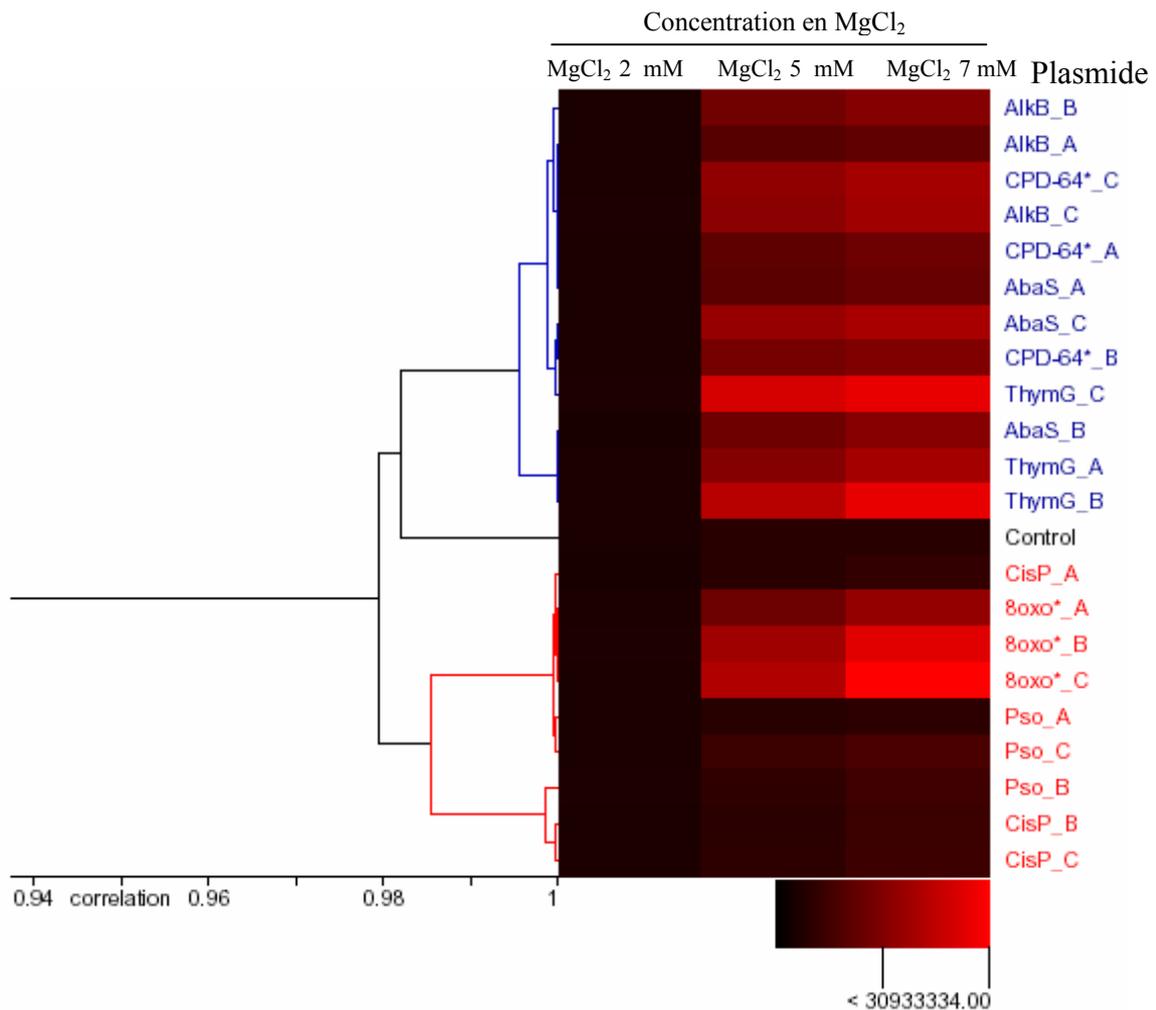


Figure 58 : Effets de la concentration en $MgCl_2$ sur les activités enzymatiques de réparation des différents plasmides lésés présents sur la biopuce. La carte de couleur de l'expérience est présentée ci-dessus sous forme hiérarchisée par la méthode de Pearson centrée. La réaction a été réalisée avec des extraits HeLa commerciaux à une concentration de 2 mg/ml pendant 3h à 30°C sur des biopuces au format 9x9. L'expérience a été réalisée en tripliqua, la fluorescence totale a été quantifiée et normalisée.

Nous avons mis en évidence un autre effet intéressant en réalisant la hiérarchisation des données de l'expérience par la méthode de Pearson. Deux groupes de plasmides lésés ont pu être déterminés (**Figure 58**), la réparation des plasmides appartenant au premier groupe (bleu) atteint pratiquement un plateau à partir d'une concentration en $MgCl_2$ de 5 mM (**Figure 59**). Au contraire, les plasmides du second groupe (rouge) composé de p8oxo*, pCisP, et pPso présente une réparation qui continue d'augmenter avec une concentration en $MgCl_2$ de 7 mM.

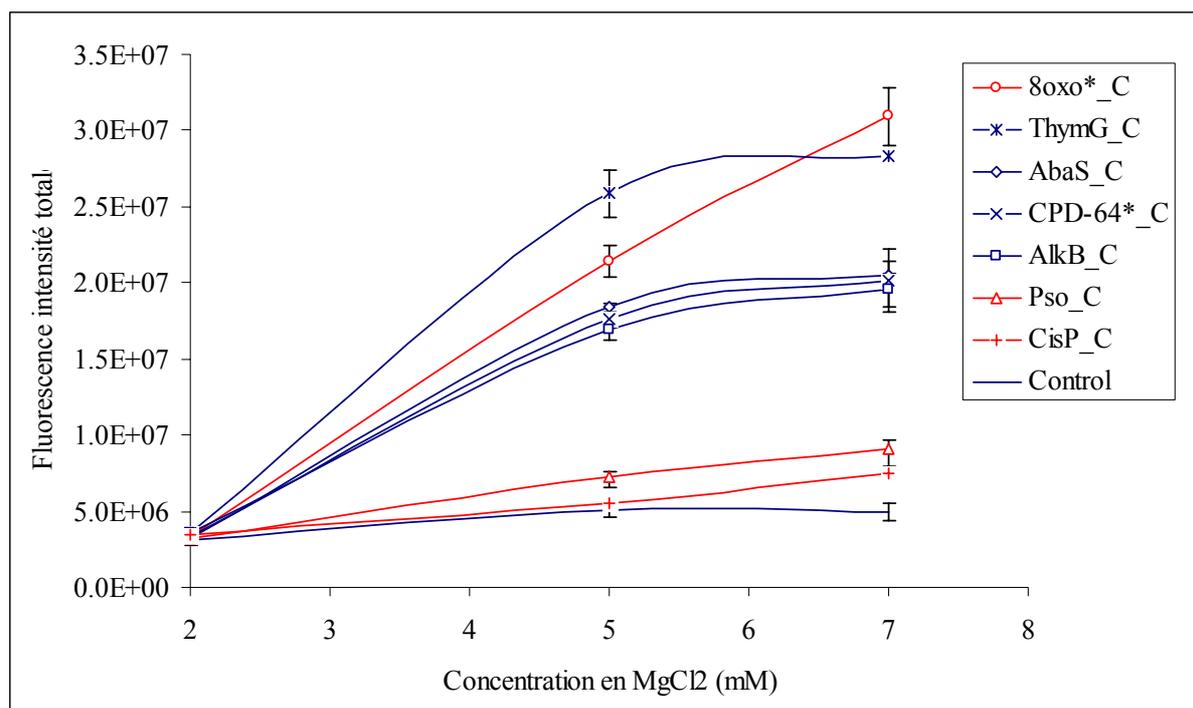


Figure 59 : Profil de réparation des différents plasmides, la dilution C uniquement, en fonction de la concentration de MgCl₂. Les plasmides des deux clusters sont représentés en bleu et en rouge.

Pour expliquer ce phénomène, on peut supposer que les enzymes qui prennent en charge spécifiquement ces dommages possèdent une activité fortement dépendante en Mg²⁺. Cependant, il est intéressant de noter que l'effet observé sur pPso et pCisP ne l'est pas sur pCPD-64* or tous trois ont en commun d'être pris en charge par la REN. Il est donc peu probable que ce soit une enzyme de la REN comme XPG qui soit responsable de cet effet. Toutefois la réparation des dommages causés par le cisplatine et le psoralène passe aussi en partie par la RH ou la RNH. L'effet observé sur pPso et pCisP pourrait donc être lié à une enzyme de ces systèmes de réparation. Enfin, l'effet de la forte concentration en Mg²⁺ sur la réparation de p8oxo* est délicate à interpréter car ce dépôt contient plusieurs dommages : 8-oxoG, diols de thymines et HmdU. Toutefois, comme ces lésions sont toutes trois réparées par la REB, l'effet de la concentration en MgCl₂ pourrait être lié à une enzyme de cette voie de réparation. Au vu de ces résultats, nous avons gardé la concentration de 7 mM en MgCl₂ pour la suite des expériences que nous avons réalisées.

2) Effet de la concentration en Dithiothreitol (DTT)

Le DTT est une molécule réductrice qui est couramment utilisée dans les réactions biologique afin d'éviter l'oxydation des protéines. Nous avons testé trois concentrations de DTT : 0,3 mM, 0,6 mM et 1 mM. Nous n'avons pas observé d'effet significatif de la concentration en DTT sur les activités de réparation, nous avons donc gardé la concentration de 0,6 mM (données non montrées).

3) Effet de la concentration en HEPES

Le pH des réactions biologiques est très important car il conditionne en partie les activités enzymatiques. Dans notre solution de réparation, l'HEPES tamponne le pH à 7,9. Ce pH correspond à celui du noyau cellulaire, nous n'avons pas testé d'autres valeurs de pH. Cependant nous avons fait varier la concentration de l'HEPES. Dans notre test nous l'utilisons à 48 mM et nous avons testé trois concentrations : 25 mM, 45 mM et 65 mM, les résultats sont présentés sur la **Figure 60**.

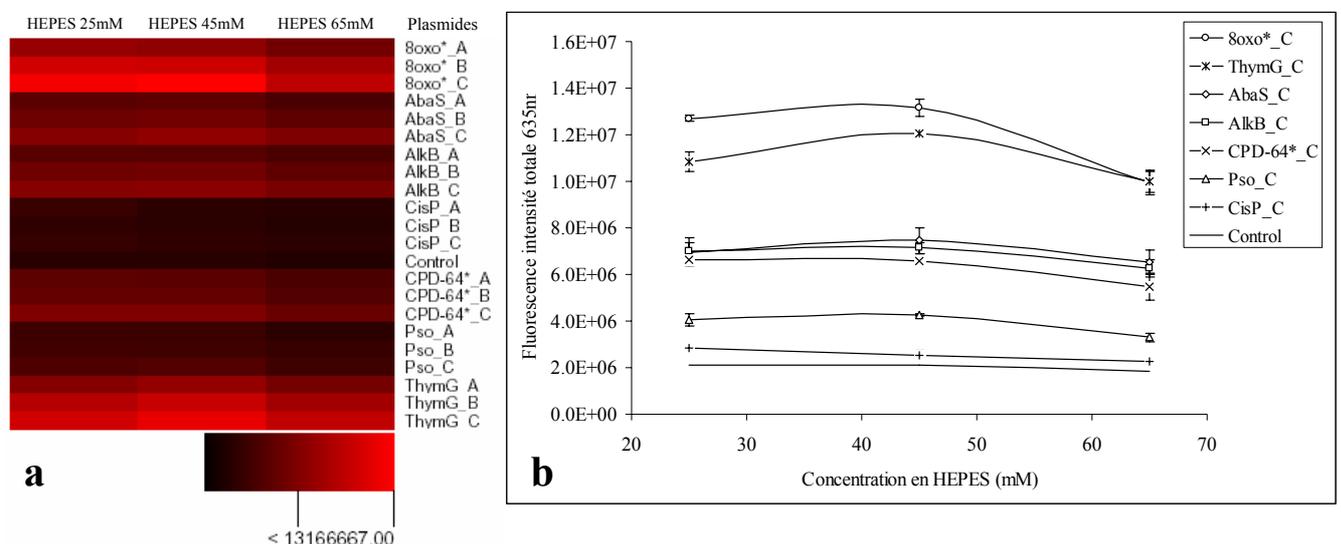


Figure 60 : Effet de la concentration en HEPES sur les activités enzymatiques de réparation des différents plasmides lésés présents sur la biopuce. La carte de couleur de l'expérience est présentée en a, en b le profil de réparation des plasmides (dilution C). La réaction a été réalisée avec des extraits HeLa commerciaux à une concentration de 2 mg/ml pendant 3h à 30°C sur des biopuces au format 9x9. L'expérience a été réalisée en triplicata, la fluorescence totale a été quantifiée et normalisée.

On observe que la concentration en HEPES agit le plus fortement sur la réparation de p8oxo* et pThymG, et plus légèrement sur la réparation des autres dommages, avec un pic d'activité à une concentration de 45 mM. La concentration que nous utilisons lors de nos tests (48 mM) semblait donc bien adaptée aux activités des différents systèmes de réparation dont nous voulions quantifier l'activité.

4) Effet de la concentration en EDTA

L'EDTA est ajouté dans les tampons des réactions biologiques afin de chélater les ions métalliques qui sont présents, et ainsi éviter qu'ils ne permettent l'oxydation des protéines par des réactions chimiques du même type que celles décrites par Fenton. Nous avons testé trois concentrations d'EDTA : 0,15 mM, 0,3 mM, 2 mM, avec un temps de réaction de 3 h. La concentration d'EDTA que nous utilisons était de 2,04 mM ce qui est assez élevé. Nous n'avons observé aucune différence significative des activités de réparation en diminuant cette concentration (données non montrées).

5) Effet de la concentration en ATP

L'ATP est la source d'énergie de la cellule, et beaucoup de mécanismes enzymatiques en consomment ; nous avons voulu étudier l'effet que pouvait avoir sa concentration sur les activités de réparation mesurées avec notre test. Il faut savoir qu'un système permettant de régénérer l'ATP est présent dans le tampon de réparation que nous utilisons. Il est basé sur la créatine phospho-kinase qui est capable de transformer l'ADP en ATP en utilisant un phosphate de la phospho créatine. Ce système est utilisé dans la cellule pour transporter l'énergie sous forme de phospho créatine de la mitochondrie vers les zones cellulaires où elle est consommée (ex : myofibrille dans les cellules musculaires). Cette méthode de régénération de l'ATP est très couramment utilisée, car elle permet de garder une concentration en ATP physiologique. En effet, ce dernier étant reformé au fur et à mesure de sa consommation, il n'est pas nécessaire d'utiliser une forte concentration de départ qui pourrait potentiellement inhiber certaines réactions enzymatiques.

a) Réaction de réparation sans ATP

Afin d'étudier l'effet direct d'un défaut en ATP, nous avons réalisé une expérience de réparation d'une durée de 1h sans ATP et sans le système de régénération d'ATP. Il faut toutefois avoir à l'esprit que cette expérience n'est pas réalisée en absence totale d'ATP car il faut prendre en compte celui contenu dans les extraits cellulaires. Un niveau de réparation très faible a été obtenu pour l'ensemble des dommages (données non montrées). Ceci suggère que les activités enzymatiques de réparation que nous mesurons sont fortement ATP dépendantes, et que l'ATP présent dans les extraits ne permet à ces réactions d'avoir une activité suffisante. Ceci n'a rien d'étonnant, car plusieurs enzymes intervenant dans les mécanismes de réparation sont connues pour consommer de l'ATP, notamment les hélicases et les ligases. L'ATP permet aussi l'échange des complexes enzymatiques au cours de la REN ainsi que le chargement de facteurs sur l'ADN comme PCNA^{21, 240}.

b) Effet de différentes concentrations en ATP sur les activités de réparation

Nous avons ensuite voulu étudier l'effet de différentes concentrations d'ATP, mais nous avons cette fois-ci gardé le système de régénération de l'ATP afin d'être dans les mêmes conditions que lorsque nous réalisons le test. Pour cela, nous avons expérimenté trois concentrations d'ATP : 1, 2, et 4 mM. Les réactions ont été réalisées sur des biopuces au format 20x4 en tripliqua avec une durée de réparation de 1h. Nous avons alors mis en évidence deux groupess de profils de réparation en utilisant la méthode du K-Médian (**Figure 61**). Le premier groupe de profils de réparation (Bleu), comporte les dommages dont le niveau de réparation reste constant avec la concentration en ATP, il comporte tous les plasmides portant des lésions connues pour être réparées par la REN (pCPD-64, pCisP, pPso) mais aussi p8oxo. L'autre groupe quant à lui regroupe les plasmides portant des dommages typiquement réparés par la REB (pThymG, pAbaS, pAlkB).

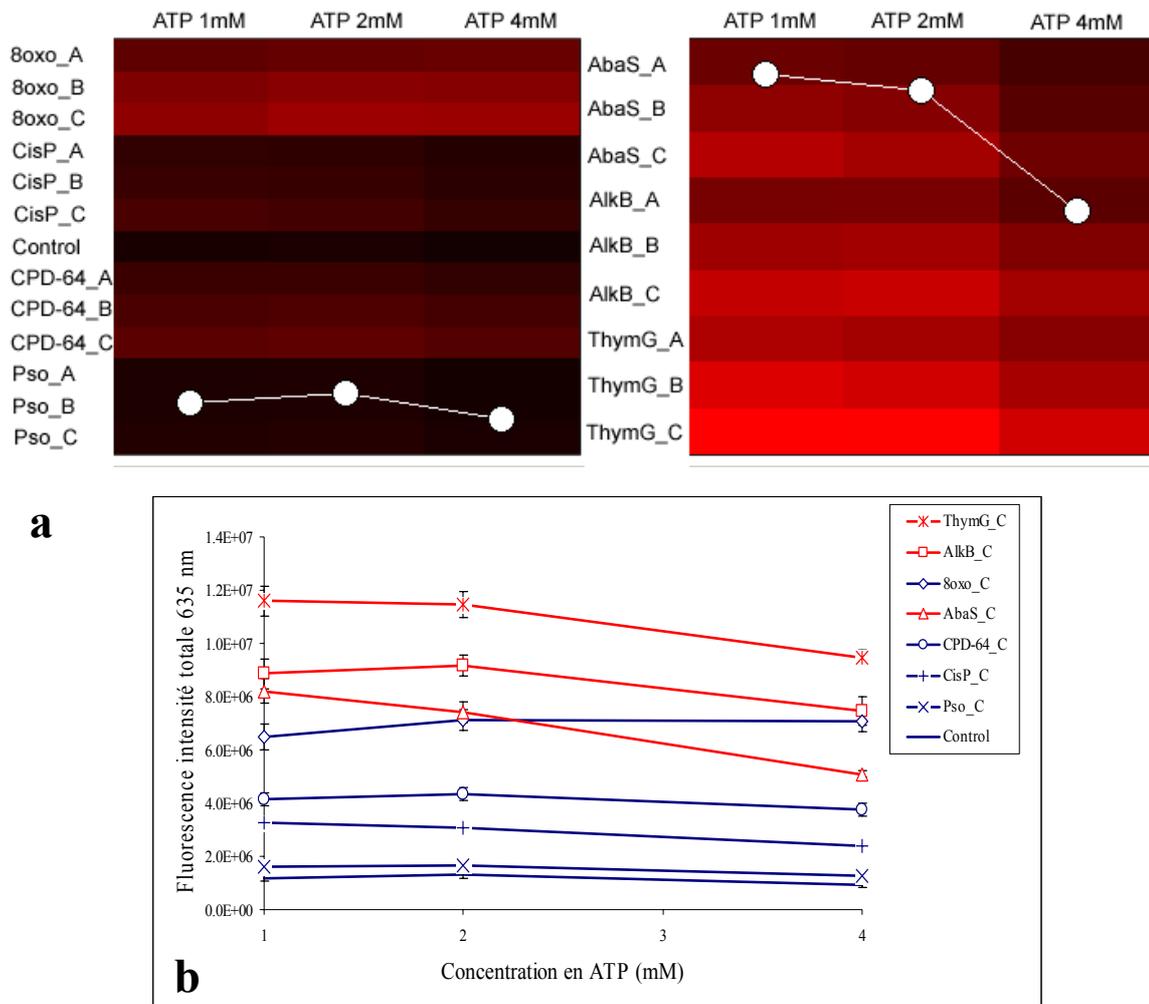


Figure 61 : Effet de la concentration en ATP sur les activités de réparation. En **a** sont présentés les deux groupes mis en évidence par la méthode du K-Median, le profil moyen est représenté sur chacun d'eux. En **b** sont présentés les profils de réparation obtenus pour la dilution C des plasmides. La réaction a été réalisée avec des extraits HeLa nucléaires commerciaux 2 mg/ml pendant 2 h à 30°C. L'expérience a été réalisée en triplicata sur des biopuces au format 20x4, la fluorescence totale a été quantifiée et normalisée.

Nous aurions pu nous attendre à avoir des activités enzymatiques de réparation qui augmentent avec la concentration en ATP mais ce n'est pas le cas. Pour une partie des dommages donc, une concentration en ATP de 1 mM est suffisante, des concentrations plus importante ne modifiant pas l'activité de réparation. La diminution d'activité de réparation observée pour les plasmides pAlkB, pThymG, pAbaS est très délicate à interpréter, elle pourrait être due à de multiples facteurs comme : une diminution de l'activité d'excision, une inhibition de l'activité de resynthèse, changement de voie de resynthèse de la REB. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à cette observation.

Comme nous désirions avoir des activités de réparation optimales pour l'ensemble des dommages, nous avons décidé d'utiliser, sauf exception, une concentration en ATP de 1 mM qui semble répondre à ces exigences.

B) Effet de la concentration en extrait

Dans le but d'étudier l'effet de la concentration en protéines sur les profils de réparation des dommages, nous avons réalisé des expériences avec différentes concentrations des extraits HeLa nucléaires commerciaux : 0,5, 1, et 2 mg/ml. Les résultats sont présentés sur la **Figure 62**.

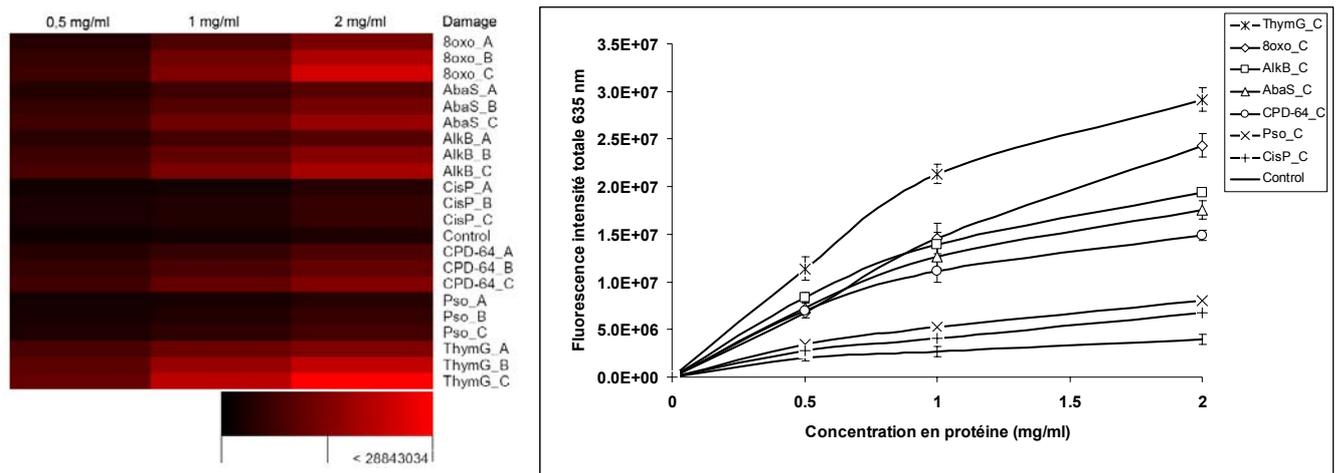


Figure 62 : Effet de la concentration en extraits HeLa nucléaires commerciaux. La carte de couleur de l'expérience est présentée, ainsi que les profils de réparation obtenus pour la dilution de plasmides C. Trois concentrations ont été testées : 0,5, 1, 2 mg/ml, le temps de réaction était de 3h à une température de 30°C. L'expérience a été réalisée en triplicata sur des biopuces au format 20x4, l'intensité de fluorescence totale a été quantifiée et

On observe que les signaux de réparation mesurés sont dépendants de la concentration en protéines, et que les profils de réparation ne sont pas tous identiques. Alors que, entre 0,5 et 2 mg/ml, la réparation des plasmides pCisP, pPso et p8oxo est linéaire, celle des autres dommages présente un léger point d'inflexion partir de la concentration 1 mg/ml. Ce point d'inflexion indique qu'à des concentrations supérieures à 1 mg/ml et pour un temps réactionnel de 3h, la réparation de ces dommages n'est plus corrélée de manière linéaire à la quantité de protéines des extraits cellulaires. Il est aussi intéressant de noter que les plasmides portant des dommages les plus fortement réparés sont ceux qui sont principalement pris en charge par la REB : pThymG, p8oxo, pAbaS, et pAlkB. Alors que ceux pris en charge par la REN présentent une réparation plutôt moyenne pour pCPD-64 voire faible pour pCisP et pPso.

La concentration de l'extrait est donc un point important à surveiller lorsque l'on veut réaliser une expérience de réparation afin d'éviter des phénomènes de saturation, mais le paramètre temps est aussi à prendre en compte.

C) Cinétique de réparation

Nous avons étudié l'effet de la durée de la réaction sur les profils de réparation des différentes lésions. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique de réparation sur quatre temps : 45, 90, 180 et 240 minutes. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 63**.

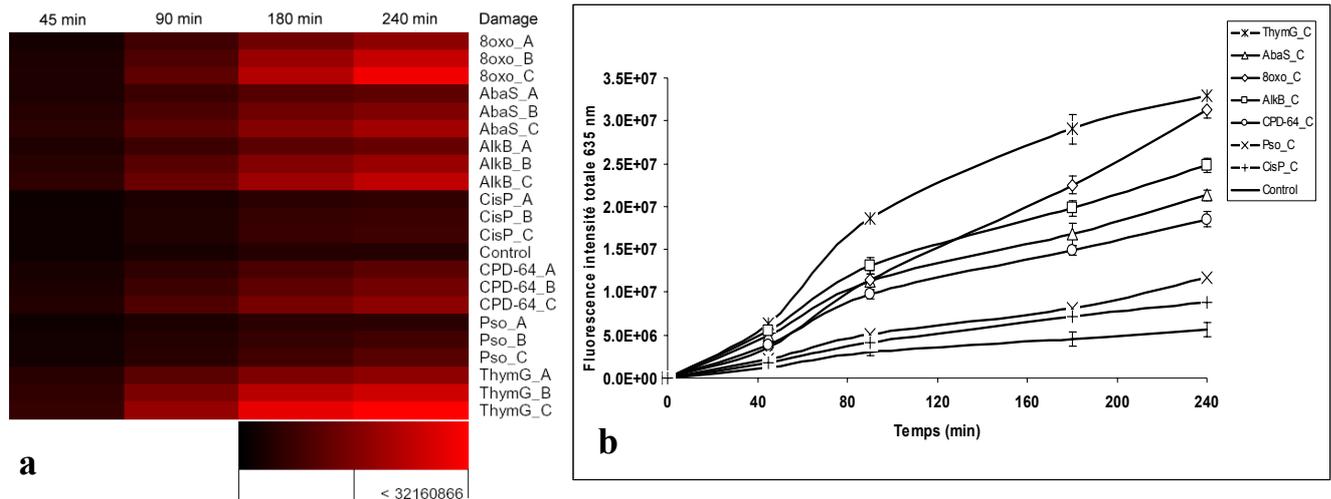


Figure 63 : Cinétique de réparation, la carte de couleur de l'expérience est présentée en **a**, ainsi que les profils de réparation obtenus pour la dilution de plasmides C en **b**. La réaction a été réalisée avec des extraits HeLa commerciaux à 2 mg/ml pendant : 45, 90, 180, 240 min à 30°C. L'expérience a été réalisée en triplicata sur des biopuces au format 20x4 , l'intensité de fluorescence totale a été mesurée et normalisée.

On observe que le niveau de réparation des lésions présentes sur la biopuce est dépendant du temps de réaction, et que les profils de réparation possèdent des allures différentes. Toutefois, certaines lésions comme les sites abasiques, les DCP et pp(6-4), les bases alkylées et les adduits cisplatine présentent un profil de réparation très similaire bien que d'intensité différente. Il est caractérisé par un point d'inflexion à partir du temps 90 min, puis par une réparation corrélée de manière linéaire avec le temps jusqu'au point 240 min. D'un autre côté, certains dommages possèdent des profils de réparation bien spécifiques. La réparation des diols de thymines par exemple est très rapide, mais sa courbe de type sigmoïde tendrait vers un plateau au temps 240 min, alors qu'au contraire la réparation de la 8-oxoG, elle, semble être linéaire tout au long de la réaction. Enfin, la réparation des dommages formés par le psoralène reste faible jusqu'au temps 180 min puis devient alors plus importante. Il semblerait donc que les mécanismes de réparation nécessitent plus de temps pour réparer ce type de lésions.

