



HAL
open science

Mécanisme d'action de la drogue anticancéreuse cis-dichlorodiammineplatine (II) : étude de l'interaction entre les protéines de réparation des mésappariements et l'ADN platiné

Laurence Fourier-Bauchet

► To cite this version:

Laurence Fourier-Bauchet. Mécanisme d'action de la drogue anticancéreuse cis-dichlorodiammineplatine (II) : étude de l'interaction entre les protéines de réparation des mésappariements et l'ADN platiné. Biochimie [q-bio.BM]. Université d'Orléans, 2003. Français. NNT : . tel-00483029

HAL Id: tel-00483029

<https://theses.hal.science/tel-00483029>

Submitted on 12 May 2010

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.



THÈSE
PRÉSENTÉE
A L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

Discipline : Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie

PAR
Laurence FOURRIER

MÉCANISME D'ACTION DE LA DROGUE ANTICANCÉREUSE
***CIS*-DICHLORODIAMMINEPLATINE (II) : ÉTUDE DE**
L'INTERACTION ENTRE LES PROTÉINES DE RÉPARATION
DES MÉSAPPARIEMENTS ET L'ADN PLATINÉ

Thèse soutenance le 11 septembre 2003 à l'amphithéâtre Charles Sadron, CNRS d'Orléans.

MEMBRES DU JURY :

- M. Jean-Marc Malinge **Directeur de thèse**, CNRS Orléans
- M. Tobias Hevor **Président**, Université d'Orléans
- M. Jiri Kozelka Rapporteur, CNRS Paris V
- M. Guiseppe Villani Rapporteur, CNRS Toulouse
- M. Peter Brooks Examineur, Intégragen CNG Evry



THÈSE
PRÉSENTÉE
A L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

Discipline : Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie

PAR
Laurence FOURRIER

MÉCANISME D'ACTION DE LA DROGUE ANTICANCÉREUSE
***CIS*-DICHLORODIAMMINEPLATINE (II) : ÉTUDE DE**
L'INTERACTION ENTRE LES PROTÉINES DE RÉPARATION
DES MÉSAPPARIEMENTS ET L'ADN PLATINÉ

Thèse soutenance le 11 septembre 2003 à l'amphithéâtre Charles Sadron, CNRS d'Orléans.

MEMBRES DU JURY :

- M. Jean-Marc Malinge **Directeur de thèse**, CNRS Orléans
- M. Tobias Hevor **Président**, Université d'Orléans
- M. Jiri Kozelka Rapporteur, CNRS Paris V
- M. Guiseppe Villani Rapporteur, CNRS Toulouse
- M. Peter Brooks Examineur, Integragen CNG Evry

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Centre de Biophysique Moléculaire du CNRS d'Orléans et au Centre National de Génotypage d'Evry, avec le soutien financier du Ministère de la Recherche et de la Technologie et de la Ligue contre le Cancer du Loiret.

Je tiens à remercier les Professeurs Giuseppe Villani, du CNRS de Toulouse, et Jiri Kozelka de l'Université Paris V, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que le Professeur Tobias Hevor, Président du jury et représentant de l'École Doctorale d'Orléans et le Dr Peter Brooks, qui ont jugé ce travail.

Je remercie le Dr Jean-Marc Malinge, mon directeur de thèse, pour ce sujet très intéressant et ses idées de recherche. Merci pour son soutien moral lors de la dernière ligne droite jusqu'à la soutenance et les dernières corrections.

Une attention toute particulière au Dre Françoise Culand qui nous a accepté dans son équipe au cours de ce travail. Sa gentillesse et sa disponibilité m'ont plus d'une fois réconfortée. Un très grand merci, ainsi qu'à Guillaume, pour le temps qu'ils ont passé sur l'impression des thèses et leur envoi aux membres du jury en temps et en heure.

Merci aussi au Dr Michel Charlier pour son soutien moral. Nous garderons un bon souvenir de son séjour au Québec.

Merci à Davy et Guillaume, mes voisins de paillasse, qui ont supporté mon bavardage incessant. Merci à Gwénaëlle pour son travail pendant son DEA.

Merci au coin café qui comprend/comprenait, outre la cafetière, Séverine, Davy, Anne, Guillaume, Ronald, Isidore, Erwann, Corinne, Hélène et Hélène, Jean-Marc B., Bertrand, Bernard, Agnès, Annie, Dominique, Marylène et Nadège. Que de bons moments!

Enfin, une pensée particulière à mes parents et mes frères et sœur qui m'ont soutenu tout le long de ce travail, aux parents de Jérémy pour leur soutien moral et affectif quotidien, et surtout à Jérémy pour son amour, sa patience et son dévouement. Qu'aurai-je fait sans eux!

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LE SYSTEME DE REPARATION DE L'ADN MISMATCH REPAIR	
I Introduction	3
II Présentation du fonctionnement du système de réparation des mésappariements ...	4
1- Chez <i>Escherichia coli</i>	4
2- Dans les cellules humaines	5
III Protéines impliquées dans le système de réparation des mésappariements chez <i>Escherichia coli</i>	6
1- La structure de MutS	6
2- Les protéines impliquées dans la discrimination de brin	10
a) La protéine MutL	10
b) La protéine MutH	11
3- Les protéines impliquées dans la réparation après la discrimination du brin néosynthétisé	12
IV Le système eucaryote de réparation des mésappariements	14
1- Les protéines homologues de MutS	15
2- Les protéines eucaryotes impliquées dans la discrimination de brin	17
a) Les protéines homologues de MuL	17
b) Les hypothèses sur le processus de discrimination de brin	18
3- Les protéines eucaryotes impliquées dans la réparation des mésappariements après la discrimination du brin	19
4- Les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements	20
V Le rôle de l'ATP dans les étapes de reconnaissance et de discrimination de brin chez les procaryotes et les eucaryotes	21
1- Effets de l'ATP et de l'ADP sur la conformation et les propriétés biochimiques des protéines MutS et MutL et de leurs homologues eucaryotes	22
a) Effets de l'ATP et de l'ADP sur MutS et ses homologues eucaryotes	22
b) Effets de l'ATP sur MutL	24
2- Les modèles proposés	25

a) Le modèle de translocation	25
b) Le modèle de diffusion passive ou "sliding clamp"	28
c) Le troisième modèle	29
VI Le système mismatch repair et la recombinaison	31
1- Chez <i>Escherichia coli</i>	32
2- Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
3- Chez les eucaryotes supérieurs	33
VII Le système mismatch repair et les lésions de l'ADN	34

CHAPITRE II : LES AUTRES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN

I Systèmes de réparation des lésions et bases modifiées	38
1- Réparation par réversion	38
a) La photoréactivation	38
b) Le transfert des groupements méthyles	39
2- Le système de réparation par excision de nucléotides	40
a) La réparation par excision de nucléotides procaryote	40
b) La réparation par excision de nucléotides eucaryote	41
c) La réparation couplée à la transcription	43
3- La réparation des cassures de l'ADN	44
a) La recombinaison homologue	45
b) La recombinaison illégitime	47
c) La réparation par jonction d'extrémités non homologues	48
II Les systèmes de réparation des mésappariements indépendants du système MMR ..	50
1- La réparation par excision de base	50
a) Le système REB procaryote	51
b) Le système REB eucaryote	51
c) Interactions entre le système MMR et le système REB	52
2- Le système de réparation "very short pathway"	53

CHAPITRE III : LE CISPLATINE

I Le cisplatine et l'ADN	57
1- Réactivité du cisplatine	57
2- Les adduits du cisplatine	58
a) Les adduits monofonctionnels	58
b) Les adduits bifonctionnels	58

3- La structure des adduits du cisplatine	59
II Effets biochimiques des adduits du cisplatine	62
1- Inhibition de la réplication par le cisplatine	62
2- Réplication translésionnelle et mutagénicité du cisplatine	64
a) Chez les procaryotes	64
b) Chez les eucaryotes	65
3- Effets du cisplatine sur la transcription	65
III Reconnaissance des adduits du cisplatine par les protéines cellulaires	67
1- Les protéines à boîte HMG	67
2- Protéines de réparation et cisplatine	68
a) Les protéines impliquées dans le système REN	69
b) Reconnaissance de l'ADN platiné par une protéine du système REB	70
c) Les protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin	70
d) Les protéines impliquées dans le système MMR	70
3- La protéine histone H1	71

CHAPITRE IV : IMPLICATION DU SYSTEME MMR DANS LA CYTOTOXICITE DU CISPLATINE

I Mises en évidence de la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR	72
II Les modèles proposés pour expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine	73
1- Le modèle du cycle futile	73
2- Intervention de la recombinaison contrôlée par le système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine	75
3- Inhibition de la réplication par le système MMR	76
4- Inhibition de la réparation	76
III Induction directe de l'apoptose impliquant le système MMR	77
1- La voie de transduction du signal impliquant la protéine p53	77
2- La voie de transduction du signal impliquant la protéine p73	78

MATERIEL ET METHODES

I Préparation des sondes utilisées	79
1- Préparation des oligonucléotides simples brins	79

a) Purification des oligonucléotides simples brins de 24 bases	79
b) Platination des brins supérieurs de 24 bases	80
2- Préparation des sondes radiomarquées	80
a) Marquage radioactif	80
b) Hybridation des duplexes	81
II Production et purification des protéines MutS d'<i>E. coli</i>	81
1- Transformation bactérienne	81
2- Production de la protéine MutS	82
3- Purification de la protéine MutS	82
3- Production de la protéine MutY	83
III Les études par gel de retardement électrophorétique	84
1- Estimation de l'affinité relative de la protéine MutS	84
a) Principe	84
b) Protocole expérimental	85
2- Expériences de compétition	86
3- Mesure des constantes de vitesse d'association et de dissociation des complexes nucléoprotéiques par technique de résonance plasmonique de surface (SPR)	87
a) Principe	87
b) Protocole expérimental	87
4- Etude de l'activité glycosylase de la protéine MutY d' <i>E. coli</i>	88
a) Etude du clivage des duplexes	88
b) Etude de la spécificité de la protéine MutY par compétition contre la sonde radiomarquée GG/AC	89

RESULTATS

INTRODUCTION	90
---------------------------	----

CHAPITRE I : INTERACTION DE LA PROTEINE MutS AVEC DES LESIONS ET DES PRODUITS DE LESIONS DU CISPLATINE : ROLE POTENTIEL DANS LA DETECTION DES DOMMAGES DE L'ADN INDUITS PAR LE CISPLATINE

I Introduction	93
II Discussion	95

CHAPITRE II : PROPRIETES BIOCHIMIQUES DE LA PROTEINE EN PRESENCE DE L'ADDUIT 1,2-d(GpG) SURIMPOSE A UN MESAPPARIEMENT G/T

I Introduction	101
II Résultats	102
1- Modulation de l'affinité relative de MutS par un composé de lésion du cisplatine en présence d'adénine nucléotides	102
2- Effet de l'AMPPNP sur l'affinité de la protéine MutS pour les hétéroduplexes GG/CT et G*G*/CT de 46 paires de bases	106
3- Effet de la concentration en AMPPNP sur les complexes MutS/GG/CT et MutS/G*G*/CT.....	108
4- Effet de la mutation de la phénylalanine 36 en alanine sur l'affinité de la protéine MutS pour les duplexes de 24 paires de bases GG/CT et G*G*/CT	111
III Discussion	112

CHAPITRE III : RECONNAISSANCE D'UN COMPOSE DE LESION CONTENANT L'ADDUIT MAJORITAIRE DU DACH Pt PAR MutS

I Introduction	117
II Résultats	120
1- Reconnaissance d'un composé de lésion du DACH Pt par MutS	120
2- Effet des nucléotides sur la reconnaissance d'un composé de lésion du DACH Pt par MutS	122
3- Effet de la concentration en AMPPNP sur le complexe MutS/G*G*/CT DACH Pt ..	123
III Discussion	126

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	129
---	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
--	-----

ABREVIATIONS

6-ThioG	= 6-thioguanine
8-oxoG	= 8-oxoguanine
Å	= angström
ADN	= acide désoxyribonucléique
ADP	= adénosine-5'-triphosphate
AMPPNP	= adénylyl-imidiphosphate
ARN	= acide ribonucléique
Asn	= asparagine
ATP	= adénosine-5'-diphosphate
ATP γ S	= adénosine 5'-O-thiotriphosphate
BASC	= BRCA1 associated genome surveillance complex
CDB	= cassure double brin
cisplatine	= <i>cis</i> -dichlorodiammineplatinum (II)
DACH	= 1,2-diamminecyclohexane
DACHPt	= 1,2-diamminecyclohexanedichloroplatine
DT	= dimères de thymines
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
Glu	= acide glutamique
HMG	= High Mobility Group Protein
ID	= insertion/délétion de nucléotides
JENH	= réparation par jonction d'extrémités non homologues
K _d	= constante de dissociation
kDa	= kilodalton
MgCl ₂	= chlorure de magnésium
MGMT	= O6-méthyle guanine méthyle transférase
MLH	= MutL Homolog
MNNG	= N-méthyle-N'-nitro-N-nitroguanidine
MNU	= N-méthyle-N-nitrouée
MSH	= MutS Homolog
MYH	= MutY Homolog

O4-MetT	= O4-méthyle thymine
O6-MetG	= O6-méthyle guanine
PCNA	= Proliferating Cell Nuclear Antigen
Phe	= phénylalanine
PMS	= Post-Meiotic Segregation
pol	= polymérase
RCT	= réparation couplée à la transcription
REB	= réparation par excision de bases
REN	= réparation par excision de nucléotides
RH	= recombinaison homologue
RI	= recombinaison illégitime
RMN	= résonance magnétique nucléaire
RPA	= Replication Protein A
<i>S. cerevisiae</i>	= <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Site AP	= site apurique/apyrimidique
Ssb	= Single-strand binding protein
<i>Taq</i>	= <i>Thermus aquaticus</i>
transplatine	= <i>trans</i> -dichlorodiammineplatinum (II)
UBF	= Upstream Binding Factor
UV	= rayons ultraviolets
VSP	= système “very short pathway”

**INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE**

Support des informations gérant l'ensemble des fonctions de chaque organisme vivant, l'ADN est une molécule essentielle soumise à un paradoxe : si l'évolution des espèces, qui passe par des modifications de l'information génétique, nécessite une adaptation aux contraintes extérieures, la condition indispensable à la survie d'un individu est le contrôle de l'intégrité de son patrimoine génétique.

L'intégrité du génome est assurée grâce à un ensemble complexe de systèmes de réparation de l'ADN qui interviennent très spécifiquement selon les dommages de l'ADN détectés. Le dysfonctionnement de ces systèmes peut être à l'origine d'un grand nombre de maladies humaines, dont le cancer. Les systèmes majeurs sont les systèmes de réparation des mésappariements, les systèmes de réparation par excision de nucléotides et par excision de bases et la réparation par recombinaison.

Le système de réparation des mésappariements, appelé système mismatch repair (MMR), est un système de réparation fondamental impliqué dans la réparation des mésappariements et des insertions de bases formés au cours de la réplication et/ou de la recombinaison de l'ADN. La réparation de l'ADN par ce système comprend trois étapes : la reconnaissance du mésappariement ou de l'insertion/délétion de nucléotides par la protéine MutS, la recherche du signal permettant de discriminer le brin néosynthétisé du brin parental et la réparation par excision du fragment d'ADN contenant la base mésappariée.

Une caractéristique remarquable du système MMR est la discrimination de brin qui permet d'enlever la base mésappariée du brin néosynthétisé afin d'éviter l'introduction d'une mutation. Son mécanisme moléculaire, pas encore entièrement élucidé, est complexe. En effet, les protéines impliquées dans le déclenchement de la réparation sont régulées par la fixation et l'hydrolyse d'ATP qui induit des changements de conformation permettant le déclenchement des étapes suivantes. De plus, le système MMR interagit avec d'autres systèmes de réparation telles que la réparation par excision de bases et la recombinaison *via* des interactions protéines/protéines et peut induire la mort cellulaire par apoptose selon un processus mal compris.

Le système MMR intervient aussi dans la cytotoxicité de certaines drogues anticancéreuses comme le *cis*-dichlorodiammineplatine (II) (cisplatine) et des agents méthylants (N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) et N-méthyle-N-nitrouée (MNU)) qui interagissent avec l'ADN et le déforment, formant des lésions sur l'ADN. Le lien physique entre ce système de réparation et ces drogues passe probablement par une étape de reconnaissance de ces lésions. Notre équipe travaille sur le mécanisme d'action du cisplatine, puissante drogue antitumorale utilisée contre les tumeurs solides. Il est maintenant bien établi

qu'il existe une relation entre la déficience des cellules en protéines impliquées dans le fonctionnement du système MMR et la résistance de ces cellules au cisplatine. Il est nécessaire de comprendre les mécanismes biochimiques qui relient le fonctionnement du système mismatch repair à la cytotoxicité du cisplatine.

La première étape de ce mécanisme est supposée être la reconnaissance par la protéine MutS des lésions de l'ADN formées par le cisplatine, MutS appartenant au système MMR. Nous avons déterminé dans une étude physico-chimique les adduits du cisplatine et les composés de lésions du cisplatine reconnus spécifiquement par la protéine MutS d'*Escherichia coli*. Ensuite nous avons étudié les effets de la présence de composés de lésions du cisplatine sur la régulation de MutS par les nucléotides ADP et ATP. Enfin nous avons déterminé, dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude précédente, les effets de la présence d'un composé de lésions du 1,2-diamminocyclohexane dichloroplatinum (II) (DACH Pt), dérivé anticancéreux du cisplatine ne présentant pas de résistance croisée avec le cisplatine, sur la régulation de MutS par l'ADP et l'ATP.

Dans la partie introductive de ce mémoire, les connaissances actuelles sur les protéines procaryotes et eucaryotes impliquées dans le système mismatch repair, l'effet des nucléotides ADP et ATP sur ces protéines en interaction avec l'ADN et les modèles proposés pour expliquer le processus de la réparation sont présentés dans le chapitre I. Le chapitre II aborde les différents systèmes procaryotes et eucaryotes de réparation de l'ADN, ainsi que les relations mises en évidence entre certains de ces systèmes et le système MMR. Je présenterai ensuite un chapitre sur le cisplatine, les déformations qu'il induit sur la structure de l'ADN, ses effets négatifs sur la réplication et la transcription ainsi que la reconnaissance des adduits de cette drogue par différentes protéines cellulaires, dont certaines appartiennent aux systèmes de réparation de l'ADN présentés dans le chapitre II. Enfin, je résumerai les différents travaux mettant en évidence l'implication du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine.

CHAP I : LE SYSTEME DE REPARATION DE L'ADN MISMATCH REPAIR

I Introduction

L'importance du système mismatch repair (système MMR) dans le maintien de l'intégrité du génome a été établie il y a plus de 20 ans par inactivation de gènes appelés gènes "mut" possédant un phénotype hypermutateur (Glyckman et Radman, 1980). Cette inactivation aboutit en effet à une augmentation du taux de mutations spontanées qui passent d'une erreur toutes les 10^{10} bases à une erreur toutes les bases 10^6 - 10^7 (pour revues, Kunkel, 1992 ; Frieberg et coll., 1995). P. Modrich et son équipe démontrent dès 1983 l'intervention des protéines MutS, MutL, MutH, ADN ligase et Ssb (Single-strand binding protein) dans cette voie de réparation (Lu et coll., 1983) tandis que R. Fishel et R.D. Kolodner démontrent à la même époque qu'*Escherichia coli* possède une voie de réparation des mésappariements méthylation-dépendante (Fishel et Kolodner, 1983).

Un système fonctionnel a pu être totalement reconstitué *in vitro* en 1989 à partir de protéines purifiées (Lahue et coll., 1989). Ce modèle a servi de base pour isoler les protéines homologues de MutS et de MutL chez de nombreuses espèces eucaryotes (pour revue, Harfe et Jinks-Robertson, 2000) et déterminer les mécanismes biochimiques du système MMR eucaryote.

La découverte d'un lien entre les mutations des gènes du système MMR et d'une part, l'apparition de certains cancers et principalement du cancer colorectal héréditaire sans polypose (ou syndrome de Lynch) (Leach et coll., 1993 ; Nicolaidis et coll., 1994 ; Papadopoulos et coll., 1994) et d'autre part, l'apparition d'une résistance à différents agents anticancéreux dont le cisplatine (Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996, 1997) a relancé les études sur la totale compréhension du mécanisme biochimique de ce système.