Le temps réactionnel est donc, au même titre que la concentration protéique, est un facteur important à prendre en considération afin d'être dans des conditions permettant d'observer les activités enzymatiques désirées.

D) Conclusion

Les expériences que nous venons de présenter démontrent que nous mesurons différentes activités enzymatiques qui ne partagent pas toutes les mêmes conditions de réactions optimales. Nous sommes donc obligés de faire des choix afin d'avoir le meilleur compromis réactionnel permettant de mesurer chacune de ces activités dans les meilleurs conditions possibles. Nous pouvons cependant tirer profit de ces différences, afin de mettre plus ou moins en évidence certains phénomènes en jouant par exemple sur les conditions réactionnelles de temps, de concentration en extraits, ou de concentration des solutés.

II) Préparation des extraits cellulaires

Le but de la biopuce que nous avons développée est de permettre la mesure des activités de réparation cellulaires. Il nous a donc fallu déterminer une méthode de préparation d'extraits cellulaires qui soit adaptée à notre test. Nous cherchions avant tout une méthode de préparation qui soit rapide, afin de ne pas perdre le gain de temps que procure l'utilisation de notre test. Nous allons présenter deux méthodes d'extraction que nous avons utilisées, et nous comparerons leurs protocoles à celui décrit par R. Wood que nous avons pris pour référence¹³.

A) Précautions quant à la préparation des extraits cellulaires

La réussite d'extraits cellulaires dépend de beaucoup de facteurs. Aussi, au cours de leur préparation, nous avons porté une grande attention à plusieurs éléments clés qui déterminent leur qualité :

- Nous nous sommes premièrement assurés que nous réalisons des extraits sur des cellules non confluentes. En effet, si des cellules sont confluentes, elles expriment des nucléases qui peuvent conduire à des réactions non spécifiques très gênantes dans le cas de la mesure d'activités de réparation de l'ADN.
- Afin de limiter la dégradation des protéines par les protéases, nous avons pris soin d'utiliser dans les tampons de préparation d'extraits des combinaisons d'inhibiteur de ce type d'enzymes. Nous avons aussi réalisé autant que possible toutes les étapes de préparation des extraits à 4°C dans le but de diminuer l'activité des protéases.
- Enfin, nous avons minimisé l'oxydation des extraits cellulaires et préservé au maximum les activités enzymatiques, et nous avons utilisé pour cela de l'EDTA et du DTT.

B) Extraits cellulaires totaux

Nous avons tout d'abord choisi de tester des extraits cellulaires totaux, leur préparation étant plus rapide et plus simple que celle des extraits nucléaires. Le protocole est basé en partie sur ceux décrits par A. Collins et J. L. Manley^{241, 242} qui ont montré que des expériences de transcription et de réparation de l'ADN *in vitro* pouvaient être réalisées avec des extraits totaux.

1) Le principe de la préparation des extraits totaux

La préparation des extraits cellulaires totaux consiste à récupérer l'ensemble des protéines cellulaires, aussi bien celles du cytoplasme que celles du noyau. Cette méthode de préparation d'extraits cellulaires est rapide. Comme on peut le constater avec le **Tableau 13** comparatif, elle présente un nombre réduit d'étapes de centrifugations, il n'y a pas de dialyse, et pas de précipitation différentielle des

protéines. De plus, les extraits peuvent être préparés sur un nombre très petit de cellules (1 million).

	Protocole de référence Wood	Protocole extraits totaux
Principe	Précipitations différentielles protéines cytoplasmiques puis nucléaires	Lyse totale
Durée extraction	24 H	2 H
Nbre centrifugations	3 + 1 ultracentrifugations	2
Nbre de dialyses	1	0
[protéine mg/ml]	15-30 mg/ml	14-16 mg/ml
Nbre min de cellules	$10^8 - 10^9$ C	10^6 C

Tableau 13 : Comparaison entre le protocole de préparation d'extraits cellulaires décrit par Wood et le protocole d'extraits totaux que nous avons utilisé

L'utilisation de ce protocole présente aussi l'avantage de réaliser la lyse des membranes de manière douce en utilisant la pression osmotique et un agent chaotropique déstabilisant les membranes (Triton X-100). Le principe de lyse des membranes par pression osmotique est de plonger les cellules dans un tampon hypotonique contenant une faible concentration en KCl (20 mM), ce qui produit une entrée d'eau dans les cellules, conduisant à la rupture de leur membrane plasmique. Cependant, la membrane nucléaire reste intacte, et est rompue à son tour en ajoutant un tampon hypertonique ayant une forte concentration en KCl (400 mM). Enfin une centrifugation permet de se débarrasser des débris cellulaires et de récupérer le surnageant contenant les protéines totales. Il faut noter ici que le KCl est un des éléments très importants du tampon de préparation d'extraits cellulaires. Outre le fait qu'il permette de lyser les membranes en fonction de sa concentration, sa force ionique joue aussi directement sur les interactions protéines/ADN. Une concentration faible en KCl (<30 mM) permet des interactions protéines/ADN non spécifiques alors qu'une concentration élevée (400-600 mM) ne permet plus aux protéines de se fixer sur l'ADN (à l'exception des histones). La forte concentration en KCl du tampon utilisée pour provoquer la lyse du noyau permet donc aussi de décrocher les protéines de l'ADN. Une concentration en KCl comprise entre 50 et 100 mM est généralement utilisée pour les réactions biologiques.

La plupart des protocoles d'extraits cellulaires se terminent donc par une dialyse des extraits obtenus afin de diminuer la concentration de KCl aux alentours de 80 mM. Comme nous voulions que la préparation des extraits soit rapide, nous avons fait le choix de ne pas réaliser cette étape. Lors des réactions de réparation sur biopuces, c'est la dilution des extraits dans la solution de réparation qui permet d'avoir la concentration en KCl désirée lors du test.

2) Résultats obtenus avec les extraits totaux

a) Profils de réparation obtenus avec des extraits HeLa totaux

Afin d'observer les activités enzymatiques de réparation des extraits HeLa totaux, nous avons réalisé une expérience de réparation, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 64**

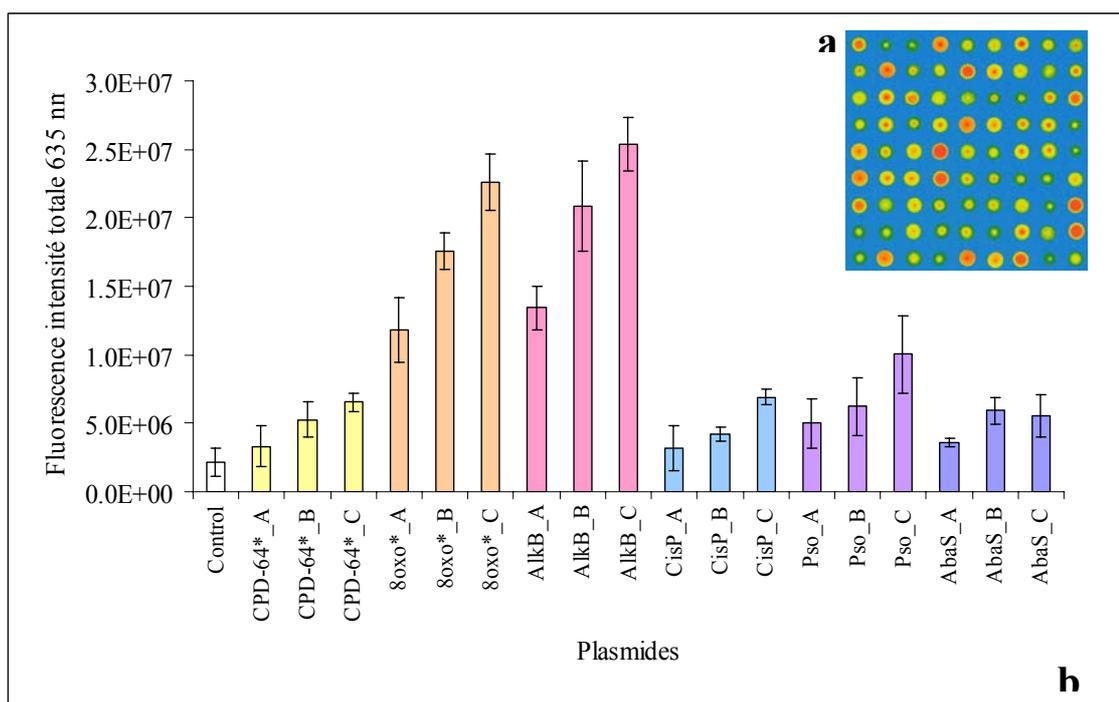


Figure 64 : Profil de réparation obtenu avec des HeLa totaux, à 2 mg/ml en concentration finale. L'expérience a été réalisée sur 3H à 30°C avec une concentration en ATP de 2 mM. L'intensité totale de fluorescence a été mesurée et normalisée. En a est présentée une des images obtenues après lecture, en b est présenté le profil de réparation.

On constate que le profil de réparation obtenu présente des activités de réparation spécifiques, le niveau de réparation de chaque dommage dépend de la

quantité de lésions présentes par dépôt, et les signaux de fluorescence des plasmides lésés sont supérieurs à ceux du plasmide contrôle. On observe que la réparation de pCPD-64 et de pAbaS est très faible, et que les plasmides pCisP et pPso semblent être réparés alors que ce n'était pas le cas avec les extraits nucléaires. Ces différences de profil ne sont pas dues aux différences de tampon des deux types d'extraits car ils sont très similaires. Elles peuvent être en outre dues aux différences génétiques qu'il existe entre les cellules HeLa utilisées pour la fabrication des extraits nucléaires commerciaux et les cellules HeLa que nous utilisons au laboratoire. Mais on peut aussi penser que le contenu protéique des extraits peut influencer sur les profils de réparation, dans le cas présent les protéines cytoplasmiques pourraient donc être impliquées.

b) Cinétique de réparation obtenue avec des extraits HeLa totaux

Nous avons ensuite réalisé une cinétique de réparation sur trois temps : 45, 90, 180 min avec les extraits HeLa totaux. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 65**.

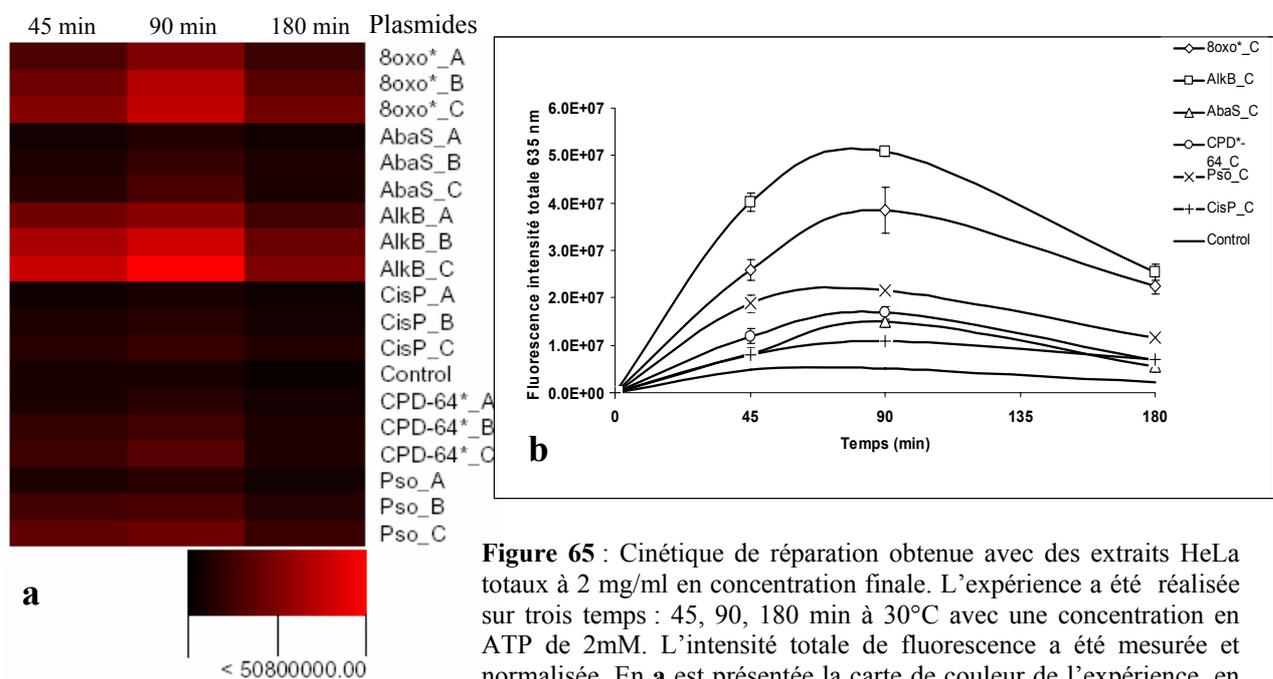


Figure 65 : Cinétique de réparation obtenue avec des extraits HeLa totaux à 2 mg/ml en concentration finale. L'expérience a été réalisée sur trois temps : 45, 90, 180 min à 30°C avec une concentration en ATP de 2mM. L'intensité totale de fluorescence a été mesurée et normalisée. En **a** est présentée la carte de couleur de l'expérience, en **b** est présenté le profil de réparation des plasmides de dilution C.

Le profil de réparation obtenu avec les extraits HeLa totaux montre que les signaux de réparation atteignent leur maximum d'intensité au temps 90 min puis ils diminuent au temps 180 min. Cette diminution du signal pour le temps long pourrait s'expliquer par la présence d'activités enzymatiques capables de digérer l'ADN comme par exemple des nucléases ou des DNases Activées par la Caspase 3 (DAC)²⁴³. Ce type d'enzyme aurait la capacité d'éliminer les nucléotides marqués qui sont été incorporés par les mécanismes de réparation dans les premiers temps du test. Comme cette cinétique de réparation est totalement différente de celle obtenue avec les extraits HeLa nucléaires commerciaux, on peut dans ce cas aussi se poser des questions quant à l'origine de ce phénomène : différences entre cellules HeLa, ou différence de composition protéique des extraits.

Par la suite, afin de nous assurer que le profil atypique de cette cinétique n'était pas dû à une trop grande concentration en extraits, nous avons réalisé la même expérience avec des extraits dilués deux fois, nous avons aussi obtenu un profil similaire (données non montrées). Ces résultats nous ont alors conduits à utiliser une autre méthode de préparation d'extraits cellulaires.

C) Extraits cellulaires nucléaires

1) Le principe de la préparation des extraits nucléaires

Le principe de préparation des extraits nucléaires est basé dans un premier temps, comme pour les extraits totaux, sur une lyse de la membrane cellulaire à l'aide d'un tampon hypotonique comportant du triton X-100. Les noyaux sont alors récupérés grâce à une centrifugation. Le surnageant composé du contenu cellulaire cytoplasmique est jeté. Les noyaux sont lysés à l'aide d'un tampon hypertonique et d'étapes de congélation. Une dernière centrifugation permet alors de récupérer le surnageant contenant les protéines nucléaires. Comme pour les extraits totaux, le lysat nucléaire se retrouve alors dans un tampon avec une forte concentration en KCl. Cette concentration sera diminuée lors de la dilution de l'extrait dans la solution de réparation. Ce protocole est très rapide, il nécessite toutefois un plus grand nombre de cellules pour être réalisé, et présente une étape de centrifugation supplémentaire (**Tableau 14**).

	Protocole de référence Wood	Protocole extraits totaux	Protocole extraits nucléaires
Principe	Précipitations différentielles Protéines cytoplasmiques puis nucléaires	Lyse totale	Lyse membrane plasmique Lyse membrane nucléaire
Durée extraction	24 H	2 H	3H
Nbre centrifugations	3 + 1 ultracentrifugation	2	3
Nbre de dialyses	1	0	0
[protéine mg/ml]	15-30 mg/ml	14-16 mg/ml	3-5 mg/ml
Nbre min de cellules	$10^8 - 10^9$ C	10^6 C	2.10^6 C

Tableau 14: Comparaison entre le protocole de préparation d'extraits cellulaires décrit par Wood R. , le protocole de préparation d'extraits totaux et le protocole de préparation d'extraits nucléaires que nous avons utilisé

Une partie très délicate de la préparation des extraits nucléaires est de s'assurer que la lyse des membranes a bien eu lieu sur la plus grande partie de la population cellulaire, mais il ne faut pas que les conditions utilisées provoquent aussi la lyse de la membrane nucléaire. Nous verrons que chaque type cellulaire possède ses propres caractéristiques de résistance membranaire.

2) Résultats obtenus avec les extraits nucléaires

a) Profil de réparation obtenu avec les extraits HeLa nucléaires

Tout comme pour les extraits totaux, nous avons tout d'abord réalisé une expérience de réparation afin de déterminer le profil de réparation que nous allons obtenir avec les extraits HeLa nucléaires. Les résultats sont présentés sur la **Figure 66**.

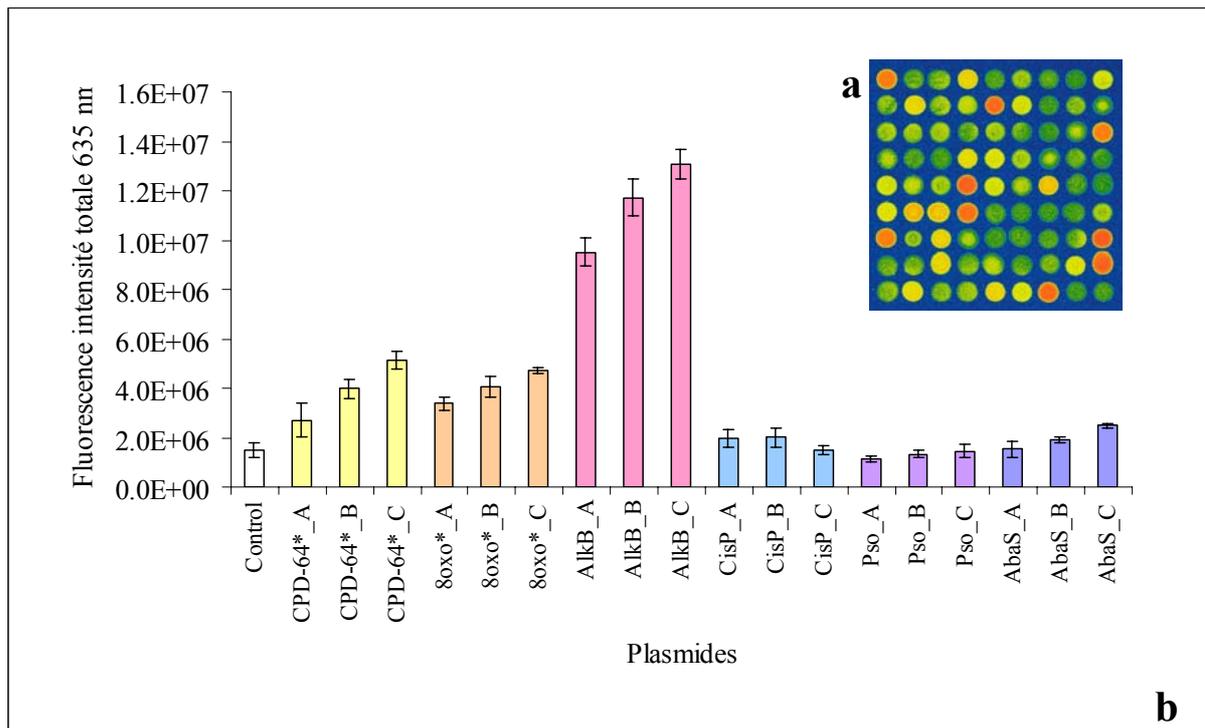


Figure 66 : Profil de réparation obtenu avec des extraits HeLa nucléaires à une concentration finale de 0,8 mg/ml. La réaction a été réalisée pendant 3h à 30°C avec une concentration en ATP de 2 mM. L'expérience a été réalisée en triplicata sur des biopuces au format 9x9, l'intensité totale de fluorescence a été mesurée et normalisée. En **a** est présentée une des images obtenues après lecture, en **b** est présenté le profil de réparation.

Le profil de réparation obtenu avec les extraits HeLa nucléaires présente des activités de réparation spécifiques. Pour les plasmides pCPD-64*, p8oxo*, pAlkB et pAbaS, un signal dépendant de la quantité de lésions et supérieur à celui du plasmide contrôle est présent. La réparation des plasmides pCisP, pPso quant à elle n'est pas dépendante de la quantité de lésion par dépôts, et ne dépasse pratiquement pas le niveau du signal du plasmide contrôle. Ce profil de réparation est donc différent de celui obtenu avec les extraits HeLa totaux ; notamment, le niveau de réparation du plasmide p8oxo est ici inférieur à celui de pCPD-64. De plus, une activité de réparation des plasmides pCisp et pPso était présente avec un lysat total de cellules HeLa alors qu'ici elle est absente. Comme nous avons utilisé les mêmes cellules HeLa pour préparer les deux types d'extraits, et que la composition des tampons est pratiquement identique, on peut donc penser que la méthode de préparation des extraits a une influence forte sur les activités enzymatiques de réparation mesurées.

b) Cinétique de réparation obtenue avec les extraits HeLa nucléaires

Afin de vérifier si les activités de réparation mesurées étaient bien dépendantes du temps de réaction, nous avons réalisé une cinétique sur trois temps : 45, 90, 180 min avec les extraits HeLa nucléaires, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 67**.

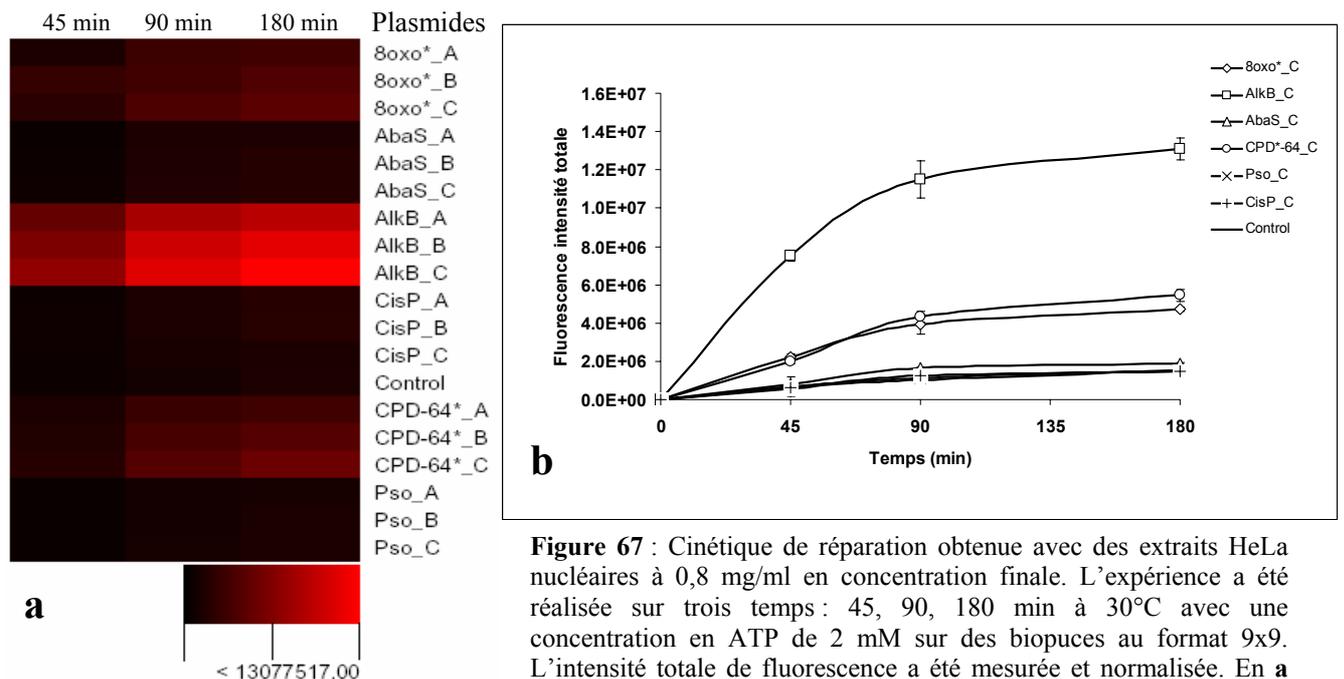


Figure 67 : Cinétique de réparation obtenue avec des extraits HeLa nucléaires à 0,8 mg/ml en concentration finale. L'expérience a été réalisée sur trois temps : 45, 90, 180 min à 30°C avec une concentration en ATP de 2 mM sur des biopuces au format 9x9. L'intensité totale de fluorescence a été mesurée et normalisée. En **a** est présentée la carte de couleur de l'expérience, en **b** est présenté le profil de réparation des plasmides de dilution C.

L'expérience de cinétique montre que, contrairement à ce que nous avons obtenu avec les extraits HeLa totaux, la réparation des lésions dépend du temps de réaction et atteint un plateau. Ceci renforce l'idée qu'un facteur cytoplasmique présent dans les extraits totaux est peut-être à l'origine de la dégradation de l'ADN observée. Il est aussi intéressant de noter que le même point d'inflexion que celui observé au temps 90 min avec les extraits HeLa nucléaires commerciaux est aussi présent, et que, passé ce temps, la réparation des différentes lésions semble atteindre un plateau. Cependant, certains profils sont différents, comme celui de la réparation de p8oxo* qui ne dépend plus du temps de manière linéaire. Les extraits cellulaires nucléaires semblent donc plus adaptés pour notre test que les extraits cellulaires totaux. Pour la suite de cette étude nous avons donc privilégié autant que possible la réalisation des extraits cellulaires à partir de ce protocole.

3) Optimisation de la préparation des extraits

a) La concentration en KCl

Le KCl est un composé très important car il permet de réaliser les lyses membranaires, mais il module aussi les interactions protéines/ADN. La concentration en KCl de la solution de réparation que nous déposons sur la biopuce dépend directement de la concentration en KCl de la solution d'extraits. En effet, les extraits nucléaires que nous réalisons ont une concentration en KCl de 400 mM, les activités de réparation de l'ADN nécessitent des concentrations de KCl comprises entre 50 et 100 mM. Nous devons donc diluer les extraits au moins quatre fois pour être dans une zone de concentration permettant aux enzymes d'avoir une activité de réparation optimale. Nous avons choisi de réaliser les expériences de réparation avec une concentration en KCl de 80 mM et ce en diluant cinq fois les extraits dans la solution de réparation. Afin de nous assurer que cette concentration était bien adaptée à notre test, nous avons réalisé trois préparations d'extraits HeLa nucléaires permettant d'obtenir trois concentrations de KCl différentes lorsqu'elles sont diluées au cinquième dans la solution de réparation. Cette méthode permet, sans réaliser de dialyse, d'avoir trois extraits pouvant être ajustés à la même concentration protéique lors de la réaction de réparation, mais dont les concentrations en KCl diffèrent. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés sur la **Figure 68**.

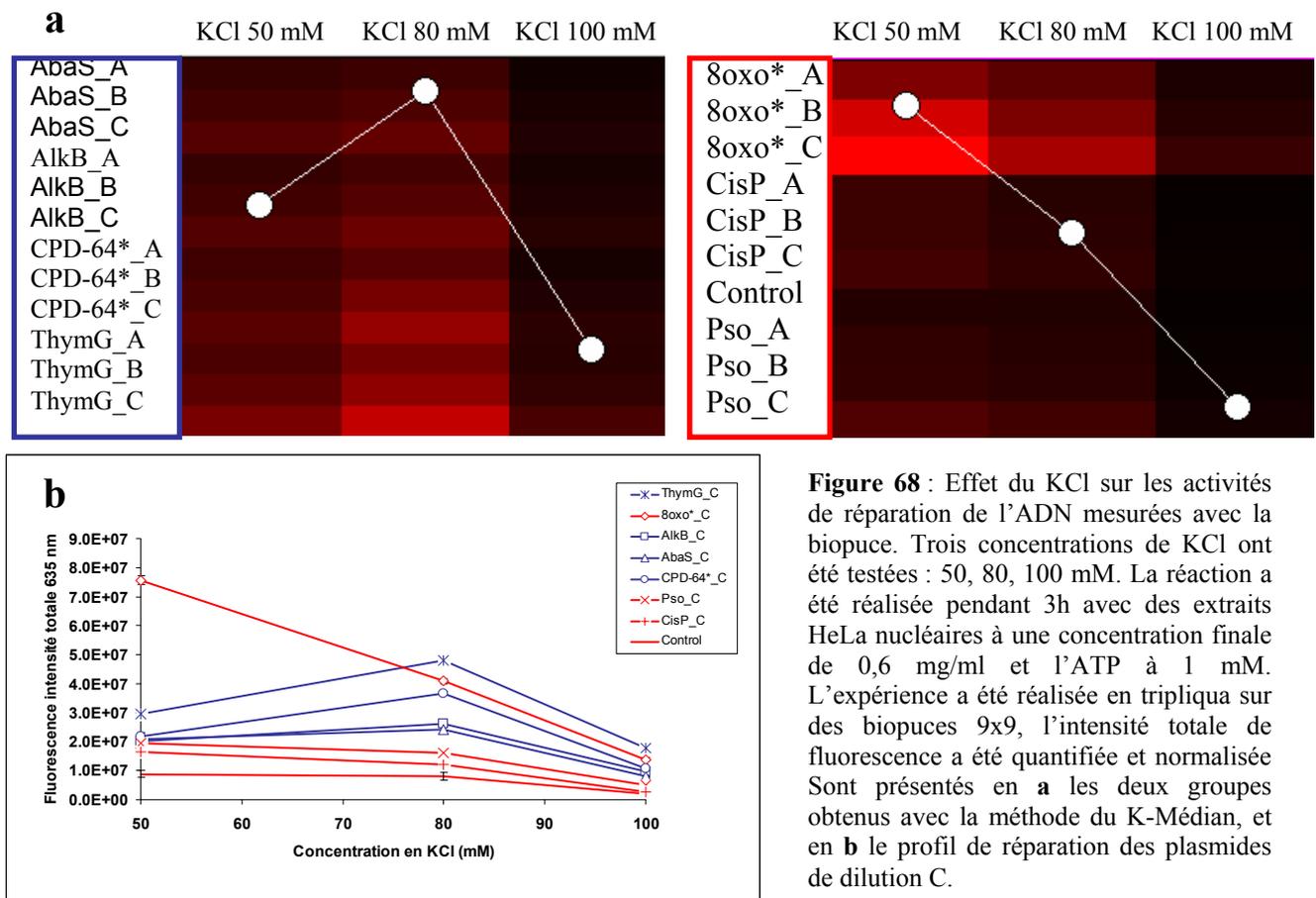


Figure 68 : Effet du KCl sur les activités de réparation de l'ADN mesurées avec la biopuce. Trois concentrations de KCl ont été testées : 50, 80, 100 mM. La réaction a été réalisée pendant 3h avec des extraits HeLa nucléaires à une concentration finale de 0,6 mg/ml et l'ATP à 1 mM. L'expérience a été réalisée en tripliqua sur des biopuces 9x9, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée. Sont présentés en **a** les deux groupes obtenus avec la méthode du K-Médian, et en **b** le profil de réparation des plasmides de dilution C.

Sur le profil de réparation (**Figure 68 b**), on constate pour tous les plasmides une concentration en KCl de 100 mM inhibe fortement les activités de réparation de l'ADN. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces conditions sont trop stringentes et empêchent les enzymes de se fixer sur l'ADN. Avec la méthode de regroupement K-Médian, nous avons pu montrer que deux groupes de plasmides peuvent être mis en évidence. Ceux qui ont leur pic d'activité de réparation à 50 mM (en rouge) : p8oxo, pPso, pCisP, pControl, et ceux dont l'activité maximale est obtenue avec 80 mM de KCl (en bleu) : pCPD-64, pAlkB, pAbaS, pThymG. Il est tout d'abord intéressant de constater que le niveau de réparation du témoin est plus important à 50 mM de KCl, ce qui suggère qu'à cette concentration les activités non spécifiques sont légèrement plus importantes. Le deuxième fait remarquable est l'activité de réparation de la 8-oxoG qui est très forte à 50 mM KCl et qui diminue pratiquement de moitié à 80 mM. Enfin, on constate que la répartition des plasmides entre les deux groupes ne se fait pas en fonction du type de système de réparation qui les prend en charge, on retrouve aussi bien des plasmides réparés par la REN ou la REB dans l'un ou l'autre des groupes. Cette expérience souligne une fois de plus le fait que nous mesurons des activités enzymatiques ayant leurs propres spécificités réactionnelles. Dans le cas du KCl, la

concentration de 80 mM permet d'obtenir la majorité des activités de réparation à leur maximum.

b) Concentration en Triton X-100

Afin de faciliter la lyse des membranes cellulaires, nous avons utilisé du Triton X-100. Ce détergent a la capacité de déstabiliser la membrane plasmique et de la rendre plus fragile. Cependant, nous avons constaté qu'avec le protocole mis au point pour les cellules HeLa, il était plus difficile de lyser les membranes des fibroblastes et des kératinocytes. Nous avons donc augmenté la concentration en triton X-100 de 0,01% à 0,05% afin de pallier ce problème et de pouvoir réaliser les extraits de différents types cellulaires avec un seul protocole expérimental. Cet ajustement s'est révélé très efficace dans le cas des fibroblastes et des kératinocytes. Cependant lorsque nous avons réalisé des extraits de cellules HeLa avec ce nouveau protocole, nous nous sommes aperçu que la quantité de protéines récupérée était plus faible et que le signal de réparation obtenu à quantité de protéines égale était beaucoup moins fort. Cet effet est illustré sur la **Figure 69**.

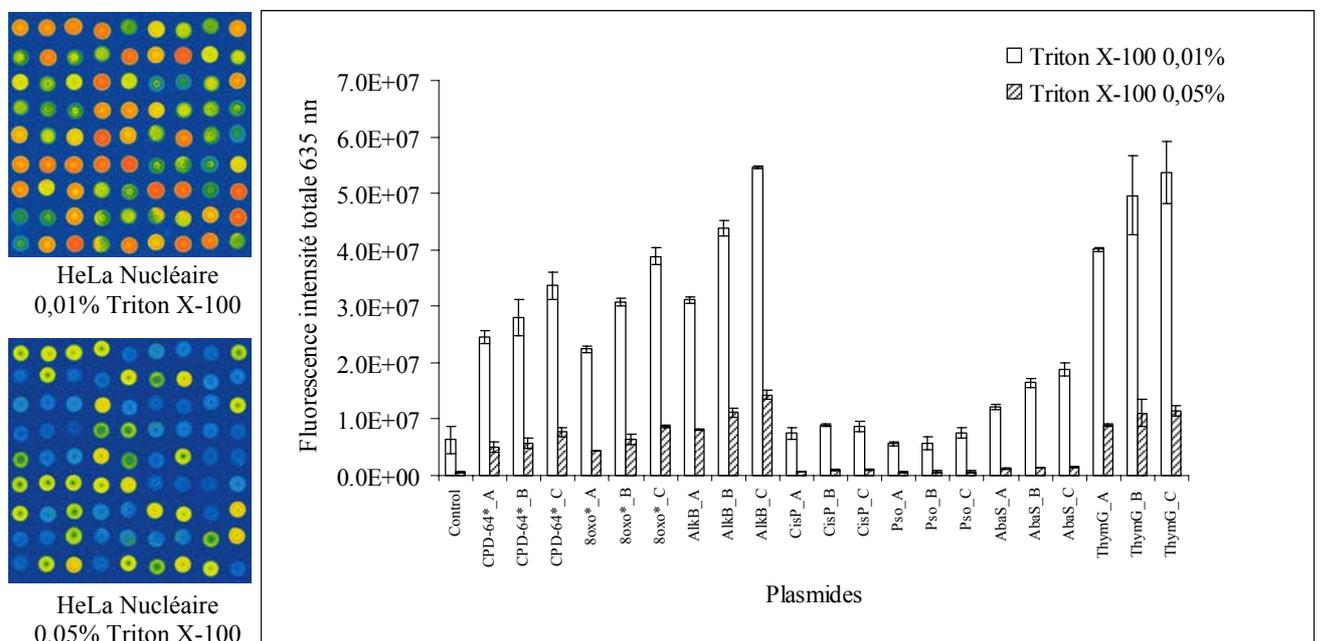


Figure 69 : Effet de la concentration en Triton X-100 lors de la préparation des extraits nucléaires. Deux concentrations de Triton X-100 ont été testées : 0,01 et 0,05%. La réaction a été réalisée pendant 3h avec des extraits HeLa nucléaires à une concentration finale de 0,532 mg/ml et l'ATP à 1 mM. L'expérience a été réalisée en triplicata sur des biopuces 9x9, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée. Sont présentées en **a** deux images de chaque condition, obtenues après lecture des biopuces. En **b** est présenté l'histogramme regroupant les intensités de fluorescence des différents plasmides de dilution C des deux conditions testées.

Ce phénomène a aussi lieu lors de la préparation d'extraits nucléaires de cellules sanguines. Nous pensons qu'il est dû au fait que chaque type cellulaire possède ses propres caractéristiques de résistance membranaire, et que, dans le cas des cellules HeLa, une trop grande concentration en Triton X-100 conduit à la rupture de la membrane plasmique, mais aussi de la membrane nucléaire, libérant ainsi les protéines du noyau en même en même temps que les protéines cytoplasmiques. Lors de la préparation d'extraits nucléaires, il faut donc prendre en compte le fait que chaque type cellulaire a ses propres conditions expérimentales de lyse. Nous avons donc utilisé différents protocoles en fonction des types cellulaires dont nous devions réaliser les extraits.

III) Conclusion

Avec la mise au point des conditions de réaction, nous avons montré que nous mesurons des activités enzymatiques de réparation ne partageant pas toutes les mêmes optimas réactionnels. Nous avons donc dû choisir des conditions permettant d'obtenir un niveau d'activité de réparation le plus élevé possible, et ce, pour la plus grande partie des lésions. Nous avons aussi mis en évidence que la méthode de préparation des extraits est très importante et doit être adaptée à notre test. Les extraits nucléaires répondent à ce critère car, contrairement aux extraits totaux, ils présentent des activités enzymatiques de réparation corrélées au temps de réaction. De plus, la composition du tampon de préparation d'extraits, à l'instar du tampon de réaction, peut influencer sur les activités de réparation. La concentration en KCl semble notamment très importante car elle module les interactions ADN / protéines. Enfin, la concentration en Triton X-100 doit être adaptée aux types cellulaires dont ont réalise les extraits afin d'obtenir une lyse spécifique de la membrane plasmique.

Chapitre IV : Validation du test

Introduction

Nous allons présenter ici les expériences que nous avons réalisées afin de nous assurer de la spécificité du test quant aux activités enzymatiques mesurées. Deux types d'expériences ont été conduites, premièrement celle permettant une validation du test basée sur un principe biochimique : utilisation d'inhibiteur, de compétiteur, d'anticorps ; et celle basée sur un principe biologique : complémentation de cellules déficientes.

I) Validation biochimique

Une partie des expériences que nous avons réalisées pour mettre au point le test contribue à le valider. Par exemple, le fait que le signal de réparation mesuré soit dépendant de la quantité d'extraits et du temps de réaction, suggère que nous mesurons une activité enzymatique. Pour confirmer cette observation, nous avons réalisé une expérience de réparation avec des extraits HeLa nucléaires commerciaux bouillis et nous n'avons obtenu aucun signal (données non montrées). Enfin, le fait que les réactions mesurées soient dépendantes de la quantité de lésions mais aussi de la concentration en ATP et en $MgCl_2$ contribue à nous faire penser que ces réactions sont bien dues aux mécanismes de réparation de l'ADN. Afin d'aller plus loin dans leur caractérisation, nous avons réalisé les expériences de validation qui sont détaillées ci-dessous.

A) Mise en évidence des activités de la REB et de la REN

1) Effet de la concentration en ATP

Nous avons pu mettre en évidence les activités enzymatiques de la REB avec une expérience de réparation en utilisant simultanément deux nucléotides marqués : le dCTP-Cy3 et le dGTP-Cy5, et en faisant varier la concentration en ATP en absence du système créatine kinase/créatine phosphate de régénération. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés sur la **Figure 70**. On constate que, pour une grande partie des plasmides lésés, il n'y a pratiquement pas de différences entre le profil de

réparation obtenu avec le dGTP-Cy5 ou le dCTP-Cy3. Ce sont les plasmides pCPD-64, pCisP, pPso réparés par la REN, ainsi que le plasmide pAbaS réparé par la REB et enfin pControl. Pour ces plasmides, il n'y a donc pas d'incorporation préférentielle de l'un ou l'autre des nucléotides en fonction de la concentration en ATP. Dans le cas des plasmides p8oxo et pThymG, on constate au contraire que les profils obtenus avec l'un ou l'autre des marqueurs diffèrent, un nucléotide est plus incorporé que l'autre. Lors de la réparation de p8oxo, l'incorporation de dGTP-Cy5 est plus importante que celle de dCTP-Cy3 quand la concentration en ATP augmente, ce qui pourrait correspondre à une incorporation spécifique de guanine lors de la réparation des 8-oxoGs. Au contraire, pour le plasmide pThymG, l'incorporation de dCTP-Cy5 est plus importante que celle de dGTP-Cy3, dans ce cas on peut penser que cela correspond à une incorporation spécifique de cytosine lors de la réparation de 5OHdC présente dans le plasmide pThymG (produit de dégradation des diols de cytosines).

Une expérience contrôle a été effectuée afin de s'assurer que la différence d'incorporation observée était bien spécifique et qu'elle n'était pas liée au type de fluorochrome utilisé. Cette expérience a été réalisée avec une concentration en ATP de 4 mM afin d'être dans des conditions où une différence d'incorporation de nucléotides est présente pour p8oxo et pThymG. Nous avons utilisé deux combinaisons de nucléotides marqués dCTP-Cy5 dCTP-Cy3 ou dGTP-Cy5 dCTP-Cy3, les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 71**. On constate que l'incorporation de dCTP-Cy5 et de dCTP-Cy3 est identique pour les lésions 8-oxoG et diols de thymines, alors que l'on a bien une différence d'incorporation avec dGTP-Cy5 et dCTP-Cy3 comme observée lors de l'expérience présentée sur la **Figure 70**. Pour toutes les autres lésions, il n'y a pas de différences d'incorporation avec un marquage dGTP-Cy5 dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 dCTP-Cy3 (données non montrées).

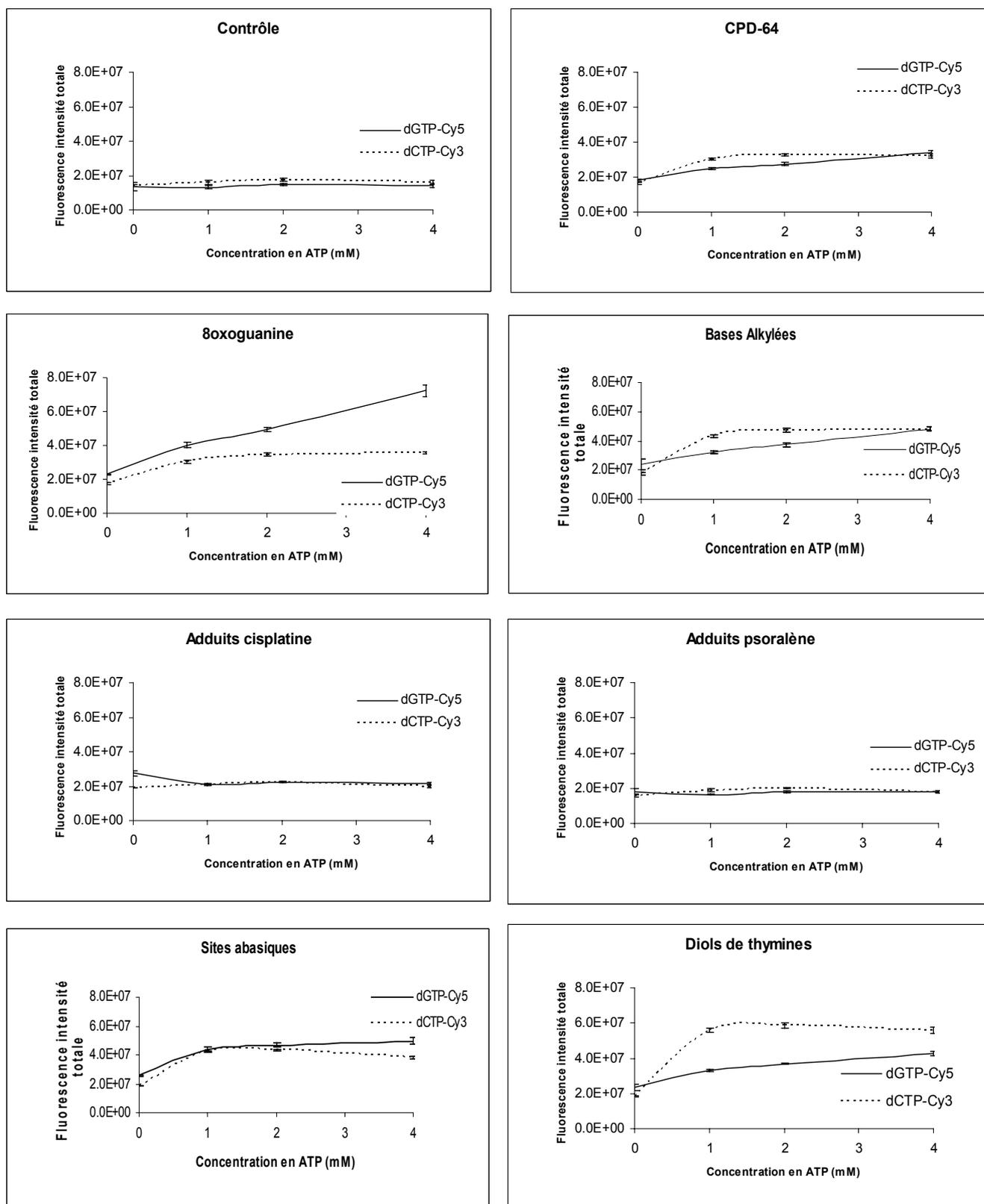


Figure 70 : Effet de la concentration en ATP sur les activités de réparation. Quatre concentrations ont été testées : 0, 1, 2, 4 mM. Sont présentés les profils de réparation des dilutions C des différents plasmides obtenus avec chacun des deux nucléotides marqués. La réaction a été réalisée en triplicata avec des extraits HeLa commerciaux à 2 mg/ml, pendant 1h à 30°C. Les biopuces utilisées étaient au format 20x4, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée.

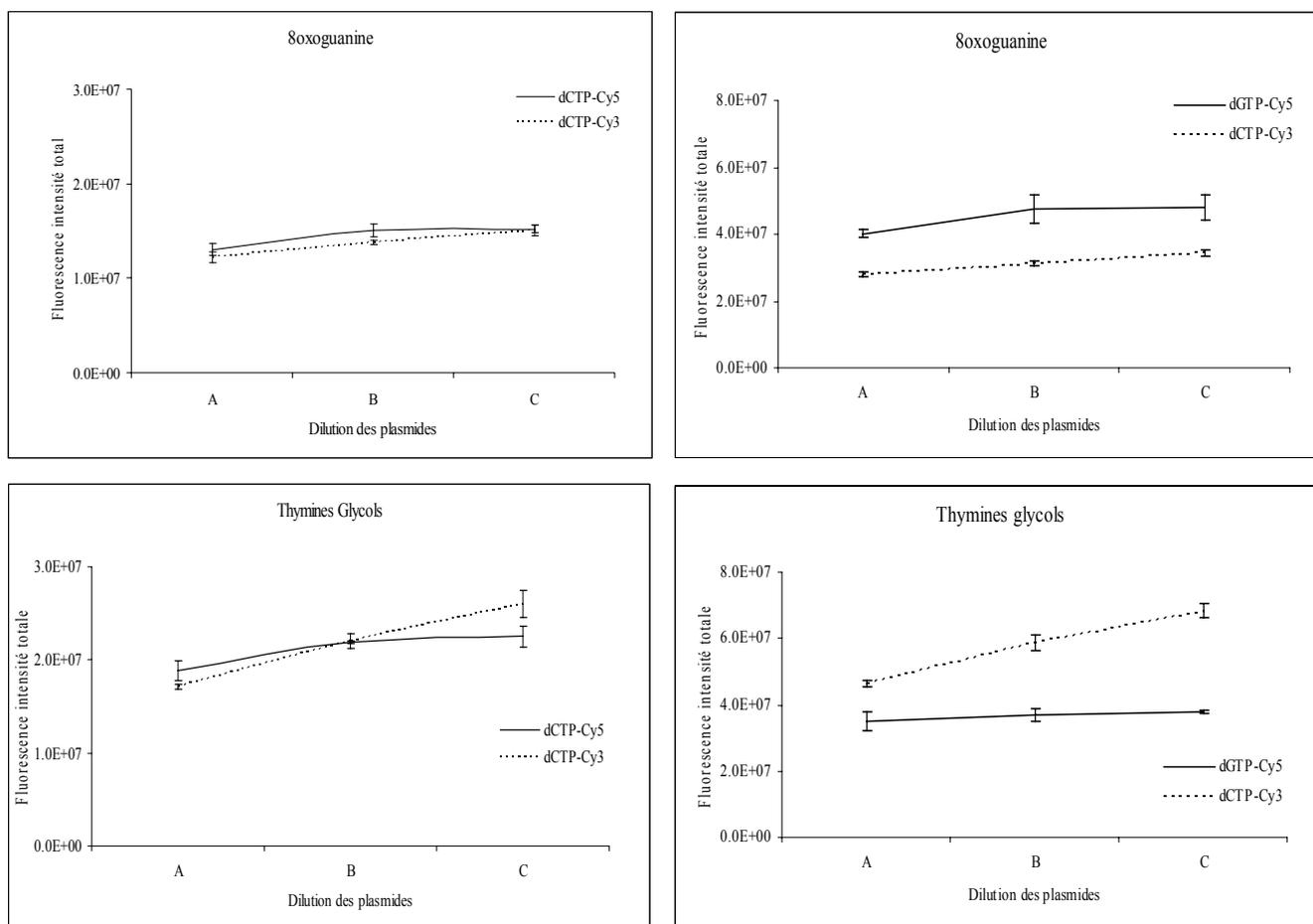


Figure 71 : Etude de l'incorporation de nucléotides marqués : dCTP-Cy5 dCTP-Cy3 ou dGTP-Cy5 dCTP-Cy3 avec une concentration en ATP de 4 mM. Sont présentés les profils de réparation des plasmides, ils représentent l'intensité totale de fluorescence en fonction de la dilution des plasmides. Seuls les résultats obtenus pour les plasmides portant la 8-oxoG et les thymines glycols obtenues avec les nucléotides marqués : dCTP-Cy5 dCTP-Cy3 ou dGTP-Cy5 dCTP-Cy3 sont présentés. La réaction a été réalisée en dupliqua avec des extraits HeLa commerciaux à 2 mg/ml, pendant 1h à 30°C. Les biopuces utilisées étaient au format 20x4, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée.

Le fait que cette incorporation spécifique de nucléotides n'ait lieu que sur des plasmides réparés par la REB, et que les nucléotides incorporés de manière préférentielle correspondent aux nucléotides lésés présents sur le plasmide nous amène à penser que ce phénomène est dû à la voie de resynthèse courte de la REB qui est ici mise en évidence. En effet, au cours de cette voie de réparation, un ou deux nucléotides correspondant au nucléotide lésé excisé est incorporé. La voie de resynthèse courte de la REB pourrait donc expliquer pourquoi un nucléotide est plus fortement incorporé. La voie de resynthèse longue de la REB quant à elle ne permet pas d'incorporation spécifique de l'un ou l'autre des nucléotides car elle est réalisée, tout comme l'étape de resynthèse de la REN, sur plusieurs nucléotides. Le fait

qu'aucun des plasmides connu pour être réparé par la REN ne présente d'incorporation préférentielle de l'un ou l'autre des deux nucléotides marqués conforte cette idée.

2) Inhibition des polymérase epsilon et delta (ϵ/δ)

Afin de mettre en évidence les activités de réparation REB et REN, nous avons effectué une expérience en utilisant de l'aphidicoline. Cette molécule est un inhibiteur spécifique des polymérase ϵ et δ qui sont impliquées dans la voie de resynthèse de la REN ainsi que dans la voie de resynthèse longue de la REB. Pour rappel, la voie de resynthèse courte de la REB est réalisée par la polymérase β , qui elle n'est pas inhibée par l'aphidicoline. Nous avons testé différentes concentrations en aphidicoline : 0, 0,5, 2 et 10 $\mu\text{g/ml}$, et ce en présence des nucléotides marqués dGTP-Cy5 dCTP-Cy3 et une concentration en ATP de 4 mM. Nous avons utilisé ces conditions bien particulières afin de pouvoir déterminer si les incorporations spécifiques de nucléotides que nous avons observées sont dues ou non à la voie de resynthèse courte de la REB. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés sur la **Figure 72**. On constate que pour tous les dommages il y a une diminution du signal de réparation mesuré. Cette diminution est observée avec l'un ou l'autre des deux nucléotides marqués, et ce, aussi bien pour les lésions réparées par la REN que pour celles réparées par la REB. Une partie de l'incorporation des nucléotides passe donc par les polymérase ϵ et δ , suggérant que la réparation par la REB qui a lieu sur le support passe par la voie de resynthèse longue. Cependant, si l'on compare les profils de réparation obtenus avec les deux nucléotides marqués, on observe, pour la réparation des diols de thymine, une différence d'incorporation entre le dCTP-Cy3 et le dGTP-Cy5 identique à celle observée dans les expériences décrites précédemment. L'incorporation du dCTP-Cy3 semble donc être moins inhibée en présence d'aphidicoline que l'incorporation de dGTP-Cy5 ; l'incorporation du dCTP-Cy3 ne passe donc qu'en partie par les polymérase ϵ et δ . Cette constatation nous conforte donc sur le fait que la voie de resynthèse courte de la REB, et notamment la polymérase β , pourrait intervenir dans la réparation de ce dommage. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de différence d'incorporation de dGTP-Cy5 et de dCTP-Cy3 pour la réparation de la 8-oxoG lorsque de l'aphidicoline est ajoutée. Ce qui signifie que l'incorporation préférentielle de dGTP-Cy5 lors de la réparation de la 8-oxoG passe par les polymérase ϵ et δ , et non la polymérase β comme nous pouvions le penser.

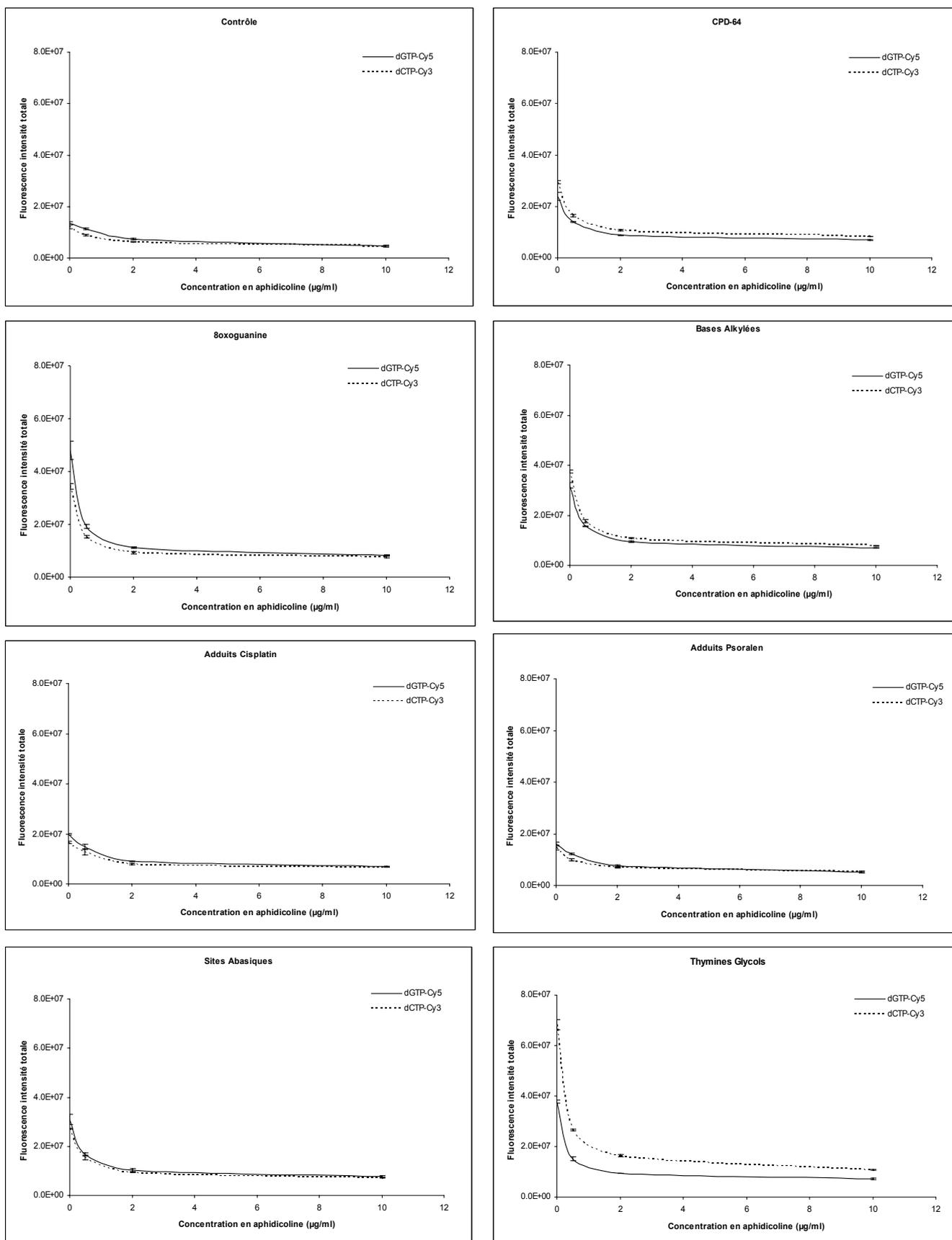


Figure 72 : Effet de la concentration en Aphidicoline sur les activités de réparation, quatre concentrations ont été testées : 0, 0,5, 2, 10 mM, la concentration en ATP était de 4 mM, et les nucléotides marqués étaient dGTP-Cy5 et dCTP-Cy3. Sont présentés les profils de réparation obtenus lors de l'expérience. La réaction a été réalisée en triplicata avec des extraits HeLa commerciaux à 2 mg/ml, pendant 1h à 30°C. Les biopuces utilisées étaient au format 20x4, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée.