Après présentation du fonctionnement du système MMR chez les procaryotes et chez les humains, je présenterai les connaissances actuelles sur les différentes protéines procaryotes et humaines impliquées ou supposées impliquées dans les trois étapes du système MMR (reconnaissance, discrimination des brins d'ADN et réparation). Dans le paragraphe V,

j'aborderai le rôle de l'ADP et de l'ATP, nucléotides essentiels dans le fonctionnement du système MMR, ainsi que les modèles sur le mécanisme du système MMR découlant des observations de l'effet des nucléotides sur les protéines MutS et MutL et leurs homologues eucaryotes.

Le système MMR intervient à un autre niveau pour garantir l'intégrité génomique. En effet, il corrige les mésappariements présents sur les intermédiaires ADN hétéroduplexes provenant de la recombinaison entre deux séquences ADN légèrement divergentes et bloque la recombinaison lorsque les séquences sont trop divergentes. De plus, le système MMR reconnaît des dommages de l'ADN autres que les mésappariements et insertions/délétions de nucléotides et semble impliqué dans la cytotoxicité de certaines drogues. Ces deux points seront abordés respectivement dans les paragraphes VI et VII.

II Présentation du fonctionnement du système de réparation des mésappariements

1- Chez *Escherichia coli*

Quoique le rôle respectif des protéines bactériennes impliquées dans le système MMR soit connu, les différentes étapes du mécanisme biochimique procaryote ne sont pas encore complètement élucidées (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 2000).

La réparation d'un mésappariement se fait en trois étapes : la reconnaissance du mésappariement, la discrimination de brin permettant de déterminer le brin néosynthétisé du brin parental, et la réparation par excision d'un long fragment d'ADN, resynthèse et ligation (pour revue, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998).

A l'heure actuelle, on ne connaît pas les mécanismes de reconnaissance des différents mésappariements ou insertions/délétions de nucléotides (ID) par la protéine homodimérique MutS. Bien que la structure de plusieurs mésappariements soit déterminée (G/T, G/G, G/A) (Hunter et coll., 1987 ; Roongta et coll., 1990 ; Webster et coll., 1990), il est difficile de prévoir un mécanisme de reconnaissance universel étant donné la nature différente des déformations de l'ADN que ces mésappariements entraînent et qu'aucune étude n'a pu

corrélent avec les variations de l'affinité de MutS pour ces différents mésappariements. De plus, l'affinité de MutS pour un mésappariement est modulée par la nature des bases entourant le mésappariement sans règle de préférence (Brown et coll., 2001).

MutS reconnaît sept des huit mésappariements avec une affinité variable (C/C étant le mésappariement non reconnu) (Su et Modrich, 1986, Su et coll., 1988) et les ID de moins de quatre nucléotides (Parker et Marinus, 1992). La présence d'ATP provoque le départ de MutS du mésappariement par un mécanisme encore incompris (Allen et coll., 1997). L'homodimère MutL se fixe sur MutS dans une réaction qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP (Galio et coll., 1999, Joshi et Rao, 2002 ; Junop et coll., 2003). Ce complexe va alors rechercher un site d(GATC) hémiméthylé occupé par l'endonucléase MutH le plus proche en 5' ou en 3' du mésappariement (Lahue et coll., 1987 ; Au et coll., 1992). L'interaction entre MutL et MutH *via* MutS va activer de façon ATP-dépendante l'endonucléase qui va cliver le brin néosynthétisé au niveau du site d(GATC) en 5' de l'adénine non méthylée (Ban et Yang, 1998^b ; Spampinato et Modrich, 2000). Le système MMR est donc bidirectionnel (Grilley et coll., 1993 ; Cooper et coll., 1993). MutL interagit aussi avec l'ADN hélicase II (appelée aussi UvrD ou MutU) et promouvoit la fixation de cette protéine sur la coupure simple brin (Dao et Modrich, 1998 ; Yamaguchi et coll., 1998).

Pendant la phase d'excision, en présence de l'ADN hélicase II et des protéines Ssb (single-strand binding protein), un long fragment d'ADN néosynthétisé (1,5 à 2 kB) (Su et coll., 1989) est dégradé par un ensemble d'exonucléases 5'→3' et 3'→5' (en fonction de l'emplacement de la coupure par rapport au mésappariement) puis resynthétisé par l'ADN polymérase III holoenzyme qui interagit avec MutS (Lopez de Saro et O'Donnell, 2001). Enfin, l'ADN ligase intervient pour assurer la continuité du brin d'ADN (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998 ; Hsieh, 2001 ; Marti et coll., 2002).

2- Dans les cellules humaines

Six homologues de MutS et quatre homologues de MutL ont été caractérisés à ce jour. Tous les mésappariements sont détectés et corrigés par le système MMR (Brown et Jiricny, 1988 ; Holmes et coll., 1990 ; Acharya et coll., 1996) ainsi que les petites insertions/délétions (Habraken et coll., 1996 ; Palombo et coll., 1996). L'efficacité de la réparation est influencée par la nature du mésappariement et le contexte séquentiel (Brown et Jiricny, 1988).

Les homologues eucaryotes de MutS et de MutL sont hétérodimériques alors que MutS et de MutL sont des homodimères. Deux homologues de MutS ont un rôle essentiel dans la réparation post-réplivative (MutS α formée par les protéines MSH2 et MSH6 et MutS β comprenant MSH2 et MSH3) alors que l'hétérodimère MSH4/MSH5 fonctionne spécifiquement pendant la méiose. Comme dans le cas des bactéries, le rôle des homologues de MutL n'est pas compris. Aucun homologue de MutH n'a été découvert chez les eucaryotes et le mécanisme de la discrimination de brin n'est pas compris. De même, les protéines intervenant dans les étapes d'excision, de resynthèse et de ligation ne sont pas toutes déterminées (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998 ; Marti et coll., 2002).

III Protéines impliquées dans le système de réparation des mésappariements chez *Escherichia coli*

1- La structure de MutS

MutS est une protéine dimérique de 97 kDa par monomère (Su et Modrich, 1986) qui appartient à la superfamille des ATPases ABC (Adenine nucleotide Binding Cassette). Cette famille protéique est caractérisée par le domaine ATPasique formé lors de l'association des deux monomères.

La structure a été déterminée à partir du cristal de MutS de *Thermus aquaticus* (*Taq*) et des co-cristaux de MutS *Taq*/insertion d'un T (Obmolova et coll., 2000) et de MutS *E. coli*/mésappariement G/T (Lamers et coll., 2000). Ces deux protéines sont très similaires. Sans ADN, la protéine a une forme de U tandis qu'en présence d'un hétéroduplexe, elle prend une forme de disque ovale, avec deux larges canaux centraux, dont l'un forme le site de fixation de l'ADN (fig. 1). La surface est presque entièrement chargée négativement sauf au niveau de ce canal (Obmolova et coll., 2000).

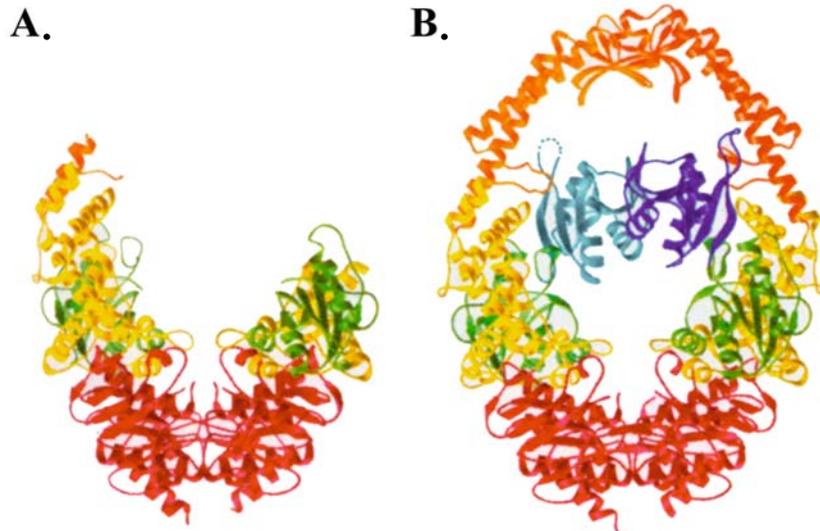


Fig. 1 : Dimère de MutS *Thermus aquaticus* (Obmolova et coll., 2000). Le même dimère est cristallisé en absence d'ADN (A) et en présence d'un duplexe contenant une insertion d'une thymine (B). Les cinq domaines sont colorés en bleu (I), en vert (II), en jaune (III), en orange (IV) et en rouge (V). Sans ADN, les domaines I et V sont trop mobiles pour être cristallisés.

La protéine MutS en solution est présente essentiellement sous forme dimérique, mais elle peut exister sous forme tétramérique (Su et Modrich, 1986 ; Takamatsu et coll., 1996 ; Biswas et Hsieh, 1997) et hexamérique (Bjornson et coll., 2000). Dans le cas d'un dimère de MutS, chaque monomère est structurellement identique. Un monomère est formé de cinq domaines et présente une forme de virgule (fig. 2) : le domaine de reconnaissance du mésappariement (I) (résidus 2 à 115 chez *E. coli*), le domaine de connexion (II) (résidus 116 à 266), le domaine "core" central (III) (résidus 267 à 443 et 504 à 561), le domaine "clamp" (IV) (résidus 444 à 503) et le domaine ATPasique (V) (résidus 568 à 765). Les domaines I, II, IV et V possèdent des hélices α et des feuillets β , tandis que le domaine III est exclusivement formé d'hélices α . Dans la partie C-terminale des domaines V se trouve un motif hélice-tour-hélice (HTH) impliqué dans le contact entre les deux monomères lors de la dimérisation. Les domaines II et III de chaque monomère sont des domaines de liaison permettant la communication entre les domaines I et V (grâce au domaine II) et IV et V (*via* le domaine III) (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000 ; Hsieh, 2001 ; Sixma, 2001).