3) Conclusion

Nous venons de montrer que lors des réactions de réparation que nous mesurons une grande partie de l'incorporation des nucléotides se fait par les polymérases répllicationnelles ϵ et δ , suggérant que la réparation passe par la REN et la voie de resynthèse longue de la REB. Toutefois, il semblerait que la voie de resynthèse courte de la REB pourrait, en utilisant des conditions de réactions particulières, être mise en évidence. Pour compléter ces résultats, il serait important de réaliser l'expérience en faisant un échange de marqueur (Dye Swap) afin de pleinement s'assurer que la structure du marqueur et la nature du nucléotide n'influent pas sur l'incorporation. Enfin, l'utilisation d'acide pamoïque inhibant la polymérase β permettrait de définitivement conclure quant à son implication.

B) Inhibition par compétition

Afin de mesurer la spécificité du test, nous avons effectué des expériences en présence d'un plasmide compétiteur. Les enzymes de réparation ont donc le choix de réparer les plasmides présents sur la biopuce, ou bien les plasmides compétiteurs présents dans la solution. Nous avons réalisé cette expérience avec comme plasmide compétiteur soit le plasmide contrôle soit le plasmide portant la 8-oxoG. La quantité de plasmide compétiteur que nous avons ajouté correspond à neuf fois la quantité de plasmide présente sur la biopuce, ce qui, rapporté en nombre de lésions, représente un rapport de 2,7. Ce chiffre est majoré car pour déterminer le calcul, nous ne prenons pas en compte le nombre de dommages cisplatine et psoralène dont nous ne connaissons pas la quantité. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés sur la **Figure 73**.

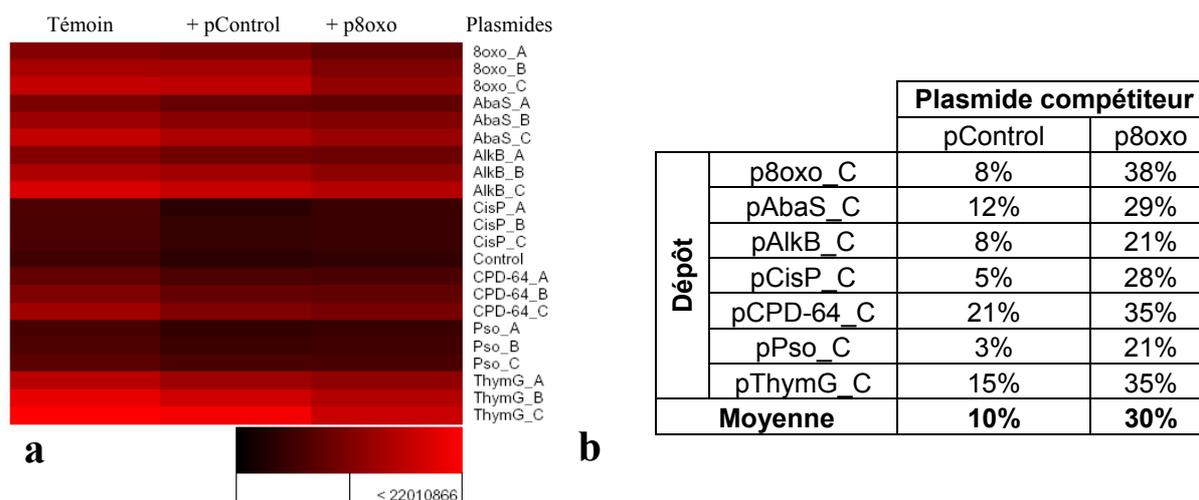


Figure 73 : Effet de la présence de plasmides compétiteurs sur les activités de réparation, 44,8 ng de plasmides ont été ajoutés dans la solution de réparation. Sont présentés en **a** la carte de couleur de l'expérience, et en **b** le tableau regroupant les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque plasmide de dilution C avec comme compétiteur pControl ou p8oxo. La réaction a été réalisée en triplicata avec des extraits HeLa commerciaux à 2 mg/ml, pendant 1h30 à 30°C. Les biopuces utilisées étaient au format 20x4, l'intensité totale de fluorescence a été quantifiée et normalisée.

On observe qu'avec le plasmide contrôle comme compétiteur, une faible diminution du signal de réparation est observée, avec une inhibition moyenne de 10%. Cependant pCPD-64 présente un signal de réparation plus fortement diminué (21%) que les autres plasmides. Avec le plasmide compétiteur p8oxo, il y a une diminution bien plus forte de la réparation de tous les plasmides, en moyenne 30%. La réparation du plasmide portant la 8-oxoG est plus particulièrement diminuée ; en effet on constate une réduction de sa réparation pratiquement égale à 40%.

La faible diminution obtenue avec l'utilisation du plasmide contrôle comme compétiteur nous indique que les réactions que nous mesurons sont très spécifiques. La plus forte réduction de signal observée pour pCPD-64 suggère toutefois que pControl est capable de recruter des protéines impliquées dans la réparation des photoproduits. K. Sugawara a montré que le complexe XPC / hHR23B de la REN est capable de se fixer sur de l'ADN non lésé²⁴⁴, ce qui pourrait expliquer nos observations. On peut cependant s'étonner de la diminution globale obtenue avec p8oxo comme compétiteur. En effet, même les plasmides réparés par la REN présentent une réduction importante de leur niveau de réparation. Ceci peut s'expliquer simplement par le fait que la voie de resynthèse longue de REB et la REN utilisent toutes les deux les mêmes polymérases ϵ/δ ainsi que PCNA, et d'autres facteurs protéiques peuvent aussi être utilisés de manière commune entre ces voies de réparation. Par conséquent, un plasmide comportant un dommage typiquement réparé

par la REB peut aussi agir en tant que compétiteur pour un plasmide comportant une lésion réparée par la REN.

C) Inhibition des réactions enzymatiques à l'aide d'anticorps

Nous avons voulu inhiber spécifiquement des protéines impliquées dans la REN : XPF, ERCC1, XPA. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de réparation en présence de différentes concentrations d'anticorps, mais nous n'avons pas obtenu de résultats concluants. Cela peut s'expliquer par le fait que nous n'avons peut être pas réussi à trouver des conditions de réaction assez limitantes pour mettre en évidence l'effet des anticorps. Néanmoins l'utilisation de cette technique reste assez délicate. En effet, il faut que l'anticorps se fixe sur un épitope permettant d'inhiber l'activité enzymatique de la protéine, or nous ne savons pas si les anticorps que nous avons utilisés présentent cette caractéristique. Enfin, l'épitope doit être accessible pour que l'anticorps puisse se fixer dessus, comme certaines des protéines que nous cherchions à inhiber se trouvent sous forme de complexes avec d'autres protéines, l'épitope de l'anticorps pouvait se trouver masqué. Des pistes restent donc ouvertes pour valider notre test avec ce type d'expériences, notamment essayer différents anticorps spécifiques d'une même protéine, et essayer de se mettre dans des conditions plus limitantes.

II) Validation biologique du test

Pour valider biologiquement le test nous avons voulu réaliser la complémentation d'extraits nucléaires de fibroblastes de patients atteints de *Xeroderma pigmentosum*. Historiquement les groupes de complémentation XP ont été déterminés à l'aide d'expériences de complémentation en réalisant la fusion de cellules somatiques de patients à l'aide de polyéthylène glycol. Cette technique est toujours utilisée tout comme les transferts de chromosomes ou de gènes²⁴⁵⁻²⁴⁷. Les expériences de complémentation que nous avons réalisées consistaient à mélanger deux extraits nucléaires déficients pour une même voie de réparation, mais mutés chacun pour un gène différent, ainsi chaque extrait apporte à l'autre une protéine fonctionnelle qu'il ne possède pas. Si les extraits se complémentent alors une activité

de réparation de dommages UV induits, par exemple, peut être observée. Pour réaliser les expériences de complémentation, nous avons utilisé deux lignées données par le professeur Allan Lehmann. Une lignée déficiente pour la protéine XPC et l'autre pour la protéine XPD. Très peu d'articles décrivent des expériences de complémentation *in vitro* à partir d'extraits de fibroblastes XP humains¹³. Ces expériences ont donné des résultats très intéressants, mais nous rencontrons de grandes difficultés pour les reproduire, c'est pourquoi les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit. Nous pouvons toutefois dire que nous avons observé une diminution globale de la réparation de tous les dommages avec les extraits nucléaires de fibroblastes XPC. Ces résultats ont été confortés par les expériences réalisées au laboratoire par Anne-Laure Raffin. Les modèles cellulaires qu'elle utilise, développés par Denis Biard du Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité du CEA Fontenay aux Roses, sont déficients en protéine XPC grâce à l'expression stable d'ARNsi. La complémentation d'extraits cellulaires, à l'instar de l'inhibition à l'aide d'anticorps, est très délicate à réaliser. Des phénomènes de compétition peuvent avoir lieu entre la protéine mutée et la protéine normale, de plus nous ne savons pas où se localise la mutation sur la protéine, ni son degré de sévérité. A cela s'ajoutent les interactions entre les activités des différents systèmes de réparation, qui pourraient dans le cas de patients XP se compenser afin de pallier à la déficience de la voie mutée.

Beaucoup plus de temps aurait été nécessaire afin de trouver les conditions adéquates pour réaliser ce type d'expérience. De plus, il serait aussi envisageable d'utiliser des systèmes plus simples tels que les bactéries qui présentent un grand nombre de mutants dans différentes voies de réparation permettant ainsi de réaliser des complémentations de différents systèmes de réparation. Enfin, une approche intéressante pourrait consister à utiliser des systèmes de réparation reconstitués *in vitro*, basés sur l'utilisation de protéines purifiées. On pourrait alors observer l'effet causé sur les activités de réparation des différentes lésions par le retrait d'une protéine.

III) Conclusion

Nous avons montré que les activités de réparation que nous mesurons sont spécifiques des plasmides comportant des dommages et que le signal mesuré dépend de la quantité de lésions. Cette spécificité est d'autant plus importante que les signaux de réparation obtenus en présence de plasmide contrôle compétiteur dans la solution de réparation sont élevés. Bien que pour l'instant les résultats obtenus à l'aide de cellules déficientes XP soient difficiles à interpréter, nous avons montré que l'étape de resynthèse, lors du test, est réalisée en partie par les polymérases ϵ et δ connues pour être impliquées dans la voie de resynthèse longue de la REB et celle de la REN. De plus, en utilisant des conditions spécifiques, nous avons mis en évidence l'implication possible de la voie de resynthèse courte de la REB dans la réparation du plasmide comportant des diols de thymines. Toutes ces observations concourent à démontrer que les activités enzymatiques mesurées lors de notre test sont spécifiquement liées aux systèmes de réparation de l'ADN.

Chapitre V : Expériences applicatives

Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter deux expériences applicatives réalisées à l'aide de la biopuce que nous avons mise au point. Sera abordé en premier lieu l'établissement de profils de réparation au niveau basal de différents types cellulaires humains. A travers ces expériences, nous voulions observer si des cellules de différents types possédaient des profils de réparation identiques ou si une régulation spécifique des activités enzymatiques des protéines de réparation s'opérait au sein des tissus. La seconde expérience présentée consistait à étudier l'effet de différentes doses d'irradiation de rayon gamma sur les activités de réparation cellulaire, et plus particulièrement l'effet de dose adaptative. Plusieurs articles ont montré que les cellules pouvaient mieux supporter une forte dose d'irradiation si elles avaient été préalablement préparées à l'aide d'une faible dose. Nous avons utilisé notre outil pour observer si cette adaptation passe aussi par une régulation spécifique des activités enzymatiques de réparation.

I) Etude des profils de réparation de différents types cellulaires

Pour l'étude des profils de réparation, nous nous sommes focalisés sur des cellules humaines issues de cultures primaires ou de prélèvement sanguin. Nous avons fait ce choix, plutôt que d'utiliser des cellules humaines transformées, afin d'éliminer le biais inhérent généré par le processus d'immortalisation de cellules. Il est assez difficile d'avoir accès à des cellules humaines primaires, par conséquent le choix des types cellulaires à tester a été restreint. Nous avons toutefois pu réaliser des expériences sur des fibroblastes et des kératinocytes mis en culture à partir de biopsies de peaux humaines, ainsi que sur des cellules sanguines.

A) Fonction et localisation des cellules étudiées

1) Les cellules de la peau : fibroblastes et kératinocytes

Les fibroblastes et les kératinocytes sont des cellules présentes dans la peau humaine qui ont des fonctions et une localisation totalement différentes. Cependant elles sont toutes confrontées aux lésions de l'ADN induites par les UV ; on peut donc penser qu'elles possèdent des activités de réparation adaptées.

a) Les fibroblastes

Les fibroblastes se situent dans le derme où leur fonction est de sécréter des protéines de structure telles que le collagène ou la fibrine qui permettent au derme de jouer son rôle de tissu de soutien. Les fibroblastes sont des cellules quiescentes. Elles entrent rarement en division et leur renouvellement est donc très limité. Enfin, les fibroblastes sont susceptibles d'être soumis au rayonnement UVA qui pénètre jusque dans le derme et forme des lésions de l'ADN de type DCP mais aussi de la 8-oxoG²⁴⁸.

b) Les kératinocytes

Les kératinocytes eux se situent dans l'épiderme. Ils existent sous plusieurs formes. Les kératinocytes indifférenciés qui sont localisés au niveau de la couche basale se divisent continuellement. Une partie des kératinocytes issus de cette division se différencient et migrent de la couche basale vers la surface de la peau. En se différenciant, ils perdent à terme leur noyau et produisent de la kératine. Ils vont alors agir comme une véritable barrière face aux éléments extérieurs à l'organisme. Par conséquent, la durée de vie des kératinocytes en voie de différenciation est courte, alors que celle des kératinocytes souches est beaucoup plus longue. Nous avons réalisé nos expériences sur une population de kératinocytes n'ayant subi que deux passages, composée majoritairement de kératinocytes très peu différenciés. Les kératinocytes subissent, tout comme les fibroblastes, les effets du rayonnement UVA mais aussi du rayonnement UVB qui est à l'origine de lésions de l'ADN de type DCP et pp(6-4). Ils ont donc à faire face à un plus grand nombre de lésions de type DCP et pp(6-4) que les fibroblastes.

2) Les cellules mononuclées du sang périphérique

Les cellules sanguines que nous avons testées sont les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP). Il s'agit principalement de lymphocytes (85%) et de monocytes (15%). Il faut donc avoir à l'esprit que nous n'avons pas affaire à une population homogène de cellules. Les lymphocytes sont des cellules quiescentes qui entrent fortement en divisions lorsqu'elles sont activées lors de la réponse immunitaire. Au cours de cette réponse, ils sont responsables de la sécrétion d'anticorps. Leur durée de vie exacte reste non déterminée mais est estimée à plusieurs années. Les monocytes quant à eux restent dans le sang circulant quelques jours puis se différencient en macrophages dans les tissus.

B) Comparaison de profils de réparation cellulaire

1) Comparaison des profils de réparation de trois cultures primaires de fibroblastes

Nous avons testé si des différences de profils de réparation existent entre des fibroblastes d'individus distincts. Les activités enzymatiques de réparation de fibroblastes de trois donneurs âgés respectivement de 16, 18 et 30 ans ont été testées. Pour cela, la culture des fibroblastes a été réalisée de manière rigoureusement identique. Ils ont été cultivés en même temps, dans le même milieu de culture, et récoltés à un nombre de passages très proches. De leur côté les extraits nucléaires, le dosage protéique et le test de réparation ont aussi été réalisés simultanément. Les résultats obtenus lors de l'expérience de réparation sont présentés sur la **Figure 74**. On constate que, pour les trois donneurs, les profils de réparation obtenus sont pratiquement identiques. Les dommages les plus fortement réparés sont les sites abasiques, les bases alkylées et les diols de thymines. Les lésions avec une réparation plutôt moyenne sont les CPD-64 et la 8-oxoG, enfin une très faible réparation des dommages psoralène est observée.

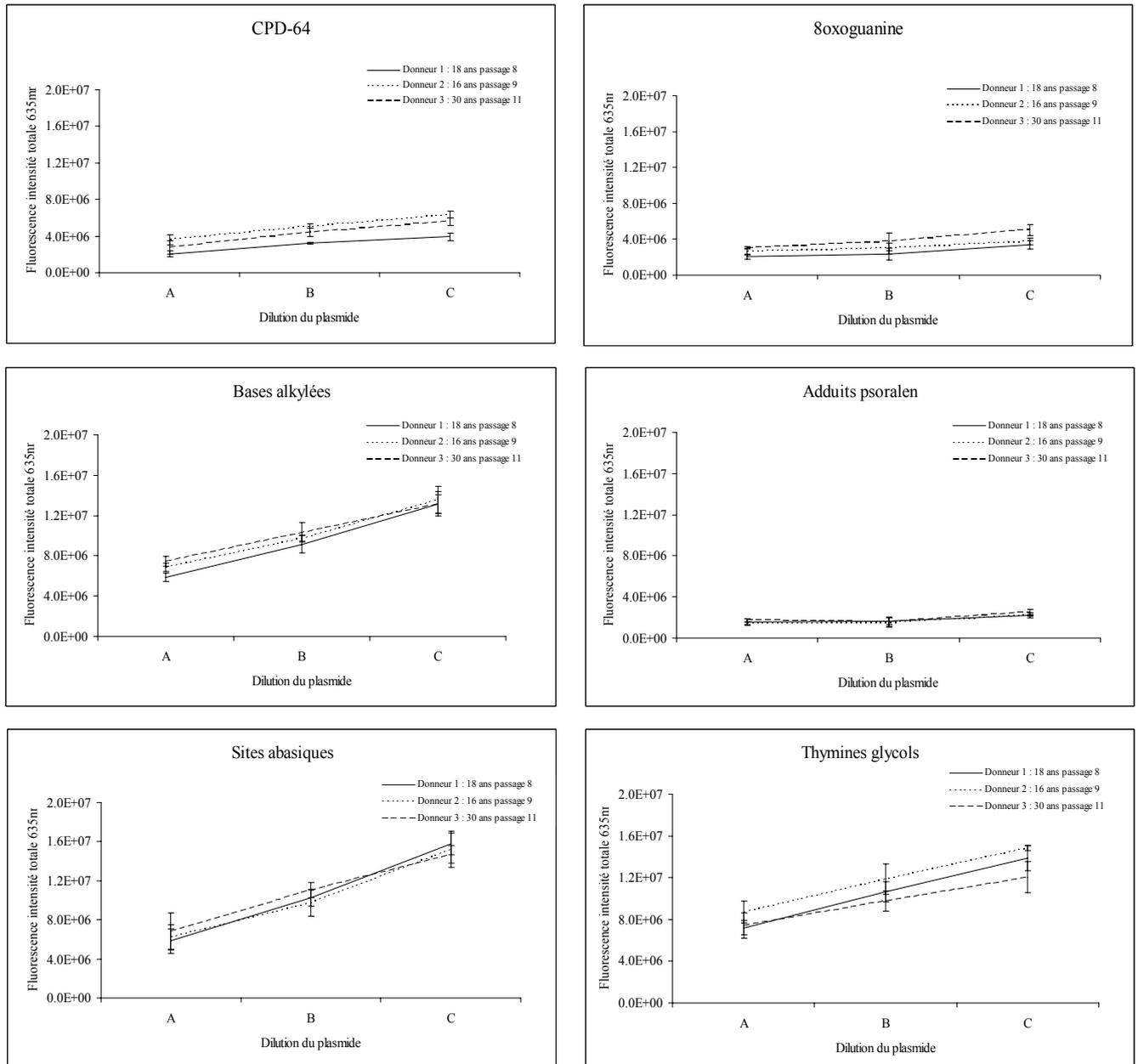


Figure 74 : Profils de réparation de fibroblastes issus de trois donneurs différents. L'âge des donneurs 1 et 2 était de 18 et 16 ans, l'âge du donneur 3 était de 30 ans. Le nombre de passage est très proche pour les trois lignées : donneur 1 passage 8, donneur 2 passage 9 et donneur 3 passage 11. Les profils de réparation représentent l'intensité de fluorescence totale à laquelle a été retranchée l'intensité de fluorescence du contrôle en fonction de la dilution de plasmide. L'expérience a été réalisée pendant 3h à 30°C avec une concentration d'extraits de 0,5 mg/ml. Nous avons utilisé des lames au format 20x4, les résultats ont été normalisés. Les données obtenues avec le plasmides pCisP ne sont pas présentées car ce plasmide présentait un défaut sur ce lot de biopuces.

On observe une forte similitude entre les différents profils alors qu'une différence d'âge assez importante existe entre le donneur 3 et les donneurs 1 et 2. De plus, les différences génétiques qui existent entre les individus ne semblent pas non plus agir fortement sur les profils de réparation. Il faut rester prudent quant à cette interprétation car nous n'avons testé qu'un nombre très réduit de donneurs, une étude sur un grand

nombre de personnes pourrait nous permettre d'appréhender de manière plus précise les variabilités de profils de réparation inter-individus.

Un autre fait marquant est que nous n'observons pas de corrélation entre le nombre de passage des cellules et les activités de réparation, ceci est probablement dû au faible écart de ce dernier entre les différentes lignées. Il est cependant décrit dans la littérature que le nombre de passage peut avoir un effet sur le niveau de réparation obtenu²⁴⁹. Enfin, il est surprenant de constater que le niveau de réparation des dommages induits par les UVA est assez bas ; on aurait pu penser que le fibroblaste aurait une activité de réparation de ces dommages plus importante. Toutefois, comme nous mesurons une activité basale de réparation, il serait pertinent de mesurer les activités de réparation après une exposition aux UVA par exemple.

2) Comparaison des activités de réparation de fibroblastes et de kératinocytes

Nous voulions comparer les activités de réparation de fibroblastes avec celles de kératinocytes afin d'observer si chacun de ces types cellulaires cutanés possède un profil de réparation spécifique. Les kératinocytes utilisés pour la réalisation des extraits nucléaires sont issus d'une culture primaire qui a été réalisée à partir d'une biopsie mammaire. L'âge de la donneuse est de 16 ans et les extraits nucléaires ont été réalisés sur les kératinocytes au passage 2. Nous avons utilisé des extraits nucléaires de fibroblastes du donneur 3 au passage 8 pour effectuer la comparaison car ils sont également issus d'une biopsie mammaire. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont présentés sur la **Figure 75**. On constate que les deux types cellulaires ont des profils de réparation totalement différents. Les fibroblastes réparent sur la biopuce tous les dommages excepté les adduits psoralène. Les kératinocytes eux aussi ne réparent pas les adduits psoralène, et présentent un niveau de réparation de la 8-oxoG très bas. Pour les sites abasiques, les diols de thymines, les bases alkylées, les kératinocytes possèdent une activité de réparation spécifique mais qui est inférieure à celle des fibroblastes. Cependant, pour les adduits cisplatine, ils ont une activité de réparation importante similaire à celle rencontrée avec les fibroblastes.

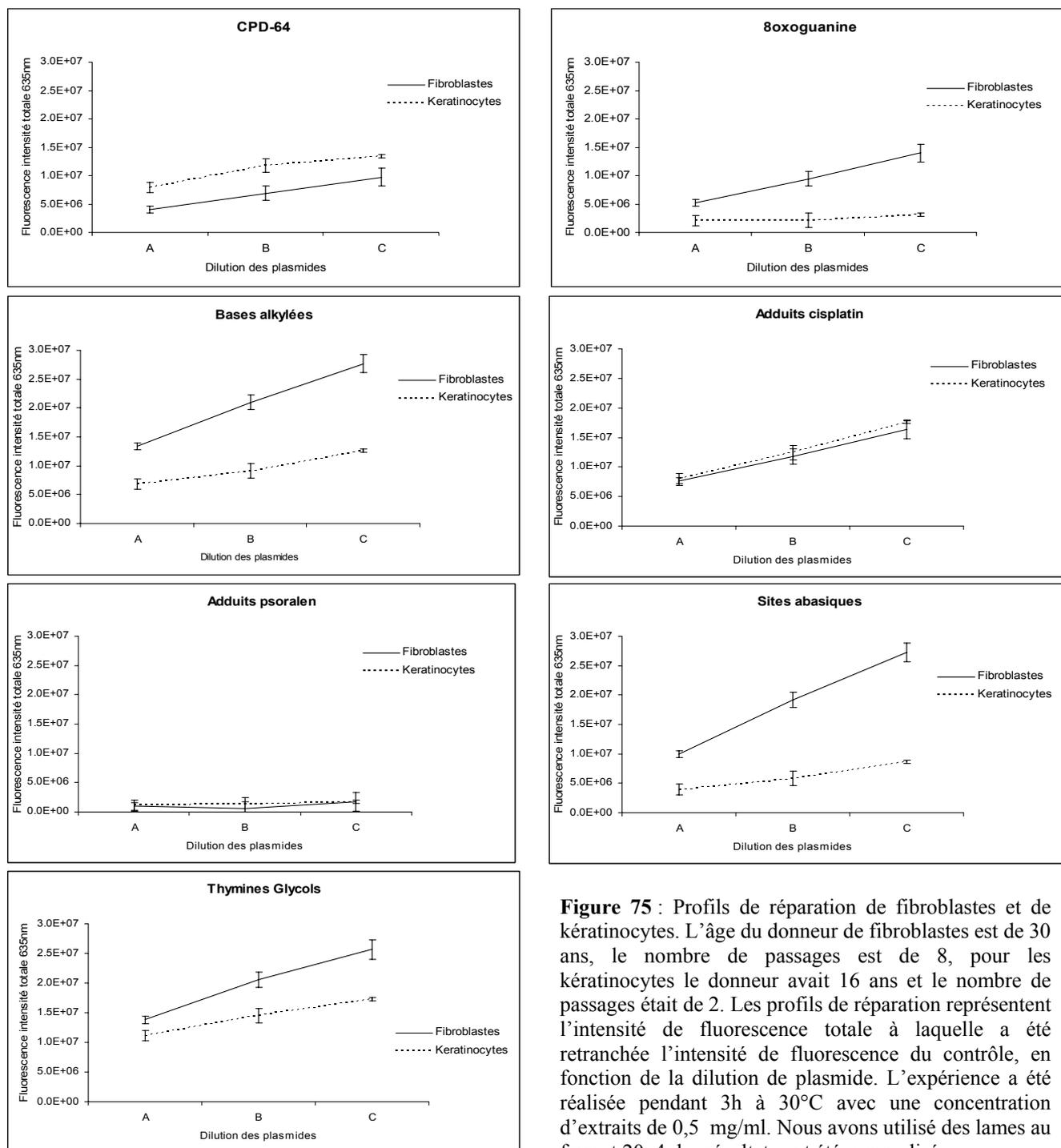


Figure 75 : Profils de réparation de fibroblastes et de kératinocytes. L'âge du donneur de fibroblastes est de 30 ans, le nombre de passages est de 8, pour les kératinocytes le donneur avait 16 ans et le nombre de passages était de 2. Les profils de réparation représentent l'intensité de fluorescence totale à laquelle a été retranchée l'intensité de fluorescence du contrôle, en fonction de la dilution de plasmide. L'expérience a été réalisée pendant 3h à 30°C avec une concentration d'extraits de 0,5 mg/ml. Nous avons utilisé des lames au format 20x4, les résultats ont été normalisés.

Enfin les kératinocytes possèdent une activité de réparation des CPD-64 supérieure à celle des fibroblastes, ce qui peut être corrélé au type de lésions auxquelles ils ont à faire face. Le niveau de réparation très faible de la 8-oxoG est quant à lui assez surprenant, et globalement les lésions prises en charge par la REB sont assez peu réparées par les kératinocytes. Dans cette expérience aussi nous mesurons un niveau d'activité enzymatique à l'état basal donc il faut rester prudent quant à l'analyse de ces résultats. De plus, contrairement à l'expérience précédente, nous n'avons pas pu tester

des kératinocytes de différents donneurs afin d'observer si leur profil de réparation est très conservé d'un individu à l'autre.

3) Activités de réparation des cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP)

Les CSMP sont le dernier type cellulaire que nous ayons testé. Comme pour les kératinocytes, nous avons testé le profil de réparation de CMSP d'un seul donneur. Nous avons donc réalisé une expérience de réparation avec des extraits nucléaires de CSMP prélevées chez un donneur âgé de 30 ans. Le niveau de réparation des CMSP est très bas, la fluorescence globale est 2,5 inférieure à celui des fibroblastes, et 1,8 fois inférieure à celui des kératinocytes. Cependant, pour pouvoir comparer le profil de réparation avec celui des kératinocytes et des fibroblastes de l'expérience précédente, nous avons divisé les signaux de fluorescence des dépôts comportant des plasmides lésés par celui des dépôts de plasmides contrôles. Cette représentation n'est donc pas quantitative, mais qualitative et permet toutefois de comparer les profils entre eux. Les résultats de l'expérience sont présentés sur le **Figure 76**. On constate que les CMSP réparent très peu certaines lésions comme : les sites abasiques, la 8-oxoG, les adduits psoralène, et les adduits cisplatine. Toutefois, les CMSP présentent une activité de réparation assez importante pour les bases alkylées ainsi que les CPD-64, et plus forte pour les diols de thymines.

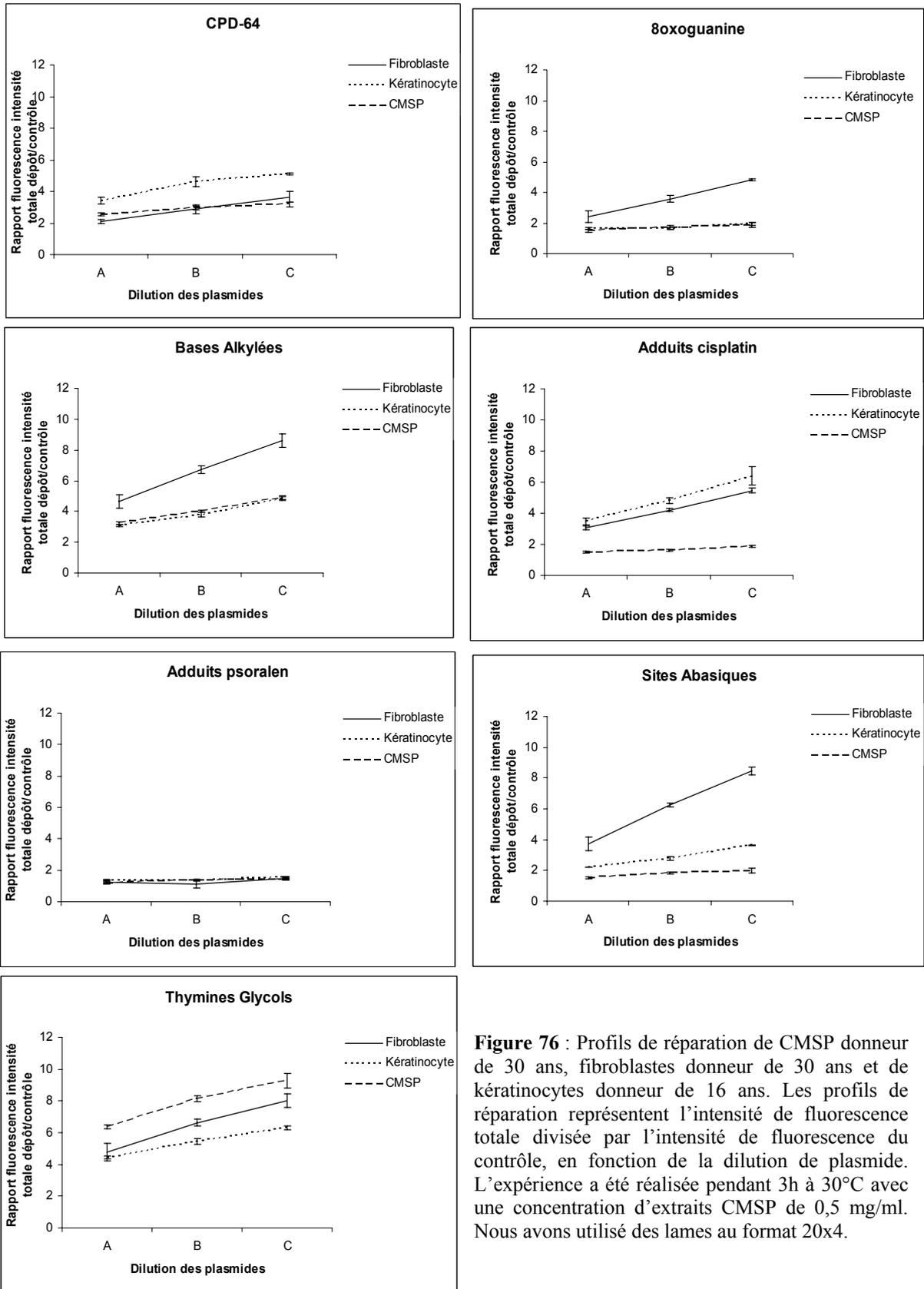


Figure 76 : Profils de réparation de CMSP donneur de 30 ans, fibroblastes donneur de 30 ans et de kératinocytes donneur de 16 ans. Les profils de réparation représentent l'intensité de fluorescence totale divisée par l'intensité de fluorescence du contrôle, en fonction de la dilution de plasmide. L'expérience a été réalisée pendant 3h à 30°C avec une concentration d'extraits CMSP de 0,5 mg/ml. Nous avons utilisé des lames au format 20x4.

C) Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus tendent à montrer que les profils de réparation des fibroblastes sont semblables d'un individu à un autre pour un nombre de passages identique et un âge assez proche. Nous avons cependant tester une seule souche de kératinocytes ou de CMSP. Nous ignorons si pour ces types cellulaires une similarité inter-individus existe aussi. Cependant, il ne faut pas oublier que nous avons mesuré les activités de réparation à l'état basal, alors que peut-être des différences de réponse entre individus seraient mises en évidence si nous appliquions un stress aux cellules. Enfin, chaque type cellulaire semble posséder ses propres capacités de réparation avec une prise en charge spécifique de certains dommages. Il serait intéressant, afin de mieux comparer les profils de réparation des différents types cellulaires, de pouvoir obtenir de chaque donneur à la fois les fibroblastes, les kératinocytes et les CMSP.

II) Etude de l'effet de doses adaptatives de rayonnement gamma sur les activités de réparation cellulaires

A) Le rayonnement gamma et l'adaptation cellulaire

1) Le rayonnement gamma (γ)

Le rayonnement gamma est émis par des atomes radioactifs dont la désintégration est de type β^- . Au cours de cette désintégration, un neutron du noyau de l'atome se transforme en un proton, ce qui conduit à l'émission d'un électron. Le noyau se retrouve alors dans un état excité, et c'est la désexcitation du noyau qui permet alors l'émission d'une onde électromagnétique appelée photon γ . Le rayonnement gamma peut pénétrer la matière et la ioniser en arrachant un électron aux atomes. Nous allons voir quelles sont les conséquences d'une irradiation gamma sur l'ADN.

2) Effet du rayonnement gamma sur l'ADN

a) L'effet direct

Il résulte d'une interaction du rayonnement gamma avec les bases et le désoxyribose de l'ADN. Dans le cas des bases, ce processus conduit à la perte d'un électron et à la formation d'un cation radical. Plusieurs types de bases modifiées peuvent alors être formées : la 8-oxoG, la fapy-guanine, la 8-oxoadénine, la fapy-adénine, la 5-HmdUrd, et la 5-FordUrd pour ne citer que les plus importantes²⁵⁰. Dans le cas de l'interaction du rayonnement gamma avec le désoxyribose, il peut y avoir formation de cassures dans la double hélice d'ADN.

b) Effet indirect

L'effet indirect résulte de l'interaction du rayonnement gamma avec les molécules d'eau présentes dans la cellule. Cette interaction s'appelle la radiolyse de l'eau et conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Cette voie représente 70% des interactions des rayons γ avec la matière, elle est considérée comme prédominante. Elle conduit à la formation de dommages comme des modifications de bases par oxydation : formylamine, diols de thymine, diols d'uracile, 5-hydroxycytosine, 8-oxoG, fapy-guanine, 8-oxoadénine, fapy-adénine. Mais les espèces réactives de l'oxygène engendrées par la radiolyse de l'eau peuvent aussi causer des cassures simple et double brin, la formation de sites abasiques et encore de pontages ADN protéine. Enfin les radicaux peuvent oxyder les lipides de la membrane plasmique et conduire, nous l'avons vu, à la formation de bases alkylées.

Le panel de lésions formées par la radiolyse de l'eau est donc assez important et fait intervenir plusieurs systèmes de réparation, comme la RNH et la RH pour les cassures de la double hélice d'ADN, la REB pour les bases oxydées, les bases alkylées et les sites abasiques, enfin la REN pourrait aussi intervenir pour la réparation des bases alkylées.

3) L'adaptation cellulaire

L'adaptation cellulaire est observée lorsque l'on traite des cellules avec une faible dose d'un agent génotoxique. Les cellules ainsi traitées résistent mieux à une forte dose que des cellules n'ayant pas reçu la faible dose adaptative au préalable. Ce phénomène a été observé dans différents types cellulaires allant des procaryotes aux eucaryotes²⁵¹⁻²⁵³. G. Olivieri montra en 1984 que les cellules humaines étaient capables d'adaptation aux rayons X²⁵⁴. Depuis, plusieurs réponses adaptatives pour plusieurs agents génotoxiques ont été observées à travers différents marqueurs tels que : la survie cellulaire, les aberrations chromosomiques, la fréquence de micronoyaux, l'apoptose, la croissance cellulaire, les mutations dans les gènes. Cependant la compréhension de la réponse adaptative n'a pas encore clairement été élucidée, et il semblerait qu'elle implique plusieurs acteurs tels que la réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire, le système de défense antioxydant, les protéines chaperones et les voies de communication intracellulaires²⁵⁵ (**Figure 77**). La réponse adaptative pourrait dépendre de plusieurs facteurs comme la présence de lésions, dans ce cas précis les protéines ATM, p53, DNA-PK pourraient transmettre le signal nécessaire à la mise en place de la réponse adaptative à travers l'induction des systèmes de réparation, et la régulation du cycle cellulaire²⁵⁶. Mais le niveau d'espèces réactives de l'oxygène, dans le cas la radioadaptation au rayonnement γ , pourrait aussi être un élément déclencheur de la réponse adaptative à travers NF- κ B qui est un facteur de transcription activé par le stress oxydant²⁵⁷. Ce déclenchement par le niveau d'espèces réactives de l'oxygène pourrait aussi passer par la protéine PKC^{258, 259}, car l'activité de cette protéine est régulée par le niveau redox²⁶⁰. Plusieurs études ont montré que le niveau des activités de réparation étaient supérieur lorsqu'une dose adaptative était appliquée avec une irradiation au rayon γ , typiquement une faible dose de 0,01-0,05 Gy suivie d'une forte dose de 2-5 Gy 4 à 6 heures plus tard^{261, 262}. Il a été montré qu'une durée de 4 à 6 heures entre la faible dose et la forte dose permettait d'avoir une réponse adaptative maximale²⁶³. Ces résultats nous ont conduits à reliser l'expérience que nous allons présenter.

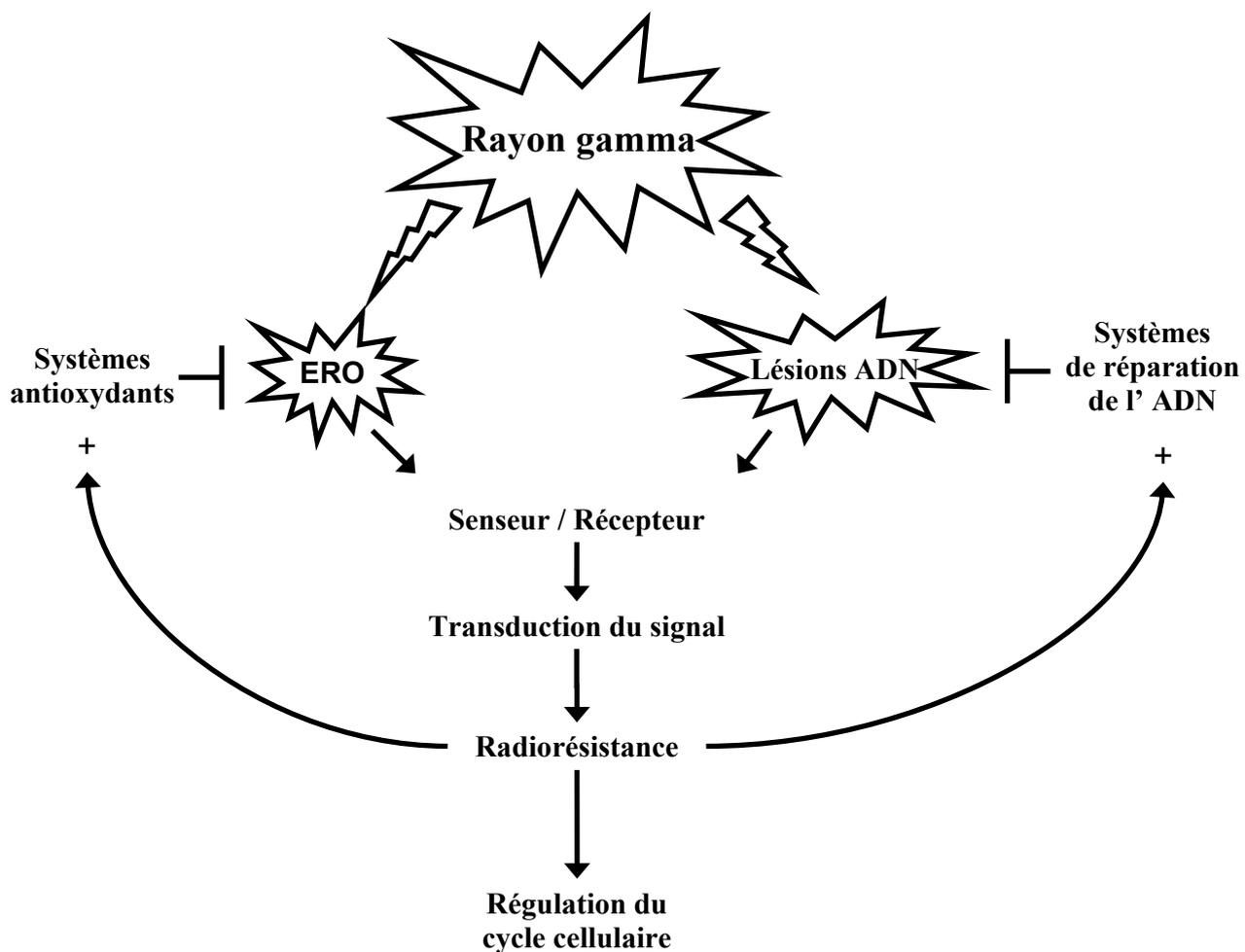


Figure 77 : Schéma présentant les différents acteurs de la mise en place de la réponse adaptative.

B) Expérience d'adaptation cellulaire

Le principe de l'expérience d'adaptation cellulaire au rayonnement gamma réalisée par Marie-Françoise Olivier du laboratoire LCE était d'irradier, à l'aide d'une source de Cs^{137} , les cellules soit avec une faible dose de 0,02 Gy (0,10 Gy/min) à 0h soit une forte dose de 2 Gy (2 Gy/min), ou enfin une dose adaptative de 0,02 Gy puis 2 Gy quatre heures plus tard. Les prélèvements cellulaires ont été effectués aux temps 0h, 10h, 24h, 48h, 72h, 96h comme présenté sur la **Figure 78**.

Les cellules utilisées lors de cette expérience étaient des cellules issues d'une lignée lymphoblastique transformée par le virus Epstein Barr. Elles ont été fournies par le Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPM). Ces cellules sanguines sont non adhérentes et présentent l'avantage de pouvoir être cultivées facilement et rapidement. Elles se divisent en 24 heures.

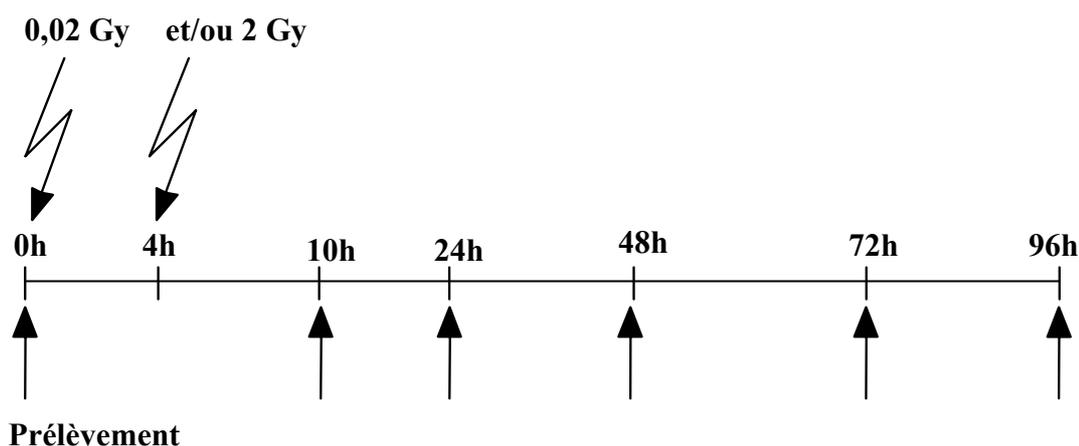


Figure 78 : Schéma présentant le déroulement de l'expérience d'adaptation au rayonnement gamma.

Nous avons réalisé les expériences de réparation, les résultats sont présentés sur la **Figure 79**. On constate que les profils de réparation obtenus avec les différentes doses d'irradiation ne sont pas identiques. Cependant, une diminution des activités de réparation pour la dose 0,02 Gy à partir du temps 10h est observée pour tous les dommages. On retrouve en partie cette caractéristique avec le profil de réparation des cellules contrôles ; en effet, entre 0h et 10h, il est identique à celui obtenu avec la dose 0,02 Gy. Cette similitude est aussi vraie à 72h où le niveau de réparation des cellules contrôles est pratiquement aussi bas que celui des cellules irradiées à 0,02 Gy. Par contre, à 96h, on observe que l'activité de réparation des cellules contrôles retrouve le

niveau auquel elles étaient à 0 et 10h contrairement aux cellules irradiées à 0,02 Gy dont les activités de réparation restent basses.

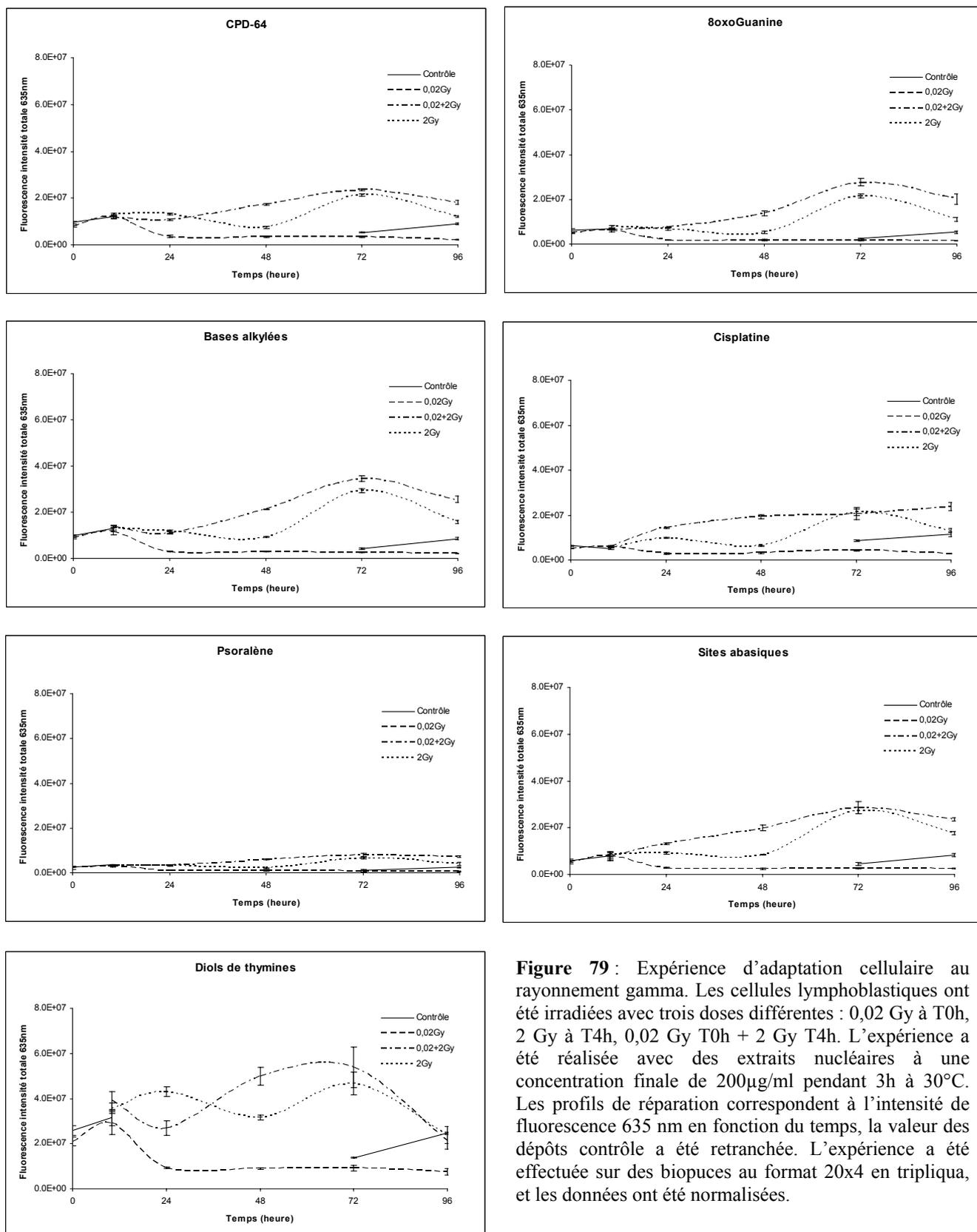


Figure 79 : Expérience d'adaptation cellulaire au rayonnement gamma. Les cellules lymphoblastiques ont été irradiées avec trois doses différentes : 0,02 Gy à T0h, 2 Gy à T4h, 0,02 Gy T0h + 2 Gy T4h. L'expérience a été réalisée avec des extraits nucléaires à une concentration finale de 200µg/ml pendant 3h à 30°C. Les profils de réparation correspondent à l'intensité de fluorescence 635 nm en fonction du temps, la valeur des dépôts contrôle a été retranchée. L'expérience a été effectuée sur des biopuces au format 20x4 en tripliqua, et les données ont été normalisées.

Nous ne pouvons cependant pas comparer les points 24h et 48h des cellules contrôles avec ceux des cellules irradiées à 0,02 Gy car nous les avons perdues lors de la préparation des extraits. Cette diminution des activités de réparation observée pour ces deux conditions est difficilement expliquable, elle pourrait être liée à un facteur indépendant de l'irradiation car il semblerait qu'elle a aussi lieu avec les cellules contrôles non irradiées.

Pour la dose 2 Gy, on constate que pour tous les dommages, excepté pour les adduits psoralène qui ne sont pas réparés, il y a une forte augmentation de la réparation qui débute à partir de 48h et qui atteint son maximum à 72h puis diminue à 96h. Pour les dommages diols de thymines, CPD-64, et cisplatine on observe en plus une augmentation de la réparation à 24h qui diminue ensuite jusqu'au temps 48h avant de réaugmenter comme nous venons de le voir. Avec la forte dose d'irradiation il semblerait donc que, pour certains dommages, il y ait deux vagues d'induction des systèmes de réparation. Une première au temps court assez faible pour les dommages CPD-64 et cisplatine, mais forte pour les diols de thymines ; et une seconde au temps long plus forte.

Avec la dose adaptative, on observe que pour les dommages CPD-64, 8-oxoG, bases alkylées et diols de thymines une augmentation des activités de réparation est présente. Elle débute à partir de 24h et atteint un maximum à 72h. Ce maximum est légèrement supérieur à celui obtenu avec la dose 2 Gy. Enfin à 96h le niveau de réparation diminue. La réparation des sites abasiques présente le même type de profil mais avec une augmentation de la réparation qui débute plus précocément à 10h. Cependant, le pic maximum de réparation est de même intensité que celui obtenu avec la dose 2 Gy. Enfin la réparation des adduits cisplatine est elle aussi induite dès 10h, mais atteint très rapidement un plateau à partir de 48h et reste pratiquement constante jusqu'au temps 96h, elle ne redescend pas comme celle des autres dommages. Dans le cas du cisplatine aussi le niveau de réparation induit ne dépasse pas celui obtenu avec la dose 2 Gy.

Nous avons réalisé une hiérarchisation des données obtenues pour les trois doses d'irradiation (0,02Gy, 0,02+2Gy, 2Gy) à l'aide de la méthode de Pearson centrée afin d'observer si l'on pouvait dégager des profils moyens de réponse aux doses d'irradiation. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 80**. Quatre groupes peuvent être mis en évidence (**Figure 80a**). On constate que les plasmides

sont regroupés en fonction du type d'irradiation qu'ils ont subie, montrant qu'il répondent globalement de la même manière à une même irradiation.

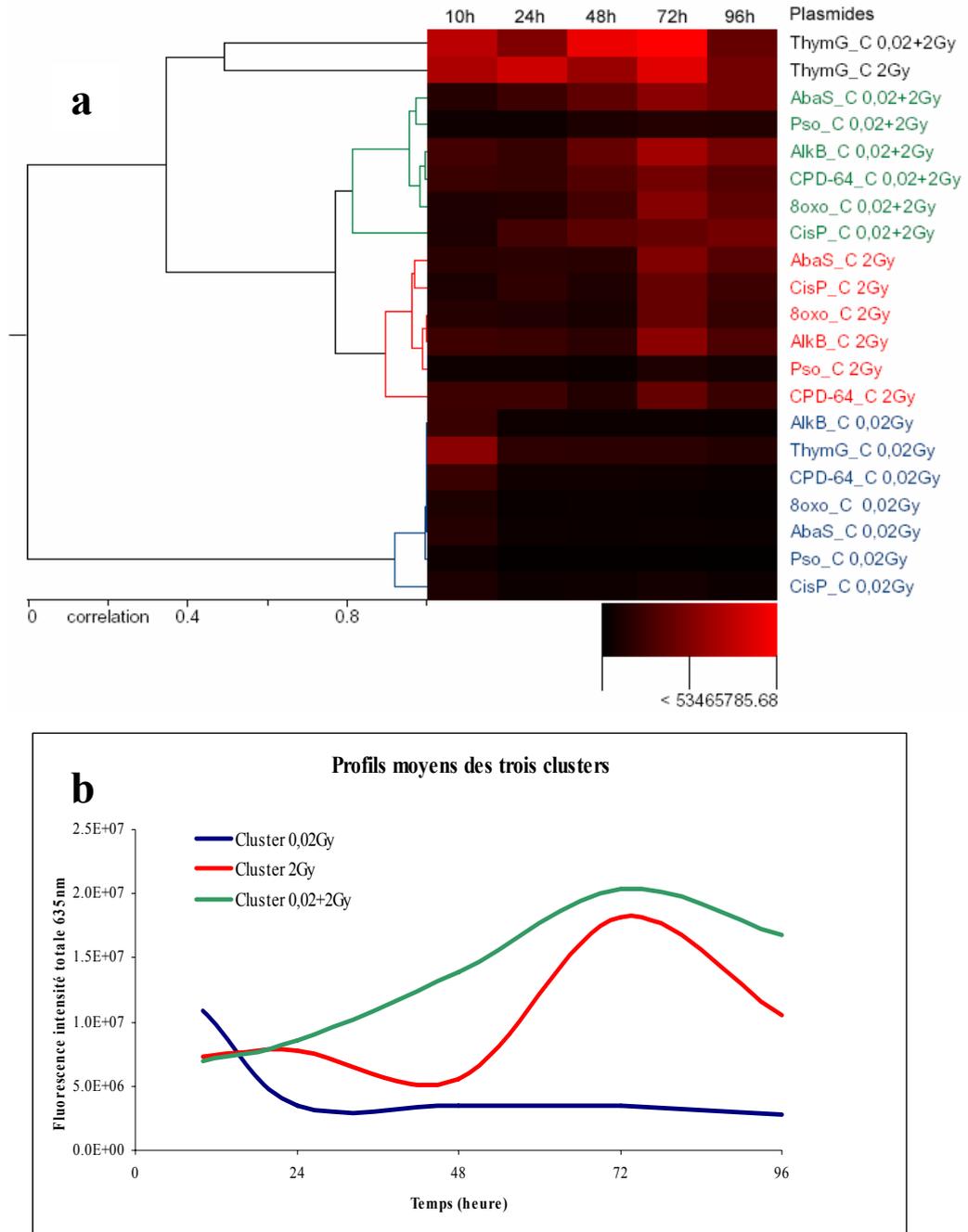


Figure 80 : En **a** est présentée la hiérarchisation des données obtenue avec la méthode de Pearson centrée. En **b** sont présentés les profils moyens dégagés à partir des trois clusters vert bleu et rouge.

Seuls les diols de thymines, pour les doses 0,02+2 Gy et 2Gy, ne sont pas regroupés avec les autres dommages ceci étant dû à leur profil de réparation particulier. Nous avons donc réalisé, pour chaque groupe, un profil moyen de réparation (**Figure 80b**). On observe clairement que la dose adaptative suivie d'une forte dose permet, en comparaison à une irradiation avec la forte dose seule, d'augmenter plus précocément les activités de

réparation notamment entre le temps 24h et 72h. Des expériences complémentaires menées au LCE par Marie-Françoise Olivier ont montrées que le nombre de micro-noyaux présents dans les cellules à 24 et 48 heures était plus important avec une dose d'irradiation de 2 Gy qu'avec une dose adaptative suivie d'une forte dose. Le nombre plus faible de micronoyaux obtenus avec les cellules radioadaptées suggère donc que des activités de réparation plus importantes des cassures double-brins étaient aussi présentes, ce qui semble indiquer que la dose 0,02+2 Gy permet une augmentation des activités de plusieurs systèmes de réparation.

L'étude du cycle cellulaire par FACS a montré que pour les cellules non irradiées ou les cellules irradiées avec la faible dose, aucun arrêt de cycle n'était observé. Au contraire pour la dose 0,02+2Gy et la dose 2Gy, un arrêt de cycle était présent en G2/M au temps 24h jusqu'à 48h (**Figure 81**).