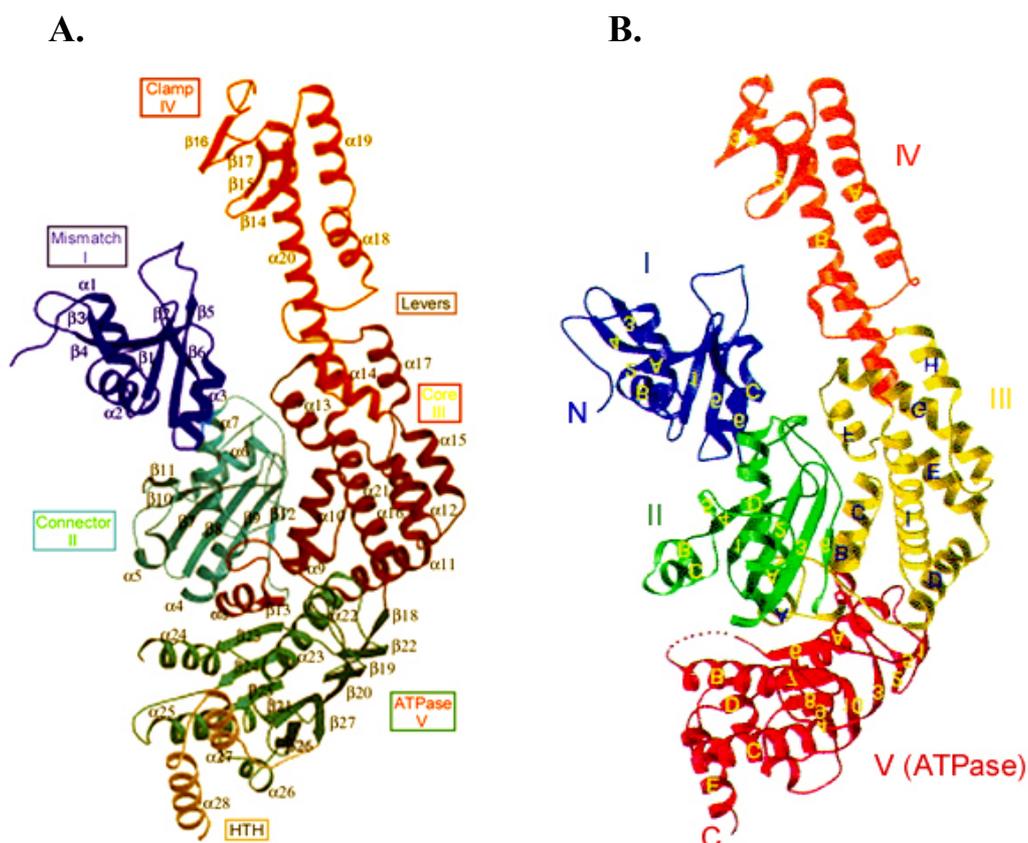


Fig. 2 : Structures de MutS monomère d'*Escherichia coli* (A) et de *Thermus aquaticus* (B) (d'après Lamers et coll., 2000 (A) et Obmolova et coll., 2000 (B)). Les deux protéines sont orientées de la même façon. Les cinq domaines du monomère de MutS d'*E. coli* sont colorés en bleu (I), en turquoise (II), en rouge (III), en orange (IV) et en vert (V). Le domaine HTH est coloré en jaune (A). Les cinq domaines du monomère de MutS de *T. aquaticus* sont colorés en bleu (I), en vert (II), en jaune (III), en orange (IV) et en rouge (V) (B).

La fixation de MutS sur un ADN hétéroduplexe entraîne des modifications structurales aussi bien de la protéine que de l'ADN. Les domaines I et IV des deux monomères viennent entourer l'ADN et donnent ainsi à la protéine la forme de deux mains en prière ("The praying hand of fidelity", Jiricny, 2000) (fig. 3).

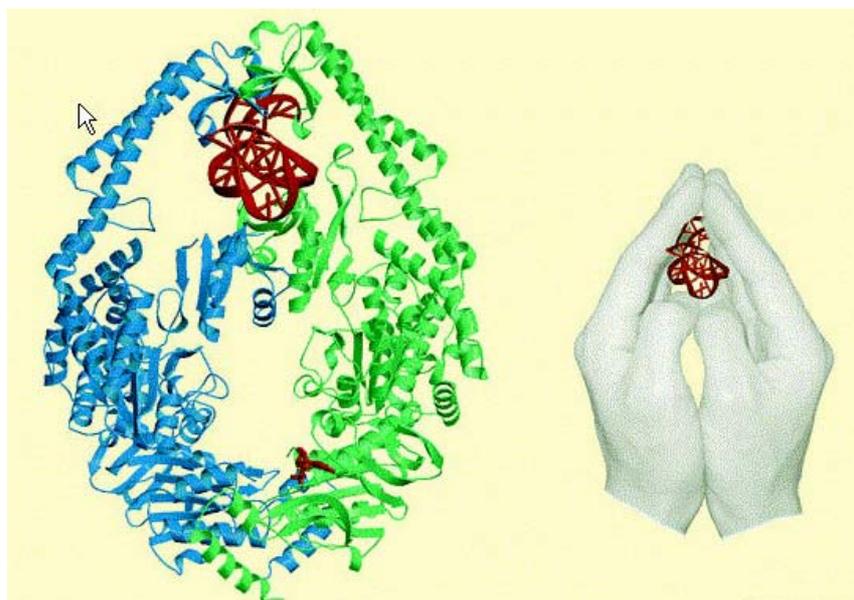


Fig. 3 : Interaction de la protéine MutS d'*E. coli* avec un duplexe contenant un mésappariement G/T et la représentation des deux mains en prière tenant l'hétéroduplexe (d'après Jiricny, 2000). Le monomère A, dont le domaine I interagit spécifiquement avec l'ADN est représenté en vert, le monomère B en bleu. L'ADN et l'ADP (fixés respectivement dans les domaines I et V du monomère A) sont en rouge.

Les interactions entre MutS et l'ADN sont asymétriques. Seul le domaine I du monomère A (I_A) a un contact spécifique avec l'ADN (du côté du petit sillon) i) en intercalant une phénylalanine (Phe 36 chez MutS *coli* et Phe 39 chez MutS *Taq*) dont le noyau aromatique vient s'empiler contre la thymine mésappariée ou non appariée et ii) en établissant une liaison hydrogène entre cette thymine et la chaîne latérale d'un acide glutamique (Glu 38 chez MutS *coli* et Glu 41 chez MutS *Taq*). La mutation de cette phénylalanine en alanine abolit la fixation de MutS avec le mésappariement, ce qui confirme son rôle primordial dans cette étape (Malkov et coll., 1997 ; Yamamoto et coll., 2000) tandis qu'une mutation sur l'acide glutamique en alanine diminue la spécificité de la reconnaissance du mésappariement et provoque une perte de la réparation *in vivo* (Schofield et coll., 2001^a). Le domaine IV du monomère B (IV_B), opposé au domaine I_A , vient interagir avec le squelette phosphodiester du côté du grand sillon. Les domaines IV_A et I_B ne sont pas engagés dans la fixation spécifique de l'ADN mais participent à la stabilisation de l'ADN déformé. La réquisition de ces quatre domaines dans l'interaction de la protéine avec l'ADN explique la nécessité d'avoir une protéine dimérisée au moment de la reconnaissance du mésappariement ou de l'ID.

Les interactions spécifiques de chaque monomère de MutS avec l'ADN conduisent cette protéine à devenir hétérodimérique d'un point de vue structural une fois qu'elle est fixée à l'ADN. Dans la double hélice, le mésappariement G/T, qui forme une paire de bases

instable, et la thymine seule restent empilés avec les bases qui les entourent. L'insertion du noyau aromatique de la phénylalanine dans le petit sillon de l'ADN entraîne une courbure de l'ADN vers le grand sillon au niveau du mésappariement ou de la base non appariée (60° dans les deux cas) ainsi qu'un élargissement du petit sillon et un rétrécissement du grand sillon opposé. La thymine impliquée dans le mésappariement complexé à MutS subit une rotation, ce qui modifie la forme du mésappariement. De même, la thymine non appariée est déplacée d'environ 3 Å vers le petit sillon et est stabilisée grâce à ses interactions avec la protéine, en particulier grâce à l'empilement de cette thymine avec la phénylalanine et à la formation d'une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la glutamine 41 (Hsieh, 2001 ; Sixma, 2001). La seule différence observée entre les deux protéines cristallisées est la conformation de l'ADN une fois lié à MutS. Dans le co-cristal MutS *Taq*/ADN avec insertion d'un T, l'ADN présente une conformation B tandis que dans le co-cristal MutS *E. coli*/mésappariement G/T, l'ADN prend une forme A, peut-être plus adaptée pour stabiliser l'ADN courbé au niveau du mésappariement.

2- Les protéines impliquées dans la discrimination de brin

a) La protéine MutL

La protéine MutL est une protéine formée de deux monomères identiques de 70 kDa chacun (Grilley et coll., 1989). Elle intervient dans le système mismatch repair dès que MutS s'est fixée sur un mésappariement, mais son rôle n'est pas compris.

L'obtention de la structure cristalline du fragment N-terminal (40 kDa) (fig. 4) de MutL d'*E. coli* (Ban et Yang, 1998^a), sans nucléotide fixé et avec une molécule d'ADP ou d'AMPPNP (adénylyl-imidiphosphate) (analogue de l'ATP non hydrolysable en présence de Mg²⁺), a permis d'identifier un site de fixation de l'ATP/ADP (Ban et coll., 1999). La fixation de l'ATP par MutL provoque sa dimérisation (Ban et coll., 1999). Cette protéine interagit dynamiquement avec le complexe MutS/ADN pour former un complexe ternaire dans une réaction dépendant de l'ATP (Grilley et coll., 1989 ; Allen et coll., 1997 ; Habraken et coll., 1998 ; Galio et coll., 1999 ; Joshi et Rao, 2002). L'activité ATPasique de MutL est stimulée par l'ADN et cette hydrolyse induit la dissociation du dimère LN40 (Ban et coll., 1999). MutL se retrouve alors sous une forme ADP et monomérique. Cette protéine, comme MutS, est régulée grâce à un cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (voir § V 1) (pour revue, Yang, 2000).