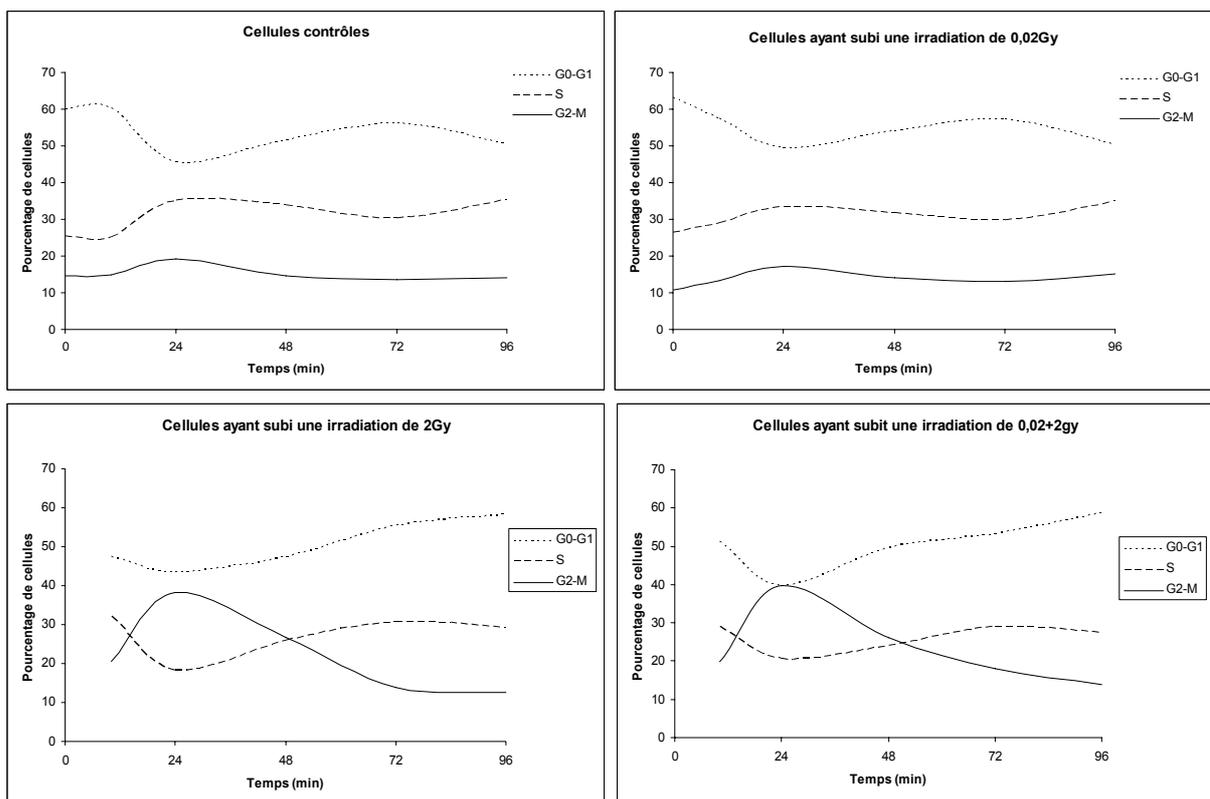


Figure 81 : Graphiques indiquant le pourcentage de cellules présentes dans les différentes phase du cycle en fonction du temps post irradiation.

Il est intéressant de noter que cet arrêt de cycle est corrélé, uniquement dans le cas de la dose adaptative, avec le début de l'augmentation des activités de réparation (**Figure 82a**). Pour la forte dose, l'augmentation des activités de réparation débute à 48h lors de la

fin du blocage de cycle en G2/M (**Figure 82b**). La dose adaptative permettrait donc d'augmenter les activités de réparation de manière concomitante à un blocage de cycle.

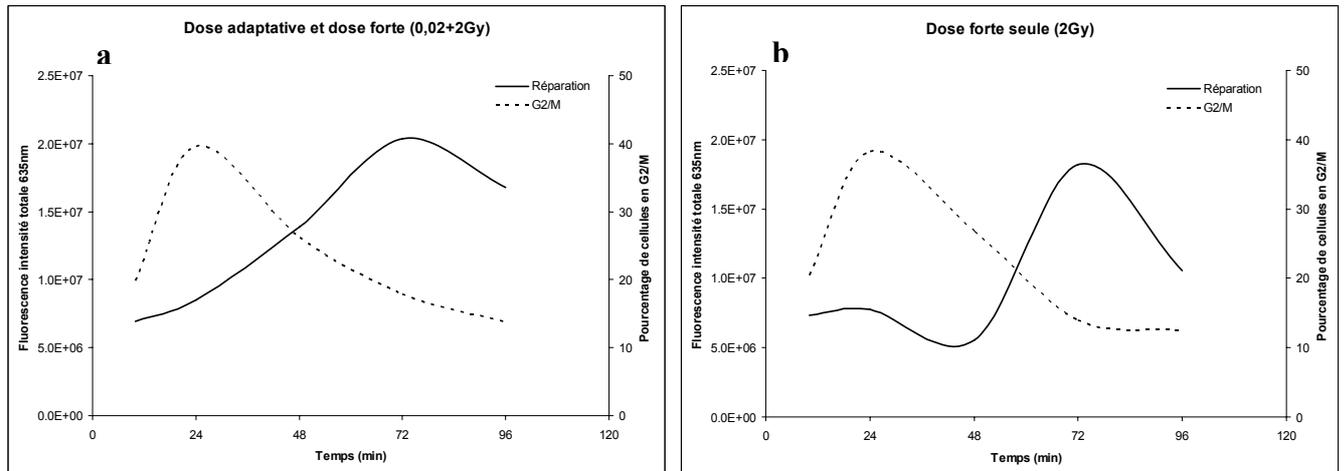


Figure 82 : Graphiques présentant les profils de réparation moyen des doses 0,02+2Gy (a) ou 2Gy (b) ainsi que le pourcentage de cellules en G2/M obtenu pour chacune des deux doses.

Enfin, un test au bleu trypan a été réalisé afin de déterminer la mortalité cellulaire. Pour la dose d'irradiation 0,02Gy, la mortalité au cours de l'expérience était identique à celle des cellules contrôles (10%). Par contre, une mortalité de 22% a été observée aux temps 72 et 96h, et ce pour la dose 2Gy et la dose 0,02+2Gy. L'induction des systèmes de réparation que nous mesurons pour la dose 0,02+2Gy ne permet donc pas de diminuer la mortalité cellulaire par rapport à la dose 2Gy. Cependant, la mortalité observée pour ces deux doses reste faible malgré le fait que les cellules aient subi une irradiation de 2Gy. Notre expérience ne nous permet donc pas de démontrer un effet bénéfique d'une dose adaptative sur la survie cellulaire.

4) Conclusion

Nos résultats suggèrent que la réparation de l'ADN soit impliquée dans la réponse adaptative cellulaire au rayonnement gamma. Une induction globale des systèmes de réparation semble être provoquée dans les temps courts par la dose adaptative permettant aux cellules de mieux réparer les dommages formés lors de la forte dose d'irradiation. De plus, cette induction semble être synchronisée avec l'arrêt de cycle observé en G2/M. Cependant, avec les conditions expérimentales que nous avons utilisées, la dose adaptative ne permet pas une meilleure survie cellulaire lors d'une irradiation de 2Gy. Une dose forte plus importante provoquant une mortalité cellulaire plus élevée serait peut-être plus appropriée pour mettre en évidence un lien

entre la réponse adaptative et la survie cellulaire. Toutefois on peut penser que les cellules radioadaptées ayant eu leur activité de réparation plus fortement induite, présenteront un nombre de mutations inférieur à celui des cellules ayant subi une forte dose d'irradiation.

Ces résultats soulèvent quelques questions notamment :

- Pourquoi est-ce que tous les systèmes de réparation sont induits ?
- Est-ce que cette induction passe par un seul et même facteur ?
- Quels sont les effets d'une durée de temps adaptatif différente ?
- Est-ce que des types cellulaires différents présentent une adaptation similaire ?

III) Conclusion

Nous venons de montrer, à travers les deux expériences précédemment décrites, que le test que nous avons mis au point peut être utilisé dans différentes applications afin de mesurer les activités enzymatiques de réparation. La réalisation de mesures simultanées de la réparation de plusieurs dommages permet en une réaction d'obtenir des données qu'il aurait été fastidieux d'acquérir avec des tests classiquement utilisés. Cette caractéristique fait de ce test un outil de recherche fondamentale puissant pour explorer sous un nouvel angle des phénomènes biologiques liées à la réparation de l'ADN. Mais une utilisation pour le criblage de molécules agissant sur les activités enzymatiques de réparation peut aussi être envisagée. Les industries pharmaceutiques et cosmétiques sont actuellement à la recherche de ce type de principe actif. Enfin, une application dans le diagnostic paraît évidente, notamment dans le cas de maladies génétiques. Cependant, des efforts importants devront être portés à la validation biologique du test avant pouvoir réaliser ce type d'applications.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les systèmes de réparation de l'ADN sont à l'origine de maladies graves, la compréhension de leurs mécanismes est donc très importante et fait l'objet de nombreuses recherches à travers le monde entier. De nouveaux outils de mesure des activités de réparation sont nécessaires afin de faciliter leur étude et de prendre en compte leur complexité. C'est le désir d'apporter un nouvel outil de recherche dédié à l'étude des systèmes de réparation répondant à ces critères qui a motivé notre démarche. Au cours de ce travail, nous avons mis au point, validé et utilisé une biopuce permettant de mesurer de manière miniaturisée et parallélisée les activités enzymatiques de réparation de plusieurs dommages de l'ADN.

Dans le premier chapitre de ce document, nous avons présenté la mise au point de la biopuce. Cette étape est très délicate car elle conditionne la qualité des résultats obtenus lors des tests, et il ressort que plusieurs facteurs clés sont à maîtriser.

Tout d'abord lors de la préparation des ADN comportant les différentes lésions, nous avons dû nous assurer que nous formions de manière préférentielle les dommages désirés. En effet, nous devons être sûrs que les activités enzymatiques mesurées correspondaient bien à la réparation du dommage d'intérêt. Nous nous sommes donc efforcés de trouver les réactions chimiques les plus spécifiques en réalisant à chaque fois que cela était possible une quantification des lésions à l'aide de la méthode de CLHP-SM/SM. Cependant cette approche présente plusieurs limites car il faut que la méthode de quantification du dommage ait été développée et posséder un standard afin de réaliser une calibration. Ces deux restrictions ne nous ont pas permis par exemple de quantifier les adduits psoralène. L'étape de préparation des plasmides lésés a donc été très importante et reste un point à contrôler et améliorer constamment. Cette amélioration doit se porter aussi bien au niveau des méthodes utilisées pour former les lésions que celles utilisées pour les doser, ceci afin de tendre vers une spécificité de dommages formés toujours plus grande.

Un autre élément important a été la maîtrise de la reproductibilité de fabrication des biopuces. Elle dépend en partie de la qualité des dépôts réalisés à l'aide du robot de dispense, et nous avons montré que le nombre de gouttes par dépôt, l'efficacité du lavage, et le conditionnement de la buse de dispense, sont autant de paramètres qu'il est nécessaire d'ajuster. Cependant la reproductibilité est aussi liée au support, son choix est crucial car il influe sur la morphologie et l'homogénéité des dépôts, mais aussi sur la conservation du matériel déposé. Dans notre cas nous avons décidé d'utiliser les lames hydrogel, car elle

répondent parfaitement à nos attentes, et permettent aux réactions enzymatiques d'avoir lieu dans un environnement en trois dimensions comme nous avons pu le montrer à l'aide de la microscopie confocale.

Dans le deuxième chapitre nous avons montré que la méthode utilisée pour quantifier la fluorescence est importante. Dans notre cas, la quantification de l'intensité de fluorescence totale permet d'obtenir une mesure quantitative ne dépendant pas du diamètre des dépôts. Cette méthode permet donc de minimiser les erreurs de mesure liées aux défauts de morphologie des dépôts. Cependant, malgré tout les soins apportés lors de la réalisation des biopuces, nous n'avons pas pu empêcher l'existence de variabilités entre les biopuces d'une même lame ou de deux lames différentes. Cette constatation nous a conduits à réaliser nos expériences en triplicats répartis sur des lames différentes, et à développer un outil de normalisation des données. La méthode de normalisation que nous avons mise au point en collaboration avec Nicolas Ugolin et Guillaume Arras permet, en utilisant des régressions linéaires multiples, de diminuer les erreurs présentes au sein des répliquas d'une condition expérimentale. Cependant, elle ne permet pas de normaliser les données de deux conditions différentes d'une même expérience, des efforts doivent donc être portés sur ce point afin de supprimer ce défaut et permettre une amélioration significative de la méthode de normalisation.

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté les expériences de mise au point des conditions de réaction. Nous avons montré que les conditions réactionnelles optimales de réparation des différents dommages n'étaient pas identiques, ceci venant du fait que nous mesurons des activités enzymatiques de réparation différentes. Nous avons donc fait des compromis afin de déterminer une composition de tampon de réparation permettant d'obtenir, pour l'ensemble de dommages, un niveau de réparation le plus important possible.

Nous avons aussi mis en évidence que la méthode de préparation des extraits cellulaires influe fortement sur les signaux de réparation mesurés. Par exemple, l'utilisation d'extraits cellulaires totaux n'est pas adaptée, lors de notre test, à la mesure d'activités enzymatiques de réparation. En effet, ce type d'extraits ne permet pas d'obtenir des signaux de réparation corrélés avec le temps de réaction, suggérant la présence d'activités enzymatiques non spécifiques. Les extraits nucléaires, de leur côté, semblent parfaitement adaptés à notre test, les signaux de réparation obtenus avec ces derniers étant dépendants de manière linéaire au temps réactionnel. Nous avons aussi montré que, tout comme pour le

tampon de réparation, la composition du tampon de préparation des extraits peut influencer fortement sur les activités enzymatiques de réparation. Notamment, la concentration en KCl apparaît comme très importante car la force ionique permet de diminuer les interactions non spécifiques.

Les expériences de validation du test présentées dans le chapitre IV ont permis de démontrer que l'incorporation des nucléotides marqués passe en grande partie par les polymérases ϵ et δ qui sont impliquées dans la voie de resynthèse longue de la REB et celle de la REN. De plus, l'utilisation simultanée de deux nucléotides marqués ainsi que de conditions de réaction adéquates ont permis de mettre en évidence une incorporation spécifique de certains nucléotides en fonction du dommage réparé. Une partie de cette incorporation préférentielle n'est pas effectuée par les polymérases ϵ et δ , nous pensons qu'elle serait réalisée par la polymérase β et refléterait les activités de resynthèse de la voie courte de la REB. Cette expérience nécessiterait d'être complétée en réalisant un « Dye-Swap » des deux nucléotides marqués, et en testant d'autres couples nucléotidiques afin d'observer si ce phénomène a aussi lieu lors de la réparation d'autres dommages. L'utilisation d'acide pamoïque qui aurait pour but d'inhiber la polymérase β pourrait aussi être envisagée.

La validation du test par inhibition des activités de réparation à l'aide de plasmides compétiteurs a montré que les activités enzymatiques mesurées étaient spécifiques. En effet, elles restent importantes malgré une quantité de plasmides contrôles dans la solution de réparation équivalente à neuf fois la quantité d'ADN présente sur la biopuce. L'utilisation de plasmides compétiteurs comportant la lésion 8-oxoG induit, comme attendu, une diminution de la réparation des plasmides présents sur la biopuce plus forte. Cependant, la diminution reste modérée (30%) malgré le fait que la quantité de dommages compétiteurs soit 2,7 fois supérieure à la quantité de lésions déposée sur la biopuce. Ceci peut s'expliquer par le fait que différents types de dommages soient présents sur la biopuce et que nous n'avons utilisé qu'un seul type de dommage comme compétiteur. Il serait intéressant de réaliser la même expérience avec un mélange de plasmides compétiteurs identiques en proportion à ceux présents sur la biopuce, nous aurions ainsi une compétition plus équilibrée et sans doute plus efficace.

Le dernier chapitre de cette étude a porté sur l'utilisation de la biopuce afin de réaliser deux expériences applicatives.

Nous avons dans un premier temps étudié les profils de réparation de différents types cellulaires issus de cultures primaires ou de prélèvements sanguins. Nous avons mis en évidence une similitude des profils de réparation de fibroblastes issus de trois donneurs différents, suggérant que les capacités de réparation de ce type cellulaire pourraient être proches d'un individu à l'autre. Cependant, nous avons utilisé des cellules de donneurs ayant un âge assez proche ce qui peut expliquer ces observations. De plus, ces expériences ont été réalisées avec des cellules à l'état basal, il serait donc très judicieux d'étudier si des différences de réponse au stress existent entre les différents donneurs. Nous avons aussi mis en évidence que les fibroblastes, les kératinocytes, et les CMSP présentent des profils de réparation différents, comparables en intensité pour les fibroblaste et les kératinocytes, mais globalement 2,5 fois plus faible avec les CMSP. Il semblerait donc qu'une régulation spécifique des activités enzymatiques de réparation s'opère au sein des différents types cellulaires. Nous devons toutefois rester prudents quant à ces résultats car ils ont été obtenus avec des cellules provenant de différents donneurs. Il serait très intéressant de vérifier ces observations à l'aide de différents types cellulaires issus d'un même individu.

Enfin, en collaboration avec Marie-Françoise Olivier du LCE, nous avons étudié la réponse adaptative cellulaire face au rayonnement ionisant. Nous avons montré qu'une dose adaptative de rayonnement gamma de 0,02 Gy, permet aux cellules lymphoblastiques d'augmenter globalement et de manière précoce leurs activités enzymatiques de réparation lorsque ces dernières sont exposées à une forte dose de 2 Gy quatre heures plus tard. L'exposition à une forte dose seule, ne permet pas aux cellules lymphoblastiques de mettre en place une réponse adaptée. Au LCE, des résultats similaires, suggérant une augmentation des activités de réparation, ont été obtenus lors de l'observation du nombre de micronoyaux formés avec l'une ou l'autre des doses d'irradiation. Il semble donc que la réponse adaptative passe au moins en partie par une augmentation des activités enzymatiques de réparation, ce qui est en accord avec les données de la littérature. Pour compléter ces résultats il serait intéressant de suivre à l'aide de biopuces à ADNc l'évolution de l'expression des ARNm codant pour les protéines des différents systèmes de réparation et d'observer si une corrélation existe avec les niveaux d'activité enzymatique de réparation que nous avons mesurés. De plus, plusieurs expériences complémentaires pourraient être envisagées comme notamment étudier l'effet de la durée entre la faible et la forte dose d'irradiation ou bien encore celui de faibles doses adaptatives multiples.

Pour conclure, nous avons montré qu'il était possible à l'aide d'un format original de mesurer de manière simultanée et spécifique les activités enzymatiques de réparation de plusieurs dommages. En utilisant des conditions adéquates, certaines activités enzymatiques peuvent être plus ou moins mises en évidence, ce qui fait de ce test un outil permettant d'avoir à la fois une vision globale et ciblée des activités de réparation.

Le nombre d'applications potentielles est très grands tant en recherche fondamentale afin d'étudier les systèmes de réparation et leurs implications dans les mécanismes de réponses cellulaires qu'en recherche appliquée pour la découverte de nouvelles molécules agissant sur la réparation. Enfin, l'utilisation de ce test dans le domaine du diagnostic pourrait être envisagée à deux niveaux. Tout d'abord pour déterminer si des personnes sont atteintes de maladies génétiques comme *Xeroderma pigmentosum* ; deuxièmement, dans le cadre de l'aide au choix thérapeutique pour le traitement de cancers afin d'adapter les chimiothérapies et radiothérapies aux capacités de réparations de l'ADN du patients et/ou des cellules tumorales. Cependant, la validation biologique du test à l'aide de cellules déficientes reste un objectif capital pour pouvoir prétendre à ce dernier type d'application. Les difficultés que nous avons rencontrées au cours de ces expériences soulignent toute la complexité des mécanismes biologiques à travers leurs interactions, leurs complémentarités et nous rappellent que bien souvent notre compréhension de ces systèmes n'est que partielle.

Enfin, des améliorations futures peuvent être envisagées, premièrement au niveau de la biopuce elle-même. On peut citer notamment l'ajout de nouvelles lésions, l'utilisation d'un nouveau support en hydrogel permettant de réaliser un nombre plus important de biopuces sur une même lame. On pourrait aussi envisager de réaliser les réactions de réparation sur de l'ADN comportant des nucléosomes, ce qui permettrait d'étudier l'effet des histones et de leurs modifications (acétylations, méthylations) sur les activités enzymatiques de réparation. Mais des améliorations doivent aussi être portées sur les étapes en amont du test de réparation, à savoir sur la préparation des extraits nucléaires et le dosage de protéines. En effet, ces deux étapes sont un point limitant en terme de temps, et elles gagneraient à être en partie automatisées afin de pouvoir tirer pleinement partie du test.

Matériels et méthodes

I) Préparation des plasmides

A) Amplification et purification du plasmide contrôle pBluescript

Les plasmides pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA, USA) sont amplifiés lors d'une culture de bactéries transfectées *E.coli* XL1 Blue MRF'(Stratagene, La Jolla, CA, USA) réalisée sur la nuit dans du milieu Luria-Bertani. Les plasmides sont ensuite purifiés à l'aide du kit Plasmid Purification Maxi (25) (Qiagen, Courtaboeuf, France). Après purification, les plasmides sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol et 1/10 de volume d'acetate de sodium 3N (Pierce, Rockford, IL, USA) à 4°C. La solution est ensuite centrifugée 30 minutes à 13 000 rpm à 4°C, le surnageant est jeté et le culot est alors dissout dans 100 µl d'éthanol à 70% froid, puis centrifugé 5 minutes à 4°C. Le culot est alors remis en suspension dans 100 µl de Phosphate Buffer Saline (PBS) (Interchim, Montluçon, France), l'ADN est dosé au spectrophotomètre, puis stocké en aliquots de 100 µl à 1 mg/ml.

B) Préparation des différents plasmides comportant les lésions

1) Le plasmide pCPD-64

Le plasmide pCPD-64 comportant des dimères cyclobutane de pyrimidine et des photoproduits(6-4) a été obtenu en irradiant en UVC à l'aide d'une lampe VL 15-C lamp (Bioblock Scientific, Illkirch, France) des gouttes congelées de solution de plasmides pBluescript à 40 µg/ml dans du PBS. La dose de radiation était de 0,3 J/cm² et le débit de 2,5 mW, le temps d'irradiation était de 2 minutes. La dose et le débit ont été mesurés à l'aide du radiomètre VLX 3W (Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France) équipé d'une sonde 254 nm.

2) Le plasmide pCPD-64*

Le plasmide pCPD-64* est obtenu exactement de la même manière que le plasmide pCPD-64 excepté que l'irradiation s'effectue sur des gouttes de solution de plasmides non congelées.

3) Le plasmids p8oxo

Le plasmide p8oxo comportant des 8-oxoGs a été préparé par de photosensibilisation par la riboflavine. Pour cela, 10 µl de solution de riboflavine (Sigma, St. Louis, MO, USA) à 400 mM sont ajoutés à 100 µl de solution de plasmide pBluescript à 1 mg/ml dans du PBS puis placés dans un insert de CLHP. La solution est alors irradiée 2 minutes avec une lampe halogène de 500W placée à 10 cm de l'échantillon. Un flux d'eau a été placé entre la lampe et l'échantillon afin d'absorber le rayonnement infra-rouge et garder l'échantillon à température ambiante.

4) Le plasmide p8oxo*

Le plasmide p8oxo* a été obtenu en utilisant un endoperoxide de naphthalène²³¹. Pour cela, 20 µl de naphthalène endopéroxyde à 50 mM dans de D₂O a été ajouté à 200 µl de plasmide pBluescript à 1 mg/ml. La réaction a été réalisée pendant deux heures à 37°C en absence de lumière.

5) Le plasmide pAlkB

Le plasmide pAlkB comportant des éthénobases a été obtenu en traitant le plasmide pBluescript avec du trans, trans-2,4-Decadienal (DDE). Pour cela, 200 µl de solution de plasmides à 1 mg/ml dans du PBS sont mélangés à 200 µl de carbonate/bicarbonate à 0,2 M pH 9,2 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 200 µl de TetraHydroFurane (Carlo EBRA, Milan Italy), 4 µl de DDE 5,7 M (Sigma, St. Louis, MO, USA), 12 µl de H₂O₂ 8,8 M (Sigma, St. Louis, MO, USA) puis incubé 16h à 50°C en absence de lumière²³⁴⁻²³⁶.

6) Le plasmide pCisP

Le plasmide pCisP comportant des adduits cisplatine a été formé en traitant les plasmides pBluescript avec du cis-diaminedichloro-platine(II) (CDDP). La réaction a été réalisée en mélangeant 150 µl de solution de plasmide à 1 mg/ml dans du PBS avec 1 µl de CDDP (Aldrich, Milwaukee, USA) à 15 mg/ml dans du DMSO. L'incubation a alors lieu pendant 2 heures à 37°C et en absence de lumière^{264, 265}.

7) **Le plasmide pPso**

Le plasmide pPso comportant des adduits psoralène a été obtenu par irradiation en présence de psoralène. Pour cela, une solution de 150 µl de plasmides à 1 mg/ml dans du PBS a été mélangée à 20 µl de psoralène amine (Sigma, St. Louis, MO, USA) à 120 µM dans de l'eau désionisée puis irradiée en UVA avec une lampe T-15L (Bioblock Scientific, Illkirch, France). L'irradiation a été réalisée pendant 10 minutes à 1,48 J/cm², la dose a été mesurée à l'aide du radiomètre VLX 3W équipé d'une sonde 313 nm²⁶⁶.

8) **Le plasmide pAbaS**

Le plasmide pAbaS comportant des sites abasiques a été obtenu en mélangeant 100 µl de solution de plasmide à 1 mg/ml dans du PBS avec 5 µl de solution de citrate à 0,5 M pH4 et 12 µl de KCl 2 M pH7,9, la solution est ensuite incubée pendant 4h à 70°C.

9) **Le plasmide pThymG**

Le plasmide pThymG comportant des diols de thymines et des diols de cytosines a été obtenu en mélangeant 200 µl de plasmide à 1 mg/ml dans du phosphate de potassium à 0,4 M avec 20 µl de KMnO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA) à 0,4 M. La réaction est réalisée pendant 5 minutes à 4°C. Sont ensuite ajoutés 5 µl d'alcool allylique (Sigma, St. Louis, MO, USA), puis la solution est alors incubée 30 minutes à 4°C. Une centrifugation à 10 000 rpm est ensuite réalisée pendant 10 min à 4°C, le surnageant contenant l'ADN est alors récupéré et purifié sur des colonnes NAP-10 (Amersham, Little Chalfont, England). L'excès de KMNO₄ est éliminé par un lavage avec 1,5 ml de phosphate de sodium à 10 mM, puis les plasmides sont élués avec 1,5 ml d'eau désionisée.

C) Purification des plasmides traités

Excepté pour les plasmides pCPD-64, la fraction super enroulée des plasmides traités a été purifiée à l'aide de centrifugation sur gradient de sucrose²⁶⁷. Pour préparer les gradients de sucrose, des tubes Beckman Centrifuge Tube 14x89 mm (Beckman Coulter, Villepinte, France) sont remplis de 9 ml d'une solution composée de NaCl 1 M, Tris-HCl 12,5 mM pH 7, EDTA 5 mM, et de 12% de sucrose. Ils sont ensuite soumis à un cycle de trois congélations-décongélations à -20°C et 4°C respectivement. 100 µl de plasmides traités sont alors délicatement déposés au sommet du gradient de sucrose, puis centrifugés 17h à 25 000 rpm à 4°C. Des fractions de 800 µl du gradient sont alors aliquotées avec attention, et analysées ensuite par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du TAE 1X (Tris 40 mM, acide acétique 20 mM, EDTA 1 mM). Les fractions contenant moins de 10% de plasmides sous forme relaxée sont regroupées ensemble, et les plasmides sont précipités à l'aide d'isopropanol comme décrit précédemment. Les plasmides sont ensuite remis en suspension dans 100 µl PBS et congelés à -80°C.

II) Quantification des lésions

A) Digestion des plasmides

Afin de réaliser la quantification des lésions, l'ADN doit être digéré en nucléosides. Pour cela, on ajoute à l'ADN en solution dans 50 µl d'eau 0,25 µl de phosphodiesterase II 0,1 U/µl, 0,25 µl de DNase II à 10 U/µl, 2,5 µl de nucléase P1 (0,2 U/µl dans son tampon : acétate d'ammonium 300 mM, et ZnSO₄ 1 mM, pH 5,3), 2,5 µl de tampon MN/SPDE (acide succinique 200 mM, CaCl₂ 100 mM, pH6). Le mélange est incubé 2h à 37°C, vortexé au bout de 30 minutes. Sont alors ajoutés : 6 µl de tampon de phosphatase alcaline (Tris 500 mM, EDTA 1 mM, pH8) ainsi que 0,5 µl de phosphodiesterase I et 2 unités de phosphatase alcaline, s'ensuit une incubation de 2h à 37°C. Sont ensuite ajoutés 3,5 µl d'HCl 0,1 N, les échantillons sont alors transférés dans un vial HPLC pour être analysés.

B) Dosage des lésions

1) Par CLHP-SM/SM

Nous avons utilisé la CLHP-SM/SM pour doser les dommages suivants : DCP, pp(6-4), diols de thymines, hmdU, éthéno dG, et éthéno dA. Nous allons détailler le principe de cette méthode. Les échantillons sont injectés dans une chromatographie liquide haute performance (Agilent Technologies, Massy, France) couplée à un spectromètre de masse API 3000 triple quadripolaire (Perkin-Elmer/SCIEX, Thornill, Canada). Les différents nucléosides normaux ou lésés sont séparés sur la colonne de la CLHP, le détecteur UV en sortie de colonne permet de quantifier les nucléosides normaux et donc la quantité d'ADN de l'échantillon. Ensuite, les nucléosides sont dirigés vers le spectromètre de masse où ils vont être ionisés par la source electrospray, et se retrouvent alors chargés positivement ou négativement. En fonction de la structure chimique du nucléoside à étudier, le spectromètre de masse est utilisé en mode positif ou négatif.

Les nucléosides ionisés entrent alors dans le premier quadripôle du spectromètre de masse qui ne laissera passer dans le second quadripôle que les nucléosides possédant la masse du nucléoside à étudier. Dans le second quadripôle, une énergie est appliquée aux nucléosides qui entrent en collision avec du gaz (N_2) et se fragmentent. Des ions fragments sont produits et deux ou trois d'entre eux spécifiques de la lésion dosées, sont isolés dans le quadripôle 3 et quantifiés **Figure 83**. L'utilisation d'un standard permet alors de déterminer la quantité de lésions.

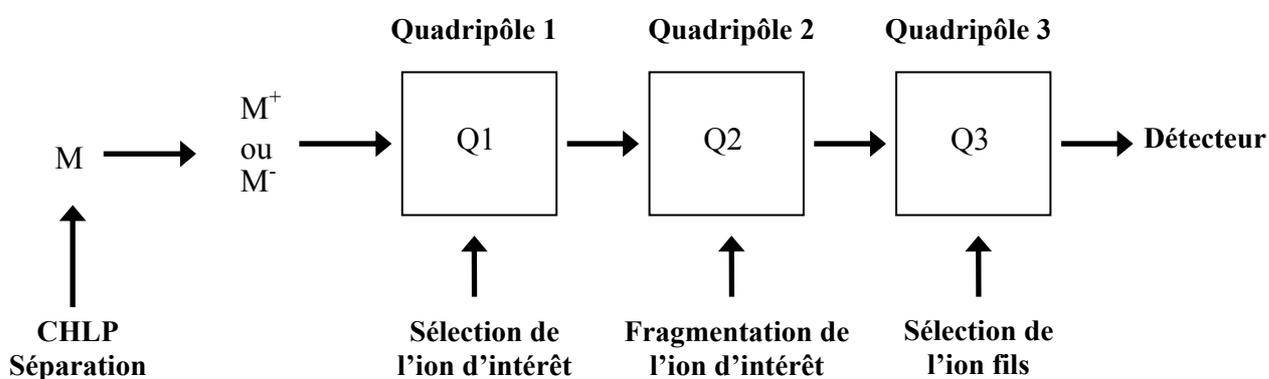


Figure 83 : Représentation schématique de la CLHP associée à un spectromètre de masse en mode tandem

2) Dosage CLHP couplé à un détecteur électrochimique

Nous avons utilisé cette méthode pour doser la 8-oxoG. Comme pour la CLHP-SP/SM les nucléosides sont tout d'abord séparés à l'aide de la CLHP. La détection des lésions se fait à l'aide d'un détecteur électrochimique de type colorimétrique Coulochem II équipé d'une cellule 5011 (ESA, Chelmsford, MA) ; le potentiel aux deux électrodes est réglé à 200 et 450 mV et permet de détecter la 8-oxoG. Un détecteur UV (model 2151, LKB Bromma, Uppsala, Suisse) réglé à 280 nm est utilisé pour détecter les nucléosides normaux. Des solutions calibrées de 8-oxoG et de 2'-désoxyguanosine permettent respectivement de mesurer quantitativement dans les échantillons, le nucléoside oxydé et les nucléosides normaux.

3) Dosage des sites abasiques par électrophorèse sur gel d'agarose

Pour doser les sites abasiques présents sur le plasmide pAbaS, nous avons réalisé la digestion des plasmides à l'aide de l'enzyme Exo III, la solution de réaction (10 µl) était composée de : 1 µg de plasmide, 1 µl au 1/100 d'enzyme et 2,5 µl de tampon 4X (HEPES 160 mM, KCl 400 mM, EDTA 2 mM, SAB 0,8 mg/ml, pH8) incubation 30 à 37°C. Les plasmides sont ensuite déposés sur gel d'agarose 0,8% et une électrophorèse est réalisée. La présence de sites abasiques digérés conduit à la relaxation des plasmides qui migrent alors plus lentement, le rapport plasmides super enroulés sur plasmides relaxés permet de déterminer le nombre de sites abasiques par plasmide.

4) Résultats de la quantification des lésions des différents plasmides

Dans le **Tableau 15** sont regroupés les résultats des dosages des lésions présentes dans les différents plasmides, le nombre de lésions est exprimé par plasmide (3000pb).

	pp(6-4)	DCPs	diols de thymines	hmdU	8-oxodG	éthéno dG	éthéno dA	Sites Abasiques
pControl	0	0	0	0	0,2	0	0	nd
pCPD-64*	26,7	34,1	0	0	1,7	nd	nd	nd
pCPD-64	25,7	34,5	nd	nd	0,1	nd	nd	nd
p8oxo*	nd	nd	0,5	0,1	0,3	nd	nd	nd
p8oxo	nd	nd	0	0	3,7	nd	nd	nd
pAlkB	nd	nd	0,3	0	0,2	10,9	0,0	nd
pCisP	nd	nd	0	0	0,1	nd	nd	nd
pPso	0	0	0	0	0,2	nd	nd	nd
pThymG	nd	nd	1,1	0	0,2	nd	nd	nd
pAbaS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,5

Tableau 15 : Tableau présentant le nombre de lésions présentes sur les différents plasmides.

III) Réalisation des dépôts de plasmides

A) Dispense des solutions de plasmides

Avant de réaliser les dépôts, les solutions de plasmides traités ont été diluées dans du PBS à la concentration de 40 µg/ml. Elles ont aussi été diluées au $\frac{3}{4}$ et au $\frac{1}{2}$ dans du plasmide contrôle à 40 µg/ml. Nous avons ainsi obtenu, pour chaque plasmide lésé, trois solutions ayant des concentrations en ADN identiques, mais possédant des quantités de lésions différentes. La réalisation des dépôts de solutions de plasmides a été effectuée à l'aide du robot de dispense piezoélectrique ScieFlexarrayer (Sciencion AG, Berlin, Allemagne). Nous avons utilisé une buse de diamètre 50 µm permettant d'obtenir des gouttes d'un volume de 500 pl, trois gouttes ont été dispensées sur chaque dépôt. Le diamètre des dépôts était de 250 µm et leur espacement de 420 µm.

B) Support utilisés

1) Supports commerciaux

Nous avons utilisé deux types de supports commerciaux lors de cette étude, des lames recouvertes de Poly-L-Lysine (VWR) et des lames recouvertes d'un Hydrogel de 20 µm d'épaisseur (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Après réalisation des dépôts sur les supports, les biopuces étaient conservées à 4°C.

2) Lame hydrogel mise au point au laboratoire

a) Préparation des lames traitées au 3-méthacryloxypropyl-triméthoxysilane (bind-silane)

Les lames de verre Knittel (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France) sont tout d'abord décapées avec une solution de H_2SO_4 30% et H_2O_2 dans un rapport 3:1 pendant cinq minutes. Les lames sont ensuite lavées une fois avec de l'eau désionisée pendant cinq minutes. Une solution de bind-silane est alors préparée, elle est composée de : 220 μl d'acide acétique, 4ml de bind-silane (Amersham, Little Chalfont, England), un litre d'eau désionisée, la solution est mise sous agitation pendant 20 minutes. Les lames sont ensuite trempées pendant une heure sous agitation douce dans la solution de bind-silane. Les lames sont ensuite lavées trois fois dans de l'eau désionisée, puis une fois dans de l'éthanol 100%. Les lames sont ensuite mises à sécher sous la hotte puis stockées.

b) Réalisation de l'hydrogel

L'hydrogel de polyacrylamide est préparée en utilisant une solution aqueuse contenant : 5% d'un mélange d'acrylamide et de méthylène bisacrylamide 19:1, 1,25% d'agarose à bas point de fusion (low-melting agarose ; TEBU-Bio), 0,006% de persulfate d'ammonium à 10% dans de l'eau, 0,00065% de TEMED (N,N,N',N'-tetraméthyléthylène diamine). 100 μl de cette solution sont déposés uniformément sur une lame de verre, préalablement traitée au bind-silane, puis étalés de manière fine et homogène à l'aide d'une lamelle de verre. La lame recouverte de la lamelle est alors chauffée à 40°C pendant cinq minutes, pour permettre au gel d'acrylamide de se figer. La lamelle est alors retirée, puis la lame portant le gel est chauffée de nouveau à 40°C pendant trois minutes afin de sécher l'hydrogel. Les lames recouvertes d'hydrogel de polyacrylamide sont conservées à +4°C, de préférence au moins 24 heures avant d'être utilisées.

IV) Etude en microscopie confocale du support

A) Marquage de plasmides par « nick-translation » (pCy3)

Pour marquer les plasmides, nous avons incorporé par « nick translation » le nucléotide dCTP-Cy3. Nous avons utilisé le kit Amersham Nick Translation (Amersham, Little Chalfont, England). La solution de réaction de 100 μ l était composée de : 4 μ g de plasmide pBluescript, 40 μ l de solution de nucléotides (14 μ l dATP à 300 μ M, 14 μ l dTTP à 300 μ M, 14 μ l dGTP à 300 μ M, 4 μ l d'eau), 2 μ l de dCTP-Cy5 (Amersham, Little Chalfont, England) à 1 mM, 20 μ l de solution d'enzymes du kit (contenant la polymérase I à 0,5 U/ μ l , et de la DNase I à 10 pg/ μ l), 2,3 μ l de DNase I (Sigma, St. Louis, MO, USA) à 10 U/ μ l au 1/10000, 30 μ l d'eau désionisée. La réaction est réalisée pendant quatre heures à 15°C.

Les plasmides sont ensuite purifiés par précipitation dans l'isopropanol comme précédemment décrit. L'étape de ligation est ensuite réalisée à l'aide du kit Roche Rapid DNA Ligation (Roche, Meylan , France). Pour cela le culot d'ADN obtenu à la fin de la purification est remis en suspension dans 30 μ l d'eau désionisée auxquels sont ajoutés : 6 μ l de tampon de ligation, 2 μ l d'ADN Ligase T4 à 5 U/ μ l. La réaction de ligation est réalisée pendant 45 minutes à température ambiante.

Enfin une dernière étape de purification par précipitation dans l'isopropanol est réalisée, le culot de plasmides est alors remis en suspension dans 40 μ l de PBS et stocké congelé à -20°C.

B) Réalisation des dépôts

Des dépôts de plasmides pCPD-64 et de plasmides pCy3 sont réalisés sur lames Hydrogel Perkin Elmer. La solution est composée de 4 μ l de plasmides pCy3 à 100 μ g/ml et de 40 μ l de solution de pCPD-64 à 40 μ g/ml. Les dépôts sont réalisés à partir de trois gouttes de solution d'un volume de 0,5 nl chacune.

C) Réaction de réparation

Une réaction de réparation a ensuite été réalisée sur les lames en présence de dCTP-Cy5 comme décrit plus loin. Des extraits HeLa nucléaires commerciaux ont été utilisés à une concentration finale de 2 mg/ml, le temps de réaction était de 3h à 30°C.

D) Observation au microscope confocal

L'étude de la répartition des plasmides et des activités de réparation dans l'hydrogel a été réalisée à l'aide du microscope confocal à balayage laser Leica TCS-SP2 et de son logiciel dédié Leica Confocal Software (Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne). Des coupes virtuelles de 0,3 µm ont été effectuées dans l'axe Z des dépôts, les logiciels Adobe Photoshop ainsi que VolumeJ et ImageJ ont été utilisés pour traiter les images obtenues.

V) Culture cellulaire

A) Obtention des cellules

1) Fibroblastes et kératinocytes

Les cultures primaires de fibroblastes et de kératinocytes ont été établies à partir de peau humaine collectée immédiatement après des interventions de chirurgie plastique pratiquées sur des donneurs sains informés et consentants (Département de Chirurgie Plastique et Maxillo-faciale, CHU Grenoble et Clinique des Alpes, Grenoble, France)

2) CMSP

Les CMSP ont été prélevés lors de prises de sang sur des donneurs sains, consentants et informés. Ils ont été purifiés à l'aide de tube BDCPT 362782 (Beckton Dickinson, Pont-de-Claix, France) selon le protocole suivant : 10 ml de sang sont prélevés directement dans le tube BDCPT, puis on agite doucement pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés 20 minutes à 1650 g à 20°C. Le plasma qui compose la phase supérieure est retiré et jeté. Les CMSP sont ensuite récupérés, remis

en suspension dans du PBS glacé puis centrifugés cinq minutes à 400 g à 4°C ; ce lavage est répété une seconde fois. Le culot de PBMC est alors remis en suspension dans 1ml de milieu de culture RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contenant 10% de DMSO, 10% de SVF décomplémenté, 5ml de MEM 100X, les CMSP sont ensuite congelés à -80°C.

B) Culture des cellules

1) Cellules HeLa

Les cellules HeLa ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂, dans du milieu Optimen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le milieu (500ml) contenait : 4% en SVF, 5 ml de MEM 100X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), pénicilline 222 U/ml, streptomycine 220 µg/ml.

2) Fibroblastes

Les fibroblastes ont été cultivés à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂, dans du milieu M199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le milieu (500 ml) a été complété avec 15% de SVF, 2 mM de L-Glutamine, 222 U/ml la pénicilline, et 220 µg/ml de streptomycine.

3) Kératinocytes

Les kératinocytes ont été cultivés à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% en CO₂, dans du milieu « Keratinocyte Serum Free medium » (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Les 500 ml de milieu ont été complétés par de l'EGF 1,5 ng/ml, des extraits bovins d'hypophyse 25 µg/ml, de la primocine 75 µg/ml.

C) Conservation des cellules

Avant la préparation d'extraits cellulaires, les cultures cellulaires étaient arrêtées en phase exponentielle de croissance, puis congelées dans leur milieu de culture auquel étaient ajoutés 10% de DMSO, et stockées dans de l'azote liquide.

VI) Extraits cellulaires

A) Extraits totaux

Les cellules sont tout d'abord lavées deux fois au PBS glacé, puis le culot cellulaire (1 million de cellules) est remis en suspension dans 7,5 µl de tampon froid A (HEPES KOH 90 mM pH 7,9, KCl 0,8 M, EDTA 2 mM, glycérol 20%, DTT 1 mM). La lyse est réalisée par trois cycles de congélation-décongélation successifs respectivement 30 secondes dans l'azote liquide et 2 minutes à 4°C. Sont ensuite ajoutés 2 µl de tampon B froid (triton X-100 à 1% dans du tampon A), une étape de congélation-décongélation est à nouveau réalisée. Ensuite 5,5 µl de tampon C (HEPES KOH pH 7,9 45 mM, EDTA 0,25 mM, glycérol 2%, antiprotéase (Complete-mini, Roche, Meylan, France), PMSF 0,5 mM) sont ajoutés et deux étapes de congélation-décongélation sont à nouveau réalisées. La lyse cellulaire est vérifiée au bleu trypan, puis une centrifugation à 16 000 g est réalisé afin de se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est aliquoté puis congelé à -80°C. Le dosage des protéines est effectué à l'aide du kit BCA (Interchim, Montluçon, France), une concentration de protéine de 10 mg/ml est typiquement obtenue.

B) Extraits nucléaires

Pour une grande partie des expériences présentées dans cette étude, nous avons utilisé des extraits nucléaires commerciaux de cellules HeLa provenant de la société CIL Biotech (Mons, Belgique). Nous avons aussi préparé des extraits nucléaires de différents types cellulaires à partir du protocole suivant : les cellules d'intérêt sont tout d'abord lavées deux fois dans du PBS glacé, puis le culot (environ 2 millions de cellules) est remis en suspension dans 1ml de tampon A glacé (HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, Triton X-100 0,05% pour les fibroblastes et kératinocytes ou 0,01% pour les cellules HeLa et les CMSP, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM). Les membranes cytoplasmiques sont alors lysées dans la glace pendant 10 minutes pour fibroblastes et kératinocytes ou 20 minutes dans le cas des cellules HeLa et les CMSP, la lyse est achevée par 30 secondes de vortex. Après vérification de la lyse au bleu trypan, les noyaux sont récupérés par une étape de centrifugation de 5 minutes à 5000 rpm à 4°C. Ils sont ensuite remis en suspension dans 25 µl de tampon

B glacé (HEPES 10 mM pH 7,9, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 400 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 25%, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, antiprotéase (Complete-mini, Roche, Meylan, France). Les membranes nucléaires sont alors lysées pendant 20 minutes dans la glace, et la lyse est parachevée par deux cycles de congélation-décongélation à -80°C et 4°C respectivement. Une centrifugation à 16 000 g pendant 10 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires, le surnageant est alors récupéré et aliquoté puis congelé à -80°C. La concentration en protéines est déterminée à l'aide du kit BCA (Interchim, Montluçon, France), une concentration de protéine de 3 mg/ml est typiquement obtenue.

VII) Test de réparation par excision resynthèse

Les différents tests d'excision resynthèse présentés dans cette étude ont été réalisés comme suit, cependant, pour certaines expériences, des modifications ont pu être apportées, elles sont indiquées. Une solution de réparation standard d'un volume de 50 µl était composée de : 10 µl de tampon de réparation 5X (HEPES pH 7,9 200 mM, MgCl₂ 35 mM, DTT 2,5 mM, dATP 1,25 µM, dTTP 1,25 µM, dGTP 1,25 µM, glycérol 17%, EDTA 10 mM, phosphocréatine 50 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), créatine phosphokinase 250 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA), SAB 0,5 mg/ml) (ce tampon a été modifié dans deux cas : lors de double marquages dCTP-Cy3/dGTP-Cy5 ou le dGTP n'était pas présent, et lorsque l'on a fait varier la concentration en ATP, où si indiqué, la créatine et la créatine phosphokinase étaient retirées), ATP 1 mM (sauf si une autre concentration est indiquée), dCTP-Cy5 1,25 µM excepté dans le cas de double marquage où nous avons utilisé dCTP-Cy3 1,25 µM et dGTP-Cy5 1,25 µM (Amersham, Little Chalfont, England), pour les extraits cellulaires les concentrations ont varié de 0,2 à 2 mg/ml et sont indiquées ainsi que le type d'extrait utilisé dans les légendes des expériences. Les solutions ont été déposées sur les biopuces à l'aide de caches auto-adhésifs (Grace Bio-Labs, Bend, OR, USA) qui ont été conçus spécialement pour notre test. Ils sont composés de six chambres réactionnelles pouvant être remplies par 20 µl de solution de réparation, les orifices d'injection sont scellés à l'aide d'un adhésif recouvrant l'intégralité du cache. Les temps de réaction utilisés ont varié de 45 minutes à 4 heures, ils sont précisés pour chaque expérience. La température de réaction a toujours été de 30°C. Après cette période d'incubation, les caches sont retirés et les lames sont lavées deux fois trois minutes dans une solution de

PBS/Tween 0,05%, et deux fois trois minutes dans de l'eau désionisée. Les lames sont ensuite séchées à l'aide d'une étape de centrifugation de trois minutes à 700 rpm, enfin elles sont placées à cinq minutes à 30°C afin de parfaitement sécher l'hydrogel.

VIII) Lecture biopuces, normalisation et analyse des données

A) Lecture des biopuces

Les biopuces ont été lues à une résolution de 5 µm aux longueurs d'onde 635 nm et 532 nm à l'aide du scanner Genepix 4200A (Axon Instrument, Union City, CA, USA) et quantifiées avec le logiciel dédié Genepix Pro 5.1 (Axon Instrument, Union City, CA, USA).

B) Normalisation des données

Chaque expérience a été réalisée en n répliquas, telle que, à chaque dépôt de plasmide correspond n mesures d'intensités de fluorescences. En utilisant cette caractéristique, nous avons mis au point un protocole de normalisation pour minimiser les erreurs expérimentales afin de permettre la comparaison de différentes d'expériences entre elles.

La première étape consiste à centrer et à normer les données de chaque réplique (1..k,l..n), dans le but d'imposer un écart type et une moyenne identique a toutes les répliques, tels que : $X_{i,k} = \left[\frac{x_{i,k} - \bar{x}_k}{C_k} \right] \cdot \left(\frac{\sum C_l}{3} + \left(\frac{\sum \bar{x}_l}{3} \right) \right)$.

A chaque réplique correspond alors une moyenne égale à $\bar{X}_k = \left(\frac{\sum \bar{x}_l}{3} \right)$, et un écart type égal à $\bar{C}_k = \left(\frac{\sum C_l}{3} \right)$, avec k et l le n° de la réplique et i le n° du dépôt.

Une régression linéaire, pondérées et récursive, est alors effectuée entre toutes les combinaisons (k,l) possible de deux répliques choisies parmi les n.

Les coefficients de pondérations correspondes aux facteurs de reproductibilités calculés pour chaque dépôts i à partir des deux intensités de fluorescences normalisées provenant des deux répliques considérés. Le facteur de reproductibilité $re_{k,l,i}$ est défini tel que :

$$g_i = X_i / \bar{X}$$

⊗ si $g_{k,i} > g_{l,i}$, alors $re_{k,l,i} = g_{l,i} / g_{k,i}$

⊗ si non $re_{k,l,i} = g_{k,i} / g_{l,i}$.

Ce facteur de reproductibilité informe sur l'erreur expérimentale qui existe entre les valeurs ($X_{k,i}$, $X_{l,i}$) d'un dépôt i pour réplique k et l . Il permet de calculer une régression de fini par :

⊗ la moyennes $\bar{X}_k = \left(\sum re_{k,l,i} \cdot X_{k,i} \right) / \sum re_{k,l,i}$,

⊗ la variances $C_k^2 = \left(\sum re_{k,l,i} \cdot X_{k,i}^2 \right) / \sum re_{k,l,i} - \bar{X}_k^2$,

⊗ la covariances $Covar_{k,l} = \left[\sum re_{k,l,i} \cdot (X_{k,i} - \bar{X}_k) \cdot (X_{l,i} - \bar{X}_l) \right] / \sum re_{k,l,i}$

La droite de corrélation pondéré est déterminé par maximisation sur plusieurs cycles de calculs du facteur $R = Covar_{k,l} / (C_k \cdot C_l)$ avec la méthode des moindres carrés. Chaque cycle est accompagné d'une correction du nuage de points ($X_{k,i}$, $X_{l,i}$) dans le but de placer l'origine de la droite de régression au point (0,0). Un seuil, variant de 0 à 0,4 par incréments de 0,01 à chaque cycle, a été imposé sur les « re », pour que un dépôt i de la combinaison (k,l) ne soit pris en compte pour le calcul que si son $re_{k,l,i}$ est supérieur à la valeur seuil. Les cycle de calcul s'arrête lorsque le facteur de corrélation atteignent une valeur supérieure à 0,95, ou quand plus de 10% des dépôts sont jetés par le seuil appliqué. Dans ce dernier cas la combinaison (k,l) est exclu du reste du calcul.

Pour chaque dépôt i d'un couple de réplique (k,l), un estimateur $m_{k,l,i}$ est alors calculé

et défini tel que : $m_{k,l,i} = \sqrt{X_{k,i}^2 + X_{l,i}^2} / \sqrt{2}$.

Pour chaque dépôt i une estimateur final \bar{M}_i est calculé à partir de tous les estimateur défini pour toutes les combinaisons (k,l) tels que:

$$\bar{M}_i = \left(\sum \sum re_{k,l,i} \cdot m_{k,l,i} \right) / \sum \sum re_{k,l,i}$$

C) Analyse des données

L'analyse des données, à savoir la réalisation des cartes de couleurs et le regroupement de données, ont été réalisées avec le logiciel Acuity 3.1 (Axon Instrument, Union City, CA, USA).

Références Bibliographiques

1. Friedberg, E. et al. DNA repair and mutagenesis second edition. (2006).
2. Ichihashi, M. et al. UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39 (2003).
3. C.Panasci, L. & A.Alaoui-Jamali, M. DNA repair in cancer therapy. (2004).
4. Baird, W.M., Hooven, L.A. & Mahadevan, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* **45**, 106-114 (2005).
5. Foiles, P.G. et al. Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers. *Chem Res Toxicol* **4**, 364-368 (1991).
6. Stadtman, E.R. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med* **33**, 597-604 (2002).
7. Moller, P. & Wallin, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat Res* **410**, 271-290 (1998).
8. Rasmussen, R.E. & Painter, R.B. Evidence For Repair Of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid In Cultured Mammalian Cells. *Nature* **203**, 1360-1362 (1964).
9. Boyce, R.P. & Howard-Flanders, P. Release Of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers From Dna In E. Coli K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 293-300 (1964).
10. Setlow, R.B. & Carrier, W.L. The Disappearance Of Thymine Dimers From Dna: An Error-Correcting Mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 226-231 (1964).
11. Cleaver, J.E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652-656 (1968).
12. Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A. & Hanawalt, P.C. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8878-8882 (1986).
13. Wood, R.D., Robins, P. & Lindahl, T. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* **53**, 97-106 (1988).
14. Aboussekhra, A. et al. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-868 (1995).
15. Dip, R., Camenisch, U. & Naegeli, H. Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1409-1423 (2004).
16. Nakatsu, Y. et al. XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* **275**, 34931-34937 (2000).

17. Mellon, I. Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat Res* **577**, 155-161 (2005).
18. Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A. & Ford, J.M. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* **278**, 46906-46910 (2003).
19. Datta, A. et al. The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase. *Mutat Res* **486**, 89-97 (2001).
20. Batty, D.P. & Wood, R.D. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* **241**, 193-204 (2000).
21. Riedl, T., Hanaoka, F. & Egly, J.M. The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *Embo J* **22**, 5293-5303 (2003).
22. Abraham, R.T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-2196 (2001).
23. Vousden, K.H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604 (2002).
24. Adimoolam, S. & Ford, J.M. p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12985-12990 (2002).
25. Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C. & Chu, G. 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**, 424-428 (1999).
26. Wang, X.W. et al. The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev* **10**, 1219-1232 (1996).
27. Fitch, M.E. et al. The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* **2**, 819-826 (2003).
28. von Mikecz, A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci* **119**, 1977-1984 (2006).
29. Ng, J.M. et al. 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 (2003).
30. Verly, W.G. & Paquette, Y. An endonuclease for depurinated DNA in Escherichia coli B. *Can J Biochem* **50**, 217-224 (1972).

31. Lindahl, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3649-3653 (1974).
32. Lindahl, T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **22**, 135-192 (1979).
33. Matsumoto, Y., Kim, K. & Bogenhagen, D.F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol* **14**, 6187-6197 (1994).
34. Frosina, G. et al. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**, 9573-9578 (1996).
35. Masuda, Y., Bennett, R.A. & Demple, B. Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium. *J Biol Chem* **273**, 30360-30365 (1998).
36. Xanthoudakis, S., Miao, G.G. & Curran, T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 23-27 (1994).
37. Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J. & Dogliotti, E. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 15230-15236 (1999).
38. Klungland, A. & Lindahl, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* **16**, 3341-3348 (1997).
39. Viswanathan, A. & Doetsch, P.W. Effects of nonbulky DNA base damages on *Escherichia coli* RNA polymerase-mediated elongation and promoter clearance. *J Biol Chem* **273**, 21276-21281 (1998).
40. Tornaletti, S., Maeda, L.S., Lloyd, D.R., Reines, D. & Hanawalt, P.C. Effect of thymine glycol on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* **276**, 45367-45371 (2001).
41. Seo, Y.R., Fishel, M.L., Amundson, S., Kelley, M.R. & Smith, M.L. Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* **21**, 731-737 (2002).
42. Offer, H. et al. p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* **61**, 88-96 (2001).
43. Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. & Prives, C. A role for p53 in base excision repair. *Embo J* **20**, 914-923 (2001).

44. Herceg, Z. & Wang, Z.Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* **477**, 97-110 (2001).
45. Huber, A., Bai, P., de Murcia, J.M. & de Murcia, G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1103-1108 (2004).
46. Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B. & Tomkinson, A.E. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* **23**, 5919-5927 (2003).
47. Schreiber, V. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**, 23028-23036 (2002).
48. Allinson, S.L., Dianova, II & Dianov, G.L. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing. *Acta Biochim Pol* **50**, 169-179 (2003).
49. Nagelhus, T.A., Slupphaug, G., Lindmo, T. & Krokan, H.E. Cell cycle regulation and subcellular localization of the major human uracil-DNA glycosylase. *Exp Cell Res* **220**, 292-297 (1995).
50. Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H. & van Gent, D.C. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8**, 483-489 (1998).
51. Jeggo, P.A. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* **150**, S80-91 (1998).
52. Liang, F., Romanienko, P.J., Weaver, D.T., Jeggo, P.A. & Jasin, M. Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8929-8933 (1996).
53. Bliss, T.M. & Lane, D.P. Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J Biol Chem* **272**, 5765-5773 (1997).
54. Yaneva, M., Kowalewski, T. & Lieber, M.R. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *Embo J* **16**, 5098-5112 (1997).
55. Hammarsten, O. & Chu, G. DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 525-530 (1998).
56. Hendrickson, E.A. Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *Am J Hum Genet* **61**, 795-800 (1997).