Fig. 4 : Cristal du fragment de 40 kDa LN40 de la protéine MutL (résidus 1 à 349) vu sous deux angles différents (d'après Ban et Yang, 1998^a). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en vert et les boucles en orange.

b) La protéine MutH

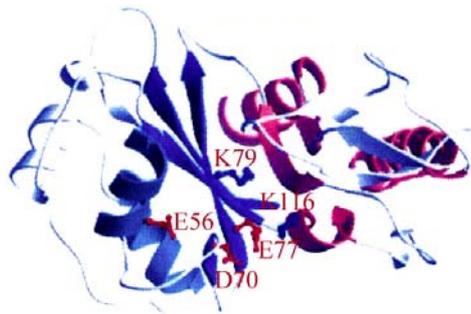


Fig. 5 : Structure de l'endonuclease MutH (d'après Ban et Yang, 1998^b). Les cinq acides amines représentés en rouge (Glu56, Asp70, Glu77, Lys79 et Lys116) sont indispensables à l'activité endonucléasique de MutH (Wu et coll., 2002 ; Junop et coll., 2003).

MutH est une endonucléase de 28 kDa monomérique, Mg^{2+} -dépendante et séquence-spécifique (Welsh et coll., 1987). La structure du cristal de MutH révèle que la protéine est formée de deux sous-unités pouvant pivoter l'une par rapport à l'autre (fig. 5), ce qui permettrait de réguler son activité endonucléasique (Ban et Yang, 1998^b). Le site actif de MutH, localisé à l'interface des deux sous-unités, est formé par l'acide glutamique 56 (E56),

l'acide aspartique 70 (D70), l'acide glutamique 77 (E77), la lysine 79 (K79) localisés dans la sous-unité N-terminale et par la lysine 116 (K116) présente dans la seconde sous-unité.

La protéine MutH clive l'ADN au niveau des séquences d(GATC) non méthylées du brin néosynthétisé (Au et coll., 1992). Cette séquence d(GATC) est méthylée sur l'atome N6 de l'adénine par la Dam méthylase juste après la réplication. Mais pendant une à trois minutes, cette séquence n'est pas méthylée sur le brin néosynthétisé (Campbell et Kleckner, 1990), ce qui permet à MutH de distinguer les deux brins et de cliver en 5' de l'adénine non méthylée du site d(GATC) (Au et coll., 1992 ; Welsh et coll., 1987).

La protéine MutL, complexée à MutS, interagit avec MutH fixée sur son site de clivage et stimule son activité endonucléasique (Hall et Matson, 1999) de façon ATP-dépendante (Ban et Yang, 1998^b ; Sampinato et Modrich, 2000). La mutation en alanine des cinq acides aminés inclus dans le site catalytique (E56, D70, E77, K79 et K116) entraîne une perte de l'activité catalytique en absence ou en présence de MutL, bien que les protéines mutées se fixent sur leur site spécifique (Wu et coll., 2002 ; Junop et coll., 2003). Il n'est pas exclu que cette perte ait pour origine une diminution de l'interaction de MutH avec MutL (Wu et coll., 2002).

Par quel mécanisme le complexe MutS/MutL se déplace-t-il le long de l'ADN pour atteindre le site d(GATC) hémiméthylé le plus proche en 5' ou en 3' du mésappariement, et ce avant que l'adénine ne soit méthylée ? Trois modèles ont été proposés pour répondre à cette question (voir § V 2).

3- Les protéines impliquées dans la réparation après la discrimination du brin néosynthétisé

La coupure du brin néosynthétisé catalysée par MutH serait le premier signe qui dirigerait les protéines impliquées dans la réparation vers le brin non méthylé (Laengle-Rouault et coll., 1986 ; Lahue et coll., 1989). La réparation est possible quelque soit la position du site d(GATC) clivé par rapport au mésappariement/ID (Grilley et coll., 1993 ; Cooper et coll., 1993), mais les processus signalant le site du mésappariement et orientant la réparation ne sont pas compris.

La réparation se fait en trois étapes : dégradation du fragment d'ADN à partir du site d(GATC) clivé vers le site du mésappariement, resynthèse de l'ADN et ligation (fig. 6).

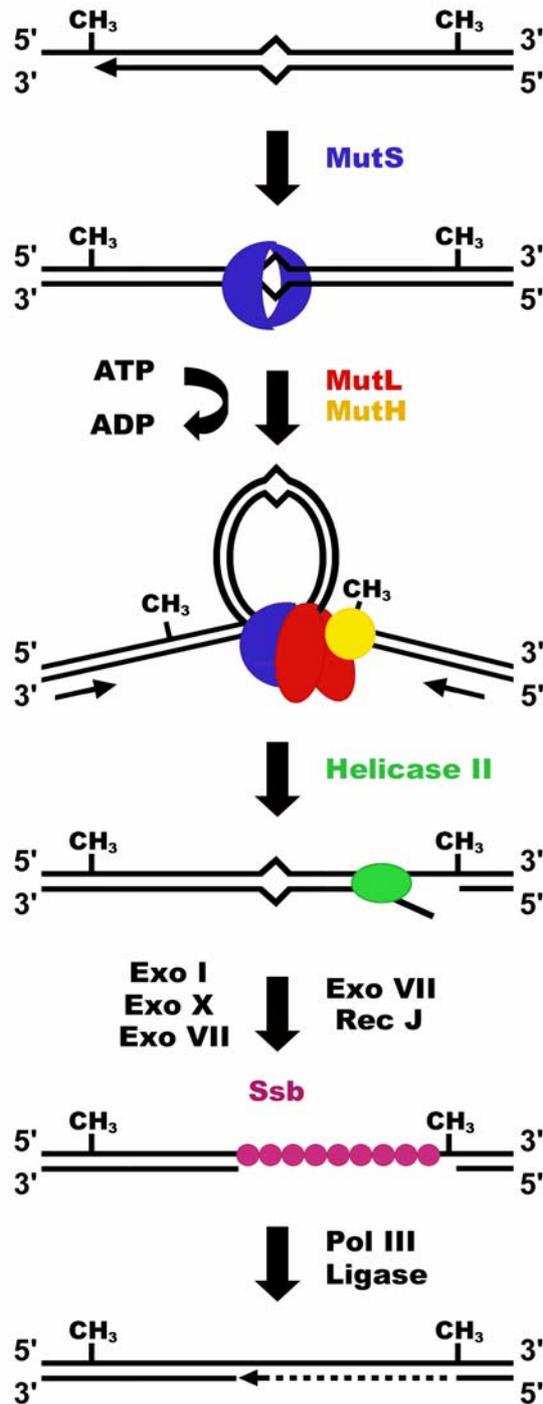


Fig. 6 : Système de réparation des mésappariements chez les procaryotes (adapté de Marti et coll., 2002). Les protéines MutS, MutL et MutH sont respectivement en bleu, rouge et jaune. L'ADN hélicase II est représentée en vert et la protéine Ssb en violet. Les exonucléases ExoI et ExoX dégradent l'ADN dans le sens 3'→5', RecJ dégrade dans le sens 5'→3'et ExoVII peut catalyser la dégradation dans les deux sens.

▫ L'ADN hélicase II (UvrD) est recrutée au niveau de la coupure du brin néosynthétisé en interagissant avec MutL (Hall et coll., 1998 ; Yamaguchi et coll., 1998 ; Mechanic et coll., 2000). MutL stimule l'ouverture de la double hélice catalysée par UvrD (Dao et Modrich,

1998 ; Yamaguchi et coll., 1998 ; Mechanic et coll., 2000). Cependant, cette hélicase possède seulement une activité 3'→5' (Matson, 1986) et ne peut transloquer que sur une distance de 40 à 50 paires de bases (Ali et Lohman, 1997). Il a été proposé que MutL participe à l'ouverture de l'ADN en recrutant en continu des hélicases afin d'empêcher la réhybridation de la double hélice et pourrait aider UvrD à dérouler l'ADN dans la direction 5'→3' (Mechanic et coll., 2000).

▫ Le simple brin néosynthétisé est ensuite dégradé par une ou plusieurs exonucléases. Quatre exonucléases sont impliquées dans le système MMR selon la position de la séquence d(GATC) clivée par rapport au mésappariement. Si cette séquence se trouve du côté 3', le simple brin est dégradé par ExoI, ExoVII ou ExoX (Harris et coll., 1998 ; Viswanathan et Lovett, 1999). ExoVII possède une double activité exonucléasique et intervient aussi dans la dégradation du brin lorsque la coupure se situe en 5' du mésappariement (Lovett et Kolodner, 1989 ; Cooper et coll., 1993). RecJ est la 2^{ème} exonucléase impliquée dans la dégradation du simple brin dans le sens 5'→3' (Lovett et Kolodner, 1989 ; Harris et coll., 1998). Une seule exonucléase suffit à la dégradation du fragment de 1,5 à 2 kB contenant le mésappariement ou l'insertion/délétion (Viswanathan et coll., 2001 ; Su et coll., 1989).

▫ L'étape de resynthèse est assurée par l'ADN polymérase III holoenzyme en présence de la protéine Ssb et la ligation est catalysée par l'ADN ligase (pour revue, Harfe et Jinks-Robertson, 2000 ; Hsieh, 2001 ; Marti et coll., 2002). Le recrutement spécifique de l'ADN polymérase III serait relié au fait que la sous-unité β de cette polymérase interagit avec MutS (Lopez de Saro et O'Donnell, 2001). Cette sous-unité est un facteur de processivité qui permet d'augmenter la fidélité de la synthèse catalysée par pol III. Cette interaction permet de relier le système MMR à la réplication.

IV Le système eucaryote de réparation des mésappariements

Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs protéines homologues de MutS (protéines MSH pour MutS Homologs) et MutL (protéines MLH (MutL Homologs) et PMS (Post-Meiotic Segregation)), ce qui augmente la complexité du système mismatch repair. Ces

protéines interagissent avec des protéines impliquées dans d'autres systèmes de réparation de l'ADN (voir chap. II) et interviennent dans la recombinaison et la méiose.