57. Yu, S.L., Johnson, R.E., Prakash, S. & Prakash, L. Requirement of DNA polymerase eta for error-free bypass of UV-induced CC and TC photoproducts. *Mol Cell Biol* **21**, 185-188 (2001).
58. Fischhaber, P.L. et al. Human DNA polymerase kappa bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides. *J Biol Chem* **277**, 37604-37611 (2002).
59. Hsieh, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat Res* **486**, 71-87 (2001).
60. Ozer, Z., Reardon, J.T., Hsu, D.S., Malhotra, K. & Sancar, A. The other function of DNA photolyase: stimulation of excision repair of chemical damage to DNA. *Biochemistry* **34**, 15886-15889 (1995).
61. Wei, Y.F., Carter, K.C., Wang, R.P. & Shell, B.K. Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an Escherichia coli AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair. *Nucleic Acids Res* **24**, 931-937 (1996).
62. Duncan, T. et al. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16660-16665 (2002).
63. Aas, P.A. et al. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* **421**, 859-863 (2003).
64. Duguid, E.M., Mishina, Y. & He, C. How do DNA repair proteins locate potential base lesions? a chemical crosslinking method to investigate O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases. *Chem Biol* **10**, 827-835 (2003).
65. Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J.D. Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* **285**, 1722-1725 (1999).
66. Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H. & Sancar, A. 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**, 9463-9468 (1997).
67. Huang, J.C., Hsu, D.S., Kazantsev, A. & Sancar, A. Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12213-12217 (1994).
68. Bessho, T. Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* **27**, 979-983 (1999).

69. Klungland, A. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell* **3**, 33-42 (1999).
70. Dusinska, M., Dzapinkova, Z., Wsolova, L., Harrington, V. & Collins, A.R. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis* **21**, 205-211 (2006).
71. Izumi, T. et al. Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology* **193**, 43-65 (2003).
72. Lee, D.F., Drouin, R., Pitsikas, P. & Rainbow, A.J. Detection of an involvement of the human mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells. *Cancer Res* **64**, 3865-3870 (2004).
73. Mazurek, A., Berardini, M. & Fishel, R. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J Biol Chem* **277**, 8260-8266 (2002).
74. Liu, W. et al. Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* **275**, 21429-21434 (2000).
75. Kamiuchi, S. et al. 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**, 201-206 (2002).
76. Christmann, M. & Kaina, B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J Biol Chem* **275**, 36256-36262 (2000).
77. Wu, X., Shell, S.M., Liu, Y. & Zou, Y. ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* (2006).
78. Jackson, E.B., Theriot, C.A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. & Izumi, T. Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1/Ref1). *Nucleic Acids Res* **33**, 3303-3312 (2005).
79. Yang, J. et al. ATM and ATR: sensing DNA damage. *World J Gastroenterol* **10**, 155-160 (2004).
80. Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E. & Duerksen-Hughes, P.J. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* **24**, 1571-1580 (2003).
81. Lavin, M.F. et al. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* **569**, 123-132 (2005).

82. Gartel, A.L. & Tyner, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-649 (2002).
83. Bunz, F. et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501 (1998).
84. Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S.J. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286**, 1162-1166 (1999).
85. Fung, H., Bennett, R.A. & Dimple, B. Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* **276**, 42011-42017 (2001).
86. Meyers, M. et al. Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPMS2. *Cancer Res* **57**, 206-208 (1997).
87. Chen, F. et al. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* **384**, 205-211 (1997).
88. Flygare, J., Benson, F. & Hellgren, D. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1312**, 231-236 (1996).
89. Li, L.L. & Yeh, N.H. Cell cycle-dependent migration of the DNA-binding protein Ku80 into nucleoli. *Exp Cell Res* **199**, 262-268 (1992).
90. Harvey Lodish, A.B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S. Laurence Zipursky, James Darnell *Biologie moléculaire de la cellule*. (1997).
91. Harbour, J.W. Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma. Implications for clinical genetic screening. *Ophthalmology* **105**, 1442-1447 (1998).
92. Amstad, P., Hussain, S.P. & Cerutti, P. Ultraviolet B light-induced mutagenesis of p53 hotspot codons 248 and 249 in human skin fibroblasts. *Mol Carcinog* **10**, 181-188 (1994).
93. Scheffzek, K. et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338 (1997).
94. Boxer, L.M. & Dang, C.V. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* **20**, 5595-5610 (2001).
95. Loeb, L.A. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* **54**, 5059-5063 (1994).

96. Fearon, E.R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
97. Martin, N.M. DNA repair inhibition and cancer therapy. *J Photochem Photobiol B* **63**, 162-170 (2001).
98. Modok, S., Mellor, H.R. & Callaghan, R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr Opin Pharmacol* (2006).
99. Morgan, A.S., Ciaccio, P.J., Tew, K.D. & Kauvar, L.M. Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **37**, 363-370 (1996).
100. Kramer, R.A., Greene, K., Ahmad, S. & Vistica, D.T. Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. *Cancer Res* **47**, 1593-1597 (1987).
101. Green, J.A. et al. Potentiation of melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer cell lines by glutathione depletion. *Cancer Res* **44**, 5427-5431 (1984).
102. Kelley, S.L. et al. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* **241**, 1813-1815 (1988).
103. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. & Harris, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**, 4855-4878 (1994).
104. Ding, J., Miao, Z.H., Meng, L.H. & Geng, M.Y. Emerging cancer therapeutic opportunities target DNA-repair systems. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 338-344 (2006).
105. Sabharwal, A. & Middleton, M.R. Exploiting the role of O(6)-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* (2006).
106. Pegg, A.E. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* **462**, 83-100 (2000).
107. Grombacher, T., Mitra, S. & Kaina, B. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* **17**, 2329-2336 (1996).
108. Biswas, T. et al. Activation of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene by glucocorticoid hormone. *Oncogene* **18**, 525-532 (1999).
109. Koga, Y. et al. Tumor progression through epigenetic gene silencing of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers. *Ann Surg Oncol* **12**, 354-363 (2005).

110. Wolf, P., Hu, Y.C., Doffek, K., Sidransky, D. & Ahrendt, S.A. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **61**, 8113-8117 (2001).
111. Nakamura, M., Watanabe, T., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* **22**, 1715-1719 (2001).
112. Boiteux, S. & Guillet, M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1-12 (2004).
113. Liu, L. & Gerson, S.L. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 623-627 (2004).
114. Madhusudan, S. & Hickson, I.D. DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends Mol Med* **11**, 503-511 (2005).
115. Kartalou, M. & Essigmann, J.M. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* **478**, 1-21 (2001).
116. Zamble, D.B. & Lippard, S.J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* **20**, 435-439 (1995).
117. Rosell, R., Lord, R.V., Taron, M. & Reguart, N. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **38**, 217-227 (2002).
118. Rosell, R. et al. Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Control* **10**, 297-305 (2003).
119. Salles, B., Calsou, P., Frit, P. & Muller, C. The DNA repair complex DNA-PK, a pharmacological target in cancer chemotherapy and radiotherapy. *Pathol Biol (Paris)* **54**, 185-193 (2006).
120. Frit, P., Li, R.Y., Arzel, D., Salles, B. & Calsou, P. Ku entry into DNA inhibits inward DNA transactions in vitro. *J Biol Chem* **275**, 35684-35691 (2000).
121. Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J. & Salles, B. Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J Mol Biol* **326**, 93-103 (2003).
122. Khanna, K.K. & Jackson, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**, 247-254 (2001).
123. You, J.S., Wang, M. & Lee, S.H. Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **278**, 7476-7485 (2003).

124. Essers, J. et al. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell* **89**, 195-204 (1997).
125. Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C. & Defais, M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* **26**, 2859-2864 (1998).
126. Duckett, D.R. et al. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6443-6447 (1996).
127. Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. & Karran, P. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* **25**, 491-496 (1997).
128. Lin, X. & Howell, S.B. Effect of loss of DNA mismatch repair on development of topotecan-, gemcitabine-, and paclitaxel-resistant variants after exposure to cisplatin. *Mol Pharmacol* **56**, 390-395 (1999).
129. Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R.D. & Wang, J.Y. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2420-2425 (2003).
130. Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Nehme, A. & Howell, S.B. Loss of DNA mismatch repair due to knockout of MSH2 or PMS2 results in resistance to cisplatin and carboplatin. *Int J Oncol*, 539-542 (1997).
131. Kat, A. et al. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6424-6428 (1993).
132. Griffin, S., Branch, P., Xu, Y.Z. & Karran, P. DNA mismatch binding and incision at modified guanine bases by extracts of mammalian cells: implications for tolerance to DNA methylation damage. *Biochemistry* **33**, 4787-4793 (1994).
133. Waller, C.F., Fetscher, S. & Lange, W. Secondary chronic myelogenous leukemia after chemotherapy followed by adjuvant radiotherapy for small cell lung cancer. *Leuk Res* **23**, 961-964 (1999).
134. Boffetta, P. & Kaldor, J.M. Secondary malignancies following cancer chemotherapy. *Acta Oncol* **33**, 591-598 (1994).
135. Whang-Peng, J. et al. Cytogenetic studies in patients with secondary leukemia/dysmyelopoietic syndrome after different treatment modalities. *Blood* **71**, 403-414 (1988).

136. Boice, J.D., Jr. et al. Radiation dose and leukemia risk in patients treated for cancer of the cervix. *J Natl Cancer Inst* **79**, 1295-1311 (1987).
137. Moloney, W.C. Radiogenic leukemia revisited. *Blood* **70**, 905-908 (1987).
138. Kaldor, J.M. et al. Leukemia following Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **322**, 7-13 (1990).
139. Levine, E.G. & Bloomfield, C.D. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* **19**, 47-84 (1992).
140. Lee, C.W., Matulonis, U.A. & Castells, M.C. Rapid inpatient/outpatient desensitization for chemotherapy hypersensitivity: standard protocol effective in 57 patients for 255 courses. *Gynecol Oncol* **99**, 393-399 (2005).
141. Zanotti, K.M. et al. Carboplatin skin testing: a skin-testing protocol for predicting hypersensitivity to carboplatin chemotherapy. *J Clin Oncol* **19**, 3126-3129 (2001).
142. Djuzenova, C., Muhl, B., Schakowski, R., Oppitz, U. & Flentje, M. Normal expression of DNA repair proteins, hMre11, Rad50 and Rad51 but protracted formation of Rad50 containing foci in X-irradiated skin fibroblasts from radiosensitive cancer patients. *Br J Cancer* **90**, 2356-2363 (2004).
143. Fernet, M. & Hall, J. Genetic biomarkers of therapeutic radiation sensitivity. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1237-1243 (2004).
144. Navo, M. et al. Evaluation of the incidence of carboplatin hypersensitivity reactions in cancer patients. *Gynecol Oncol* (2006).
145. Halpern, A.C. & Altman, J.F. Genetic predisposition to skin cancer. *Curr Opin Oncol* **11**, 132-138 (1999).
146. Stary, A. & Sarasin, A. The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome. *Biochimie* **84**, 49-60 (2002).
147. Lehmann, A.R. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *biochimie* **0**, 0-0 (2003).
148. Rolig, R.L. & McKinnon, P.J. Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Neurosci* **23**, 417-424 (2000).
149. Itoh, M. et al. Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders. *Brain Dev* **21**, 326-333 (1999).
150. Licht, C.L., Stevnsner, T. & Bohr, V.A. Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet* **73**, 1217-1239 (2003).

151. Nance, M.A. & Berry, S.A. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* **42**, 68-84 (1992).
152. Sunesen, M., Stevnsner, T., Brosh Jr, R.M., Dianov, G.L. & Bohr, V.A. Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. *Oncogene* **21**, 3571-3578 (2002).
153. Mahmoud, A.A., Yousef, G.M., Al-Hifzi, I. & Diamandis, E.P. Cockayne syndrome in three sisters with varying clinical presentation. *Am J Med Genet* **111**, 81-85 (2002).
154. Colella, S. et al. Alterations in the CSB gene in three Italian patients with the severe form of Cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Hum Mol Genet* **8**, 935-941 (1999).
155. Emmert, S. et al. Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients. *J Invest Dermatol* **118**, 972-982 (2002).
156. Lindenbaum, Y. et al. Xeroderma pigmentosum/cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases. *Eur J Paediatr Neurol* **5**, 225-242 (2001).
157. Rapin, I., Lindenbaum, Y., Dickson, D.W., Kraemer, K.H. & Robbins, J.H. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* **55**, 1442-1449 (2000).
158. Robbins, J.H., Kraemer, K.H., Lutzner, M.A., Festoff, B.W. & Coon, H.G. Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. *Ann Intern Med* **80**, 221-248 (1974).
159. Pollitt, R.J., Jenner, F.A. & Davies, M. Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Arch Dis Child* **43**, 211-216 (1968).
160. Price, V.H., Odom, R.B., Ward, W.H. & Jones, F.T. Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol* **116**, 1375-1384 (1980).
161. Botta, E. et al. Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy. *Hum Mol Genet* **11**, 2919-2928 (2002).
162. Vermeulen, W. et al. Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder. *Nat Genet* **26**, 307-313 (2000).
163. Bergmann, E. & Egly, J.M. Trichothiodystrophy, a transcription syndrome. *Trends Genet* **17**, 279-286 (2001).

164. Itin, P.H., Sarasin, A. & Pittelkow, M.R. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol* **44**, 891-920; quiz 921-894 (2001).
165. Samowitz, W.S. et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* **121**, 830-838 (2001).
166. Aaltonen, L.A. et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* **338**, 1481-1487 (1998).
167. Vasen, H.F. et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* **110**, 1020-1027 (1996).
168. Vasen, H.F., Nagengast, F.M. & Khan, P.M. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* **345**, 1183-1184 (1995).
169. Chung, D.C. & Rustgi, A.K. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* **138**, 560-570 (2003).
170. Lynch, H.T. & de la Chapelle, A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* **36**, 801-818 (1999).
171. Mohrenweiser, H.W., Wilson, D.M., 3rd & Jones, I.M. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res* **526**, 93-125 (2003).
172. Shen, M.R., Jones, I.M. & Mohrenweiser, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* **58**, 604-608 (1998).
173. Duell, E.J. et al. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 217-222 (2001).
174. Stern, M.C., Umbach, D.M., van Gils, C.H., Lunn, R.M. & Taylor, J.A. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 125-131 (2001).
175. Ratnasinghe, D. et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 119-123 (2001).
176. David-Beabes, G.L. & London, S.J. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* **34**, 333-339 (2001).

177. Nelson, H.H., Kelsey, K.T., Mott, L.A. & Karagas, M.R. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res* **62**, 152-155 (2002).
178. Lee, J.M. et al. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer* **95**, 240-246 (2001).
179. Matullo, G. et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* **92**, 562-567 (2001).
180. Shen, H. et al. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* **88**, 601-606 (2000).
181. Sturgis, E.M. et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* **20**, 2125-2129 (1999).
182. Olshan, A.F., Watson, M.A., Weissler, M.C. & Bell, D.A. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett* **178**, 181-186 (2002).
183. Hu, J.J. et al. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* **22**, 917-922 (2001).
184. Hung, R.J., Hall, J., Brennan, P. & Boffetta, P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **162**, 925-942 (2005).
185. Le Marchand, L., Donlon, T., Lum-Jones, A., Seifried, A. & Wilkens, L.R. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 409-412 (2002).
186. Zhou, W. et al. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res* **62**, 1377-1381 (2002).
187. David-Beabes, G.L., Lunn, R.M. & London, S.J. No association between the XPD (Lys751Gln) polymorphism or the XRCC3 (Thr241Met) polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 911-912 (2001).
188. Stern, M.C., Johnson, L.R., Bell, D.A. & Taylor, J.A. XPD codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**, 1004-1011 (2002).
189. Hou, S.M. et al. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* **23**, 599-603 (2002).

190. Liang, G. et al. Sequence variations in the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* **105**, 669-673 (2003).
191. Butkiewicz, D. et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis* **22**, 593-597 (2001).
192. Winsey, S.L. et al. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res* **60**, 5612-5616 (2000).
193. Khan, S.G. et al. A new xeroderma pigmentosum group C poly(AT) insertion/deletion polymorphism. *Carcinogenesis* **21**, 1821-1825 (2000).
194. Shen, H. et al. An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Res* **61**, 3321-3325 (2001).
195. Chen, P. et al. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 843-847 (2000).
196. Healey, C.S. et al. A common variant in BRCA2 is associated with both breast cancer risk and prenatal viability. *Nat Genet* **26**, 362-364 (2000).
197. Olive, P.L. The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* **203**, 179-194 (2002).
198. Langie, S.A. et al. Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis* **21**, 153-158 (2006).
199. Kohn, K.W. Mechanistic approaches to new nitrosourea development. *Recent Results Cancer Res* **76**, 141-152 (1981).
200. Bradley, M.O. & Kohn, K.W. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res* **7**, 793-804 (1979).
201. Kohn, K.W. & Grimek-Ewig, R.A. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res* **33**, 1849-1853 (1973).
202. Munzer, J.S., Jones, S.K., O'Neill, J.P., Hartshorn, J.N. & Robison, S.H. Detection of DNA damage and repair by alkaline elution using human lymphocytes. *Mutat Res* **194**, 101-108 (1988).
203. Wheeler, K.T. & Nelson, G.B. Saturation of DNA repair measured by alkaline elution. *Radiat Res* **125**, 227-229 (1991).
204. Roberts, J.J. & Friedlos, F. Quantitative aspects of the formation and loss of DNA interstrand crosslinks in Chinese hamster cells following treatment with cis-

- diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin). I. Proportion of DNA-platinum reactions involved in DNA crosslinking. *Biochim Biophys Acta* **655**, 146-151 (1981).
205. Phoa, N. & Epe, B. Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis* **23**, 469-475 (2002).
206. Evans, H.H., Ricanati, M. & Horng, M.F. Deficiency in DNA repair in mouse lymphoma strain L5178Y-S. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7562-7566 (1987).
207. Courdavault, S. et al. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* **4**, 836-844 (2005).
208. Courdavault, S. et al. Unrepaired cyclobutane pyrimidine dimers do not prevent proliferation of UV-B-irradiated cultured human fibroblasts. *Photochem Photobiol* **79**, 145-151 (2004).
209. Pfeifer, G.P., Drouin, R., Riggs, A.D. & Holmquist, G.P. Binding of transcription factors creates hot spots for UV photoproducts in vivo. *Mol Cell Biol* **12**, 1798-1804 (1992).
210. Pfeifer, G.P., Drouin, R., Riggs, A.D. & Holmquist, G.P. In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1374-1378 (1991).
211. Rodriguez, H. et al. Mapping oxidative DNA damage using ligation-mediated polymerase chain reaction technology. *Methods* **22**, 148-156 (2000).
212. Tornaletti, S., Rozek, D. & Pfeifer, G.P. The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* **8**, 2051-2057 (1993).
213. Qiao, Y. et al. Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mutat Res* **509**, 165-174 (2002).
214. Spivak, G. & Hanawalt, P.C. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* **5**, 13-22 (2006).
215. Slebos, R.J. & Taylor, J.A. A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 212-219 (2001).

216. Lehmann, A.R. & Stevens, S. A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells. *Mutat Res* **69**, 177-190 (1980).
217. Salles, B., Frit, P., Provot, C., Jaeg, J.P. & Calsou, P. In vitro eukaryotic DNA excision repair assays: an overview. *Biochimie* **77**, 796-802 (1995).
218. Dianov, G.L. Monitoring base excision repair by in vitro assays. *Toxicology* **193**, 35-41 (2003).
219. D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. & Cadet, J. Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* **38**, 3335-3344 (1999).
220. Guerniou, V. et al. Repair of oxidative damage of thymine by HeLa whole-cell extracts: simultaneous analysis using a microsupport and comparison with traditional PAGE analysis. *Biochimie* **87**, 151-159 (2005).
221. Natsume, A. et al. IFN-beta down-regulates the expression of DNA repair gene MGMT and sensitizes resistant glioma cells to temozolomide. *Cancer Res* **65**, 7573-7579 (2005).
222. di Pietro, M. et al. Defective DNA mismatch repair determines a characteristic transcriptional profile in proximal colon cancers. *Gastroenterology* **129**, 1047-1059 (2005).
223. da Costa, R.M., Riou, L., Paquola, A., Menck, C.F. & Sarasin, A. Transcriptional profiles of unirradiated or UV-irradiated human cells expressing either the cancer-prone XPB/CS allele or the noncancer-prone XPB/TTD allele. *Oncogene* **24**, 1359-1374 (2005).
224. Wang, G. et al. The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucleic Acids Res* **32**, 2231-2240 (2004).
225. Korabiowska, M. et al. Loss of Ku70/Ku80 expression occurs more frequently in hereditary than in sporadic colorectal tumors. Tissue microarray study. *Hum Pathol* **37**, 448-452 (2006).
226. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470 (1995).

227. Mathur, P., Kaga, S., Zhan, L., Das, D.K. & Maulik, N. Antibody-array technique reveals overexpression of important DNA-repair proteins during cardiac ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 99-102 (2005).
228. Wei, Q., Wang, L.E., Sturgis, E.M. & Mao, L. Expression of nucleotide excision repair proteins in lymphocytes as a marker of susceptibility to squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1961-1966 (2005).
229. Bertone, P. & Snyder, M. Advances in functional protein microarray technology. *Febs J* **272**, 5400-5411 (2005).
230. Glokler, J. & Angenendt, P. Protein and antibody microarray technology. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **797**, 229-240 (2003).
231. Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Ravanat, J.-L., Cadet, J. & Di Mascio, P. Naphthalene endoperoxide as a source of [¹⁸O]-labeled singlet oxygen for oxidative DNA damage studies. *Trends in Photochemistry & Photobiology* **9**, 25-39 (2002).
232. Bui, C.T. & Cotton, R.G. Comparative study of permanganate oxidation reactions of nucleotide bases by spectroscopy. *Bioorg Chem* **30**, 133-137 (2002).
233. Lozinski, T. & Wierzchowski, K.L. Effect of Mg²⁺ on kinetics of oxidation of pyrimidines in duplex DNA by potassium permanganate. *Acta Biochim Pol* **48**, 511-523 (2001).
234. Gros, L., Ishchenko, A.A. & Saporbaev, M. Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat Res* **531**, 219-229 (2003).
235. Loureiro, A.P., Di Mascio, P., Gomes, O.F. & Medeiros, M.H. trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem Res Toxicol* **13**, 601-609 (2000).
236. Carvalho, V.M. et al. Formation of 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by trans,trans-2, 4-Decadienal. *Chem Res Toxicol* **11**, 1042-1047 (1998).
237. Edelson, R. et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* **316**, 297-303 (1987).
238. Llano, J., Raber, J. & Erikson, L. Theoretical study of phototoxic reactions of psoralens. *Photochem Photobio* **153**, 235-243 (2003).
239. Salles, B. & Provot, C. In vitro chemiluminescence assay to measure excision repair in cell extracts. *Methods Mol Biol* **113**, 393-401 (1999).
240. Oei, S.L. & Ziegler, M. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* **275**, 23234-23239 (2000).

241. Manley, J.L., Fire, A., Samuels, M. & Sharp, P.A. In vitro transcription: whole-cell extract. *Methods Enzymol* **101**, 568-582 (1983).
242. Collins, A.R. et al. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* **16**, 297-301 (2001).
243. Nagata, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**, 12-18 (2000).
244. Sugasawa, K. et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2**, 223-232 (1998).
245. Muotri, A.R. et al. Complementation of the DNA repair deficiency in human xeroderma pigmentosum group a and C cells by recombinant adenovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* **13**, 1833-1844 (2002).
246. Cleaver, J.E. Rapid complementation method for classifying excision repair-defective xeroderma pigmentosum cell strains. *Somatic Cell Genet* **8**, 801-810 (1982).
247. Kaur, G.P. & Athwal, R.S. Complementation of DNA repair defect in xeroderma pigmentosum cells of group C by the transfer of human chromosome 5. *Somat Cell Mol Genet* **19**, 83-93 (1993).
248. Cadet, J., Sage, E. & Douki, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* **571**, 3-17 (2005).
249. Hazane, F., Sauvaigo, S., Douki, T., Favier, A. & Beani, J.C. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. *J Photochem Photobiol B* **82**, 214-223 (2006).
250. Cadet, J., Berger, M., Douki, T. & Ravanat, J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**, 1-87 (1997).
251. Dolling, J.A., Boreham, D.R., Bahen, M.E. & Mitchel, R.E. Role of RAD9-dependent cell-cycle checkpoints in the adaptive response to ionizing radiation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Radiat Biol* **76**, 1273-1279 (2000).
252. Chankova, S.G. & Bryant, P.E. Acceleration of DNA-double strand rejoining during the adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radiat Biol Radioecol* **42**, 600-603 (2002).
253. Samson, L. & Cairns, J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*. *Nature* **267**, 281-283 (1977).
254. Olivieri, G., Bodycote, J. & Wolff, S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**, 594-597 (1984).

255. Miura, Y. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res (Tokyo)* **45**, 357-372 (2004).
256. Seong, J., Suh, C.O. & Kim, G.E. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**, 869-874 (1995).
257. Guo, G. et al. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol* **23**, 2362-2378 (2003).
258. Dent, P. et al. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* **159**, 283-300 (2003).
259. Haimovitz-Friedman, A. Radiation-induced signal transduction and stress response. *Radiat Res* **150**, S102-108 (1998).
260. Gopalakrishna, R. & Jaken, S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **28**, 1349-1361 (2000).
261. Ikushima, T., Aritomi, H. & Morisita, J. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res* **358**, 193-198 (1996).
262. Venkat, S., Apte, S.K., Chaubey, R.C. & Chauhan, P.S. Radioadaptive response in human lymphocytes in vitro. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **20**, 165-175 (2001).
263. Shadley, J.D., Afzal, V. & Wolff, S. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat Res* **111**, 511-517 (1987).
264. Buterin, T. et al. Trapping of DNA nucleotide excision repair factors by nonrepairable carcinogen adducts. *Cancer Res* **62**, 4229-4235 (2002).
265. Zhang, Z. & Poirier, M.C. Cisplatin-DNA adduct determination in the hepatic albumin gene as compared to whole genomic DNA. *Chem Res Toxicol* **10**, 971-977 (1997).
266. Gunz, D., Hess, M.T. & Naegeli, H. Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J Biol Chem* **271**, 25089-25098 (1996).
267. Baxter-Gabbard, K.L. A simple method for the large-scale preparation of sucrose gradients. *FEBS Lett* **20**, 117-119 (1972).

Annexes

Liste des publications :

J.-F. Millau, S. Caillat, G. Arras, N. Ugolin, T. Douki, J.-L. Ravanat, J. Breton, T. Oddos, S. Chevillard, A. Favier, S. Sauvaigo. Development of functional assay on biochip for measurement of enzymatic DNA repair activities in cell lysates. *Soumis à Nature Methods*

V. Guerniou, D. Rapin, J.-F. Millau, E. Bufflier, A. Favier, J. Cadet J and S. Sauvaigo (2005) Repair of oxidative damage of thymine by HeLa whole-cell extracts: simultaneous analysis using a microsupport and comparison with traditional PAGE analysis. *Biochimie*.

V. Guerniou, D. Rapin, JF. Millau, E. Bufflier, A. Favier, J. Cadet and S. Sauvaigo Optimal experimental conditions for the measurement of repair activities of DNA-glycosylases contained in cell extracts on a biochip. *Appl. Nanosciences*. **1**, 39-46

Liste des posters à l'occasion de congrès scientifiques :

DNA Repair: from Molecular Mechanism to Human Disease: 2-7 April, 2006, Noordwijkerhout The Netherlands :

A PLASMID BIOCHIP FOR DNA REPAIR MEASUREMENT

Millau Jean-François, Caillat Sylvain, Francette Odin, Favier Alain, Sauvaigo Sylvie

7th Winter Research Conferences; Oxidatively Generated Damage to DNA, Formation, repair and biological consequences, 19-22 March 2006, Les Houches France :

A PLASMID BIOCHIP FOR DNA REPAIR MEASUREMENT, ADAPTATION OF HeLa CELLS TO UVB IRRADIATION.

Millau Jean-François, Caillat Sylvain, Favier Alain, Sauvaigo Sylvie

11th Congress of European Society for Photobiology, 3-8 Septembre 2005 Aix-les-bains France :

A PLASMID BIOCHIP FOR DNA REPAIR MEASUREMENT, ADAPTATION OF HeLa CELLS TO UVB IRRADIATION.

Millau Jean-François, Caillat Sylvain, Favier Alain, Sauvaigo Sylvie

6ième colloque des 3R, 19-22 Juin 2005, Presqu'île de Giens France :

UNE BIOPUCE POUR MESURER LA REPARATION DES LESIONS DE BASES

Millau JE, Caillat S, Favier A, Sauvaigo S

Brevet :

PROCEDE D'IMMOBILISATION DE L'ADN SUPERENROULE ET UTILISATION
POUR ANALYSER LA REPARATION DE L'ADN

Inventeurs : MILLAU Jean-François, SAUVAIGO Sylvie

N° : PCT/FR2006/001378