Des expériences biochimiques ont montré que des extraits de cellules HeLa corrigent les substrats portant un des huit mésappariements avec des degrés d'efficacité et de spécificité similaires à ceux observés chez *E. coli* (Holmes et coll., 1990 ; Thomas et coll., 1991). Ces cellules réparent faiblement les mésappariements C/C non réparés chez *E. coli*. Le mésappariement G/T est le mieux réparé. Les mésappariements A/C, C/T et A/G sont réparés efficacement tandis que les mésappariements G/G, A/A et T/T sont plus ou moins bien réparés en fonction de la séquence qui les entourent (Brown et Jiricny, 1988 ; Holmes et coll., 1990). La reconnaissance des mésappariements est influencée par la séquence des bases *in vitro* et *in vivo* (Palombo et coll., 1996 ; Marsischky et Kolodner, 1999). Une cassure simple brin suffit à diriger la réparation, qu'elle soit située en 3' ou en 5' du mésappariement ou de l'insertion/délétion (Fang et Modrich, 1993). Les huit mésappariements et les petites insertions/délétions (ID) entraînent l'excision d'un fragment d'ADN qui démarre au point de coupure et s'arrête 90-170 nucléotides après le mésappariement (pour revue, Modrich, 1997).

Ces résultats suggèrent que le fonctionnement du système mismatch repair eucaryote est similaire à celui du système procaryote (Modrich, 1997).

1- Les protéines homologues de MutS

Six protéines homologues de MutS ont été caractérisées chez l'homme et la levure.

- Les protéines MSH2 (Fishel et coll., 1993), MSH3 (Habraken et coll., 1996 ; Risinger et coll., 1996) et MSH6 (Hughes et Jiricny, 1992 ; Palombo et coll., 1995) forment des hétérodimères essentiels à la réparation post-réplivative (Umar et coll., 1998). MutS α , un hétérodimère MSH2/MSH6, reconnaît et répare efficacement les mésappariements et les insertions/délétions de 1-2 nucléotides (Drummond et coll., 1995 ; Alani, 1996 ; Iaccarino et coll., 1996) tandis que MutS β (MSH2/MSH3) reconnaît et médie la réparation des insertions/délétions de deux à huit nucléotides (New et coll., 1993 ; Habraken et coll., 1996 ; Palombo et coll., 1996 ; Risinger et coll., 1996). L'affinité de MutS α pour les mésappariements est influencée par la séquence (Marsischky et Kolodner, 1999).
- hMSH4 et hMSH5 forment un hétérodimère spécifique qui intervient au cours de la méiose et a un rôle dans la recombinaison et la ségrégation chromosomique (Ross-Macdonald et Roeder, 1994 ; Hollingsworth et coll., 1995). Ce dimère promouvoit l'appariement de

fragments d'ADN homologues et le crossing-over pendant la méiose (Nagawaga et coll., 1999). Les protéines hMSH4 et hMSH5 sont fortement exprimées dans les tissus testiculaires et ovariens (Paquis-Fluckinger et coll., 1997 ; Her et Doggett, 1998 ; Winand et coll., 1998). Elles ont perdu une grande partie de leur domaine N-terminal et n'ont pas de rôle dans la réparation des mésappariements et des ID, ce qui confirme le rôle clé du domaine I dans la reconnaissance des mésappariements (Obmolova et coll., 2000).

▫ hMSH1 est le seul homologue localisé dans les mitochondries (Reenan et Kolodner, 1992). Cette protéine présente 25% d'homologie avec MutS et possède une région de 68 acides aminés en plus par rapport à hMSH2, qui lui permettrait de traverser les deux membranes mitochondriales. Tous les homologues eucaryotes de MutS fonctionnant sous forme dimérique, on suppose que MSH1 agit sous une forme homodimérique dans la mitochondrie (Reenan et Kolodner, 1992).

Les études biochimiques sur les protéines MutS α et MutS β mutées suggèrent que MSH6 utilise un motif phénylalanine-X-acide glutamique présent dans le domaine N-terminal pour interagir spécifiquement avec le mésappariement, ainsi que le fait MutS, tandis que MSH3 semble utiliser un motif contenant une lysine et une arginine pour contacter le squelette phosphodiester de l'ADN (fig. 7).

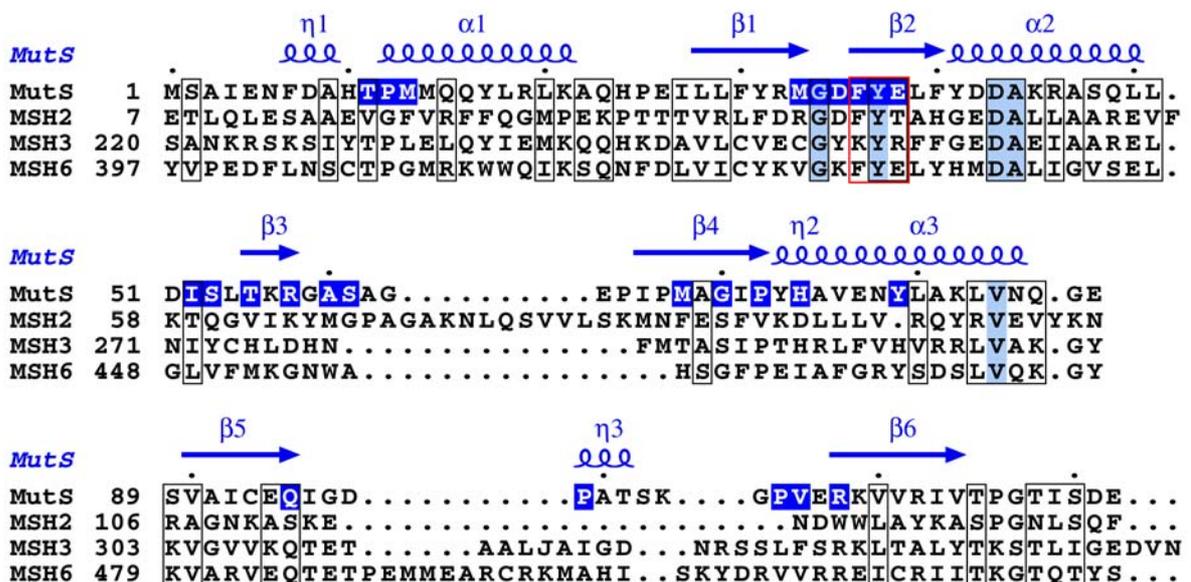


Fig. 7 : Alignement des séquences primaires de la partie N-terminale des protéines MutS d'*E. coli*, de hMSH2, hMSH3 et de hMSH6 impliquée dans la reconnaissance du mésappariement (adaptée de Lamers et coll., 2000). Les résidus aminés impliqués dans la reconnaissance spécifique du mésappariement sont le motif Phe-X-Glu entouré en rouge (qui a disparu chez hMSH3) et le feuillet $\beta 4$.

Ces différences pourraient être à l'origine de la reconnaissance spécifique des mésappariements et des petites ID par MutS α alors que MutS β reconnaît préférentiellement les boucles dues à une insertion/délétion de plus de deux nucléotides (pour revue, Hsieh, 2001). D'autres études biochimiques et génétiques montrent que le site de fixation des nucléotides et le motif HTH (hélice-tour-hélice impliqué dans la dimérisation des monomères sont présents dans le domaine C-terminal des homologues eucaryotes de MutS (Alani, 1996 ; Alani et coll., 1997).

Les études structurales sur MutS d'*E. coli* et de *Taq*, les études génétiques sur les mutants *msh* et les analyses biochimiques avec des protéines MutS α et MutS β mutées permettent de penser que MSH3 et MSH6 correspondent au monomère de MutS bactérien impliqué dans la fixation de l'ADN et de l'ATP, alors que MSH2 assurerait le rôle du monomère impliqué dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique (Bowers et coll., 1999 ; Dufner et coll., 2000).

2- Les protéines eucaryotes impliquées dans la discrimination de brin

La discrimination de brin chez les procaryotes nécessite les protéines MutL et MutH. Si des homologues de MutL ont été caractérisés chez les eucaryotes, aucun homologue de MutH n'a été découvert. Le mécanisme permettant au système MMR eucaryote de déterminer le brin néosynthétisé du brin parental n'est toujours pas compris.

a) Les protéines homologues de MutL

Quatre homologues de la protéine MutL bactérienne ont été caractérisés chez l'homme : hMLH1 (Bronner et coll., 1994), hMLH3 (Lipkin et coll., 2000), hPMS1 et hPMS2 (Nicolaïdes et coll., 1994). Comme pour les homologues de MutS, les homologues de MutL sont sous forme hétérodimérique (Wang et coll., 1999^a). PMS1, PMS2 et MLH3 contiennent une région de 36 acides aminés homologue qui interagit avec le même domaine de MLH1 (Kondo et coll., 2001).

MutL α , formé par MLH1 et PMS2 (Prolla et coll., 1994^a) se fixe sur MutS α et MutS β (Prolla et coll., 1994^b ; Flores-Rozas et Kolodner, 1998). Il interagit aussi avec MSH2 lorsque MSH2 est fixé à l'ADN double brin. Cette interaction est plus forte si l'ADN contient un mésappariement et nécessite un ADN double brin de plus de 38 paires de bases (Prolla et coll., 1994^b). MutL α augmente l'affinité de MutS α pour les mésappariements et de MutS β

pour les ID (Habraken et coll., 1997, 1998). La formation du complexe ternaire MutL α /MutS α /ADN est dépendante de l'ATP, ce qui n'est pas le cas du complexe MutL α /MutS β /ADN (Habraken et coll., 1998). Hall et coll. (2002) proposent que l'ATP se fixe à MLH1, provoquant une cascade d'évènements, dont l'hydrolyse de l'ATP, qui permettent la fixation d'une molécule d'ATP sur PMS1 (homologue de hPMS2 chez la levure) et la fixation de MutL α sur le complexe nucléoprotéique MutS α ou β /ADN pour déclencher la réparation.

Le rôle de hMutL β (hMLH1/hPMS1) et de hMLH1/hMLH3 n'est pas encore clairement élucidé (pour revue, Marti et coll., 2002). Il semble que la réparation par le système MMR dépende essentiellement de hMutL α (Harfe et coll., 2000) dont la concentration cellulaire prédomine sur celle de hMutL β (Räschle et coll., 1999).

La plus grande homologie entre MutL bactérien et eucaryote se trouve dans la région N-terminale, au niveau du motif GHL (glycine-histidine-lysine) caractéristique de la famille des ATPases. Si une mutation touche cette région, la fonction du système MMR est abolie (Pang et coll., 1997). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, une mutation touchant l'asparagine Asn 35 ou l'acide glutamique Glu 31 de MHL1 et Asn 65 ou Glu 61 de PMS1 sont critiques pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP et inhibe la réparation des mésappariements *in vivo* (Tran et Liskay, 2000). La fixation de l'ATP par MutL α induit des changements de conformation de la protéine qui pourrait aider à la coordination des événements ultérieurs (Tran et Liskay, 2000).

b) Les hypothèses sur le processus de discrimination de brin

Le mécanisme de discrimination du brin néosynthétisé reste incompris et ne passe sans doute pas par la méthylation. En effet, l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster* est peu ou pas méthylé après la réplication (Proffit et coll., 1984 ; Urieli-Shoval et coll., 1982). Chez les plantes et vertébrés, il existe un système de méthylation sur les C des motifs CG et CXG éparpillés sur l'ADN (îlots CG). Mais c'est une méthylation irrégulière qui ne s'applique pas à tous les îlots (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998).

Comme chez *E. coli*, la réparation est bidirectionnelle dans les cellules eucaryotes (Fang et Modrich, 1993). Le signal de discrimination de brin peut donc être détecté aussi bien en 5' qu'en 3' du mésappariement. La présence d'une cassure simple brin provoque l'excision d'un fragment d'ADN partant de la coupure vers le mésappariement (Holmes et coll., 1990 ; Thomas et coll., 1991 ; Fang et Modrich, 1993). Le signal de discrimination pourrait venir de brèches présentes dans le brin néosynthétisé générées par l'ADN polymérase pendant la réplication (Jiricny, 1998).

Les interactions entre les protéines du système MMR et la polymérase impliquée dans la réplication pourraient être à l'origine de la discrimination de brin. La visualisation des protéines hMSH3 et hMSH6 co-localisées avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et des fragments d'ADN néosynthétisés suggèrent que le système MMR interagit avec le système de réplication (Kleczkowska et coll., 2001). Or la protéine PCNA est un facteur de processivité qui permet l'ancrage des ADN polymérases δ et ϵ sur l'ADN et l'aide à synthétiser l'ADN de façon continue (Hingorani et O'Donnell, 2000). PCNA interagit physiquement avec hMSH3 et hMSH6 (Clark et coll., 2000 ; Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001). Kolodner et coll. montrent chez *S. cerevisiae* que la réparation des mésappariements par le système MMR est moins efficace lorsque l'interaction entre PCNA et MSH3 et MSH6 est abolie (Lau et coll., 2002). De plus, le facteur p21^{waf1} qui se fixe sur PCNA inhibe l'excision induite par le mésappariement ainsi que la réplication de l'ADN (Waga et Stillman, 1994 ; Modrich, 1997). Ces résultats suggèrent que PCNA serait impliquée dans la discrimination de brin en permettant les interactions entre le système MMR et le système de réplication et/ou pourrait être à l'origine des cassures simple brin permettant l'excision du fragment d'ADN.

Il faut noter que PCNA est un facteur très important dans la réparation des mésappariements chez les eucaryotes car il intervient à différentes étapes du système MMR dont l'étape de reconnaissance (voir § suivant).

3- Les protéines eucaryotes impliquées dans la réparation des mésappariements après la discrimination de brin

Les protéines eucaryotes intervenant dans les étapes de dégradation et de resynthèse du brin d'ADN néosynthétisé ne sont pas toutes caractérisées.

- Chez *E. coli* interviennent l'ADN hélicase II et les exonucléases pour dégrader le simple brin d'ADN. Jusqu'à maintenant, aucune hélicase n'a été caractérisée chez les eucaryotes.
- Deux exonucléases 5'→3' sont impliquées dans le système MMR eucaryote. L'exonucléase hEXO1 interagit avec hMSH2 (Schmutte et coll., 1998 ; Tishkoff et coll., 1998) ainsi qu'avec hMSH3, hMLH1 et hMutL α (Schmutte et coll., 2001 ; Amin et coll., 2001). Bien que hEXO1 ait une polarité 5'→3', l'exonucléase participe à l'excision du brin néosynthétisé débutant sur une cassure simple brin localisée aussi bien en 5' qu'en 3' du mésappariement. Dans les deux cas, l'excision requiert MutS α et MutL α (Genschel et coll., 2002). L'inactivation du gène

exoI provoque une faible augmentation du taux de mutations, ce qui suggère que d'autres exonucléases sont impliquées dans le système MMR, comme chez *E. coli* (Tishkoff et coll., 1997). Ainsi une seconde exonucléase FEN-1 (homologue de RTH1/Rad27 chez *Saccharomyces cerevisiae*) intervient dans le système MMR (Tishkoff et coll., 1997 ; Xie et coll., 2001). La dégradation des simples brins dans le sens 3'→5' serait catalysée par l'activité exonucléasique des polymérases δ et ϵ . Ces protéines seraient donc requises pour l'excision et la resynthèse (Longley et coll., 1997 ; Tran et coll., 1999).

- L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des ADN polymérases α , δ et ϵ a montré que ces trois polymérases sont impliquées dans le MMR, pol α ayant un rôle majoritaire dans la resynthèse de l'ADN (Thomas et coll., 1991).

- La ligation serait peut-être catalysée par l'ADN ligase I car cette protéine peut se complexer avec pol δ (Hughes et coll., 1999) et PCNA (Montecucco et coll., 1998) mais aucune preuve de sa participation dans le système MMR n'a été apportée.

4- Les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements

Trois protéines accessoires interviennent dans le système MMR eucaryote.

- De même que chez *E. coli*, la protéine hRPA (human Replication Protein A) est impliquée dans la réparation des mésappariements (Umezū et coll., 1998 ; Lin et coll., 1998). Cette protéine a plusieurs rôles pendant la réparation de l'ADN. Elle se fixe sur l'ADN simple brin pour le stabiliser et le protéger de la dégradation nucléasique. Elle est impliquée dans l'excision dirigée par le mésappariement et la coupure simple brin, elle stimule l'ADN polymérase α et participe à la resynthèse de l'ADN et à la ligation (Ramilo et coll., 2002).

- Le facteur de réplication RFC intervient dans le MMR en recrutant le facteur PCNA sur l'ADN dans un processus ATP-dépendant (Kolodner et Marsischky, 1999).

- PCNA est un facteur auxiliaire des ADN polymérases δ et ϵ (Bravo et Macdonald-Bravo, 1987 ; Lee et Hurwitz, 1990 ; Eissenberg et coll., 1997), nécessaire à la réplication de l'ADN. Ce facteur est important dans le fonctionnement du système mismatch repair eucaryote. Il serait à l'origine du signal de discrimination de brin, bien que cette étape ne soit pas comprise. PCNA intervient à différentes étapes de la réparation de l'ADN par le système MMR. Il est requis dans les premières étapes du système MMR et dans la resynthèse de l'ADN (Umar et coll., 1996 ; Gu et coll., 1998).

PCNA semble avoir un double rôle pendant la phase d'initiation du système MMR. Dans un premier temps, il participe à la reconnaissance du mésappariement ou de l'insertion/délétion. En effet, il augmente la reconnaissance spécifique du mésappariement/ID en interagissant avec MutS α et MutS β *via* MSH3 et MSH6 (Habraken et coll., 1997, 1998 ; Clark et coll., 2000, Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001). Les mutations de PCNA, MSH3 ou MSH6, qui abolissent les interactions entre PCNA et MutS α ou MutS β , provoquent un défaut partiel *in vivo* du système MMR (Clark et coll., 2000, Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001 ; Lau et coll., 2002). De plus, PCNA/MutS α forme un complexe stable non spécifique sur l'ADN homoduplexe. Si MutS α détecte un mésappariement, PCNA est exclu du complexe ternaire (Lau et Kolodner, 2003). Dans un second temps, PCNA interagit avec hMLH1 (Umar et coll., 1996) et déstabilise le complexe ternaire MutS α /MutL α /ADN pour provoquer le départ de MutS α /MutL α du mésappariement (Bowers et coll., 2001).

Le facteur PCNA participe à l'étape de resynthèse de l'ADN en interagissant avec les protéines du système de réplication (Gu et coll., 1998).

V Le rôle de l'ATP dans les étapes de reconnaissance et de discrimination de brin chez les procaryotes et les eucaryotes

La formation d'un complexe comprenant les protéines MutS et MutL semble coordonner les événements en aval de la reconnaissance du mésappariement ou de l'insertion/délétion par MutS. Cette étape est contrôlée par la fixation de l'ATP et l'activité ATPasique de MutS et de MutL. Le mécanisme ATP-dépendant permettant le mouvement du complexe MutS/MutL pour signaler la présence du mésappariement et déclencher la réparation est mal compris.

Trois modèles tentent d'expliquer le phénomène de la translocation en s'appuyant sur les effets de l'ATP et de l'ADP sur la conformation des protéines MutS et MutL procaryotes et eucaryotes et sur la stabilité des complexes MutS/ADN contenant un mésappariement ou une ID et des complexes nucléoprotéiques MutS/MutL/ADN.

1- Effets de l'ATP et de l'ADP sur la conformation et les propriétés biochimiques des protéines MutS et MutL et de leurs homologues eucaryotes

a) Effets de l'ATP et de l'ADP sur MutS et ses homologues eucaryotes

Pour les protéines MutS et ses homologues eucaryotes, le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP est conservé à plus de 80% (Fishel et Wilson, 1997).

Les données cristallographiques sur MutS ont permis de localiser ce site ATPasique dans le domaine V, au niveau de la région d'interface des deux monomères (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000, Junop et coll., 2001). Elles ont confirmé la présence dans chaque monomère de quatre motifs N₁, N₂, N₃ et N₃' caractéristiques de la superfamille des ATPases ABC (fig. 8).

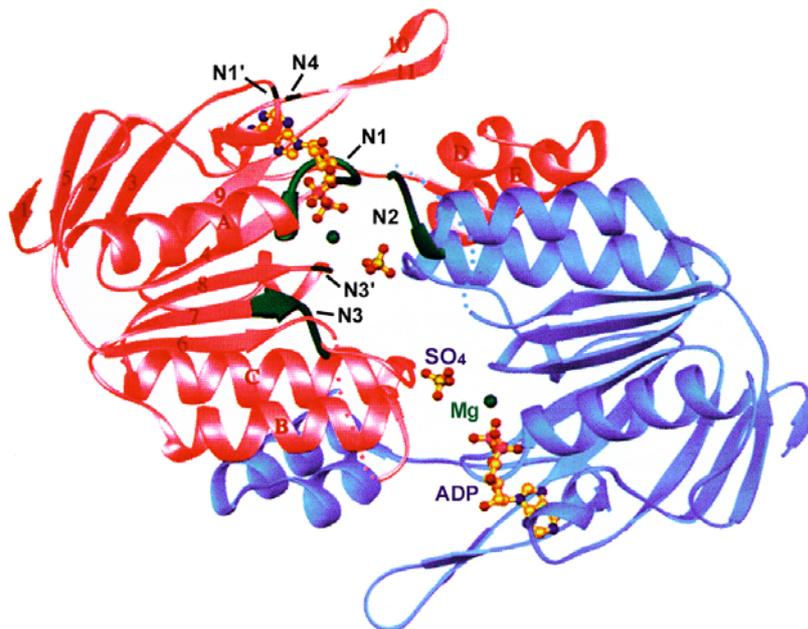


Fig. 8 : Structure de l'interface des domaines V de MutS de *Thermus aquaticus* formant le domaine ATPasique en présence d'ADP (d'après Junop et coll., 2001). Le domaine V de la sous-unité interagissant spécifiquement avec l'ADN est coloré en rouge. Les motifs intervenant dans la fixation de l'ADP sont en noir, le Mg²⁺ en vert et l'ADP en jaune.

- le motif N₁ (GPNXGGKS, résidus 614 à 621 chez *E. coli*) est un motif de type Walker A contenant une boucle P responsable de la fixation du nucléotide.
- le motif N₂ (ST, résidus 668-669) a un rôle dans l'hydrolyse de l'ATP en interagissant avec le γ -phosphate de l'ATP.

- le motif N₃ (DE, résidus 693-694) possède un motif Walker B qui est le site de fixation d'un ion Mg²⁺ et participe à la catalyse de l'ATP.

- le motif N₃' (TH, résidus 727-728) intervient dans la fixation de l'ATP.

Deux autres motifs conservés N₁' (FIA, résidus 596-598) et N₄ (H, résidu 760) sont impliqués dans la stabilisation de l'adénine de l'ADP (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000 ; Junop et coll., 2001).

Le site ATPasique de MutS est formé à l'interface des deux domaines V lors de la dimérisation de la protéine. La protéine MutS d'*E. coli* ne fixe qu'une seule molécule d'ADP. Cinq des six motifs du site actif (N₁, N₁', N₃, N₃' et N₄) viennent d'un monomère tandis que le motif N₂ appartient au monomère opposé. Cette caractéristique renforce l'asymétrie structurale et fonctionnelle de MutS. En effet, ces cinq motifs N₁, N₁', N₃, N₃' et N₄ appartiennent au monomère contenant la phénylalanine impliquée dans la fixation spécifique avec l'ADN.

La fixation d'une molécule d'ADP par MutS provoque de faibles changements de conformation du site de fixation du nucléotide (0.4 Å), qui se propagent et s'amplifient grâce aux domaines II et III et induisent un changement de conformation plus important du domaine de fixation de l'ADN (2.5 Å). De plus, la fixation de l'ADP augmente la mobilité des domaines I et IV (Hsieh, 2001 ; Junop et coll., 2001). Le complexe ternaire MutS/ADN/ATP n'a pas pu être cristallisé du fait de l'hydrolyse de l'ATP. L'utilisation d'analogues non hydrolysables de l'ATP n'a pas permis de résoudre ce problème, car l'ATPγS (adénosine 5'-O-thiotriphosphate) est hydrolysé pendant la cristallisation tandis que l'AMPPNP est légèrement contaminé par de l'ADP (Junop et coll., 2001).

Plusieurs études de mutagenèse du site ATPasique ont été réalisées sur MutS bactérienne pour comprendre le rôle de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP par MutS (Haber et Walker, 1991 ; Worth et coll., 1998 ; Junop et coll., 2001). Une mutation touchant le motif Walker B provoque une diminution de la fixation du Mg²⁺ et de l'hydrolyse de l'ATP (Junop et coll., 2001) tandis que l'inactivation par mutation de la fixation de l'ATP confère un défaut du système MMR *in vivo* (Haber et Walker, 1991 ; Wu et Marinus, 1994). Il semble en fait que l'activité ATPasique de MutS soit essentielle à l'activation de MutH, ce qui explique que l'inactivation de l'hydrolyse de l'ATP par MutS aboutisse à un défaut de la réparation des hétéroduplexes (Junop et coll., 2003).

Le recrutement de MutL par le complexe MutS/ADN contenant un mésappariement dépend de la fixation de l'ATP par MutS mais pas de l'hydrolyse du nucléotide par MutS (Grilley et coll., 1989 ; Joshi et coll., 2000).

On retrouve quelques résultats similaires issus des études avec les protéines eucaryotes homologues de MutS. La fixation d'une molécule d'ATP par hMutS α provoque un changement de conformation de la protéine (Iaccarino et coll., 2000). L'inhibition de l'activité ATPasique de MutS α aboutit à une inhibition de l'efficacité de la réparation des hétéroduplexes dans les cellules eucaryotes (Alani et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1998 ; Drotschmann et coll., 1999 ; Das Gupta et Kolodner, 2000), plus importante si la mutation touche le domaine V de MSH6 que le domaine V de MSH2 ou MSH3 (Iaccarino et coll., 2000).

b) Effets de l'ATP sur MutL

Comme MutS, la protéine MutL est une protéine homodimérique régulée par des cycles de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (Ban et coll., 1999). La fonction exacte de MutL au sein du système MMR, ainsi que le rôle de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP par MutL reste peu clair (pour revue, Yang, 2000).

MutL se dimérise en présence d'ATP et possède une faible activité ATPasique (Ban et coll., 1999 ; Ban et Yang, 1998^a). L'analogue non hydrolysable de l'ATP, l'AMPPNP, induit aussi le changement de conformation de MutL et semble stabiliser la protéine qui ne s'agrège plus en solution (Ban et Yang, 1998^a). La fixation de MutL à l'ADN ne semble pas être influencée par la présence d'ATP alors que cette interaction nucléoprotéique stimule l'activité ATPasique de la protéine (Ban et coll., 1999), nécessaire à la formation du complexe ternaire MutS/MutL/ADN (Galio et coll., 1999).

MutL seule peut activer l'activité endonucléasique de MutH d'une façon ATP-dépendante mais le clivage de la séquence d(GATC) par l'endonucléase est stimulé lors du rajout de la protéine MutS (Ban et Yang, 1998^a). Les mutants de MutL pouvant fixer l'ATP mais présentant un défaut de l'hydrolyse du nucléotide ne peuvent plus activer MutH, même après addition de MutS (Junop et coll., 2003). Ces résultats confirment que l'activité ATPasique de MutL est essentielle à l'activation mésappariement-dépendante de MutH *via* MutS (Spampinato et Modrich, 2000 ; Junop et coll., 2003).

Quelques résultats similaires sont trouvés avec les protéines eucaryotes. Ainsi MutL α possède une faible activité ATPasique et change de conformation lorsqu'elle fixe une

molécule d'ATP (Tran et Liskay, 2000). hMLH1 et hPMS2, les deux monomères de hMutL α , possèdent chacun une faible activité ATPasique (Guarne et coll., 2001 ; Hall et coll., 2002). L'inhibition de cette activité par mutation de l'une ou l'autre des deux sous-unités de hMutL α provoquent une réduction de l'efficacité de la réparation *in vitro* (Räschle et coll., 2002). Jiricny et coll. proposent que l'interaction entre hMutL α (fixée sur le complexe hMutS α /ADN) et les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que PCNA ou EXO1 (Bowers et coll., 2001 ; Amin et coll., 2001) nécessiterait que hMutL α hydrolyse l'ATP pour déclencher la réparation (Räschle et coll., 2002).

2- Les modèles proposés

Trois modèles sont proposés pour expliquer le déplacement de MutS et les interactions protéine/protéine ultérieures aboutissant au déclenchement de la réparation. Deux modèles impliquent le mouvement de la protéine MutS et de ses homologues eucaryotes le long de la double hélice pour déclencher la réparation tandis que le troisième modèle propose que le complexe MutS/MutL reste à proximité du mésappariement.

a) Le modèle de translocation

La présence d'ATP réduit l'affinité de MutS et MutS α pour le mésappariement (Allen et coll., 1997 ; Blackwell et coll., 1998 ; Iaccarino et coll., 1996, 1998 ; Gradia et coll., 1999) et conduit à la dissociation de la protéine du mésappariement (Grilley et coll., 1989 ; Allen et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1996 ; Blackwell et coll., 1998 ; Gradia et coll., 1997). L'analogue non hydrolysable ATP γ S peut provoquer le départ de MutS et de ses homologues eucaryotes, ce qui suggère que la fixation de l'ATP suffit à cette étape (Allen et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1996 ; Blackwell et coll., 1998 ; Gradia et coll., 1999).

Les analyses par microscopie électronique permettent l'observation de structures d'ADN hétéroduplexe en forme de boucles Ω en présence de MutS, MutL et d'ATP, la taille de ces boucles augmentant en fonction du temps (fig. 9) (Allen et coll., 1997). La dissociation du mésappariement de la protéine MutS en présence d'ATP est associée à un mouvement de la protéine le long de la double hélice. Ceci est confirmé par les analyses biochimiques de l'effet de l'ATP sur l'interaction de MutS avec des hétéroduplexes dont les extrémités sont bloquées par un complexe Streptavidine/Biotine. Dans ces conditions, MutS et MutS α restent complexées à l'ADN en présence d'ATP (Blackwell et coll., 1998, 2001 ; Gradia et coll.,

1999 ; Iaccarino et coll., 2000). MutS seule en présence d'ATP suffit à la formation des boucles Ω mais l'ajout de protéine MutL stimule la formation et la croissance de ces structures. Ces deux protéines, révélées par l'utilisation d'anticorps anti-MutS et anti-MutL, sont sous forme dimérique. Elles sont situées proches l'une de l'autre et à la base de ces boucles. La présence d'un mésappariement déclenche la formation d'une boucle dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (un homoduplexe ou un duplexe contenant un mésappariement C/C, non reconnu spécifiquement par MutS, ne déclenchent pas ce processus). Le mésappariement reste à l'intérieur de la boucle dans la majorité des boucles observées (Allen et coll., 1997).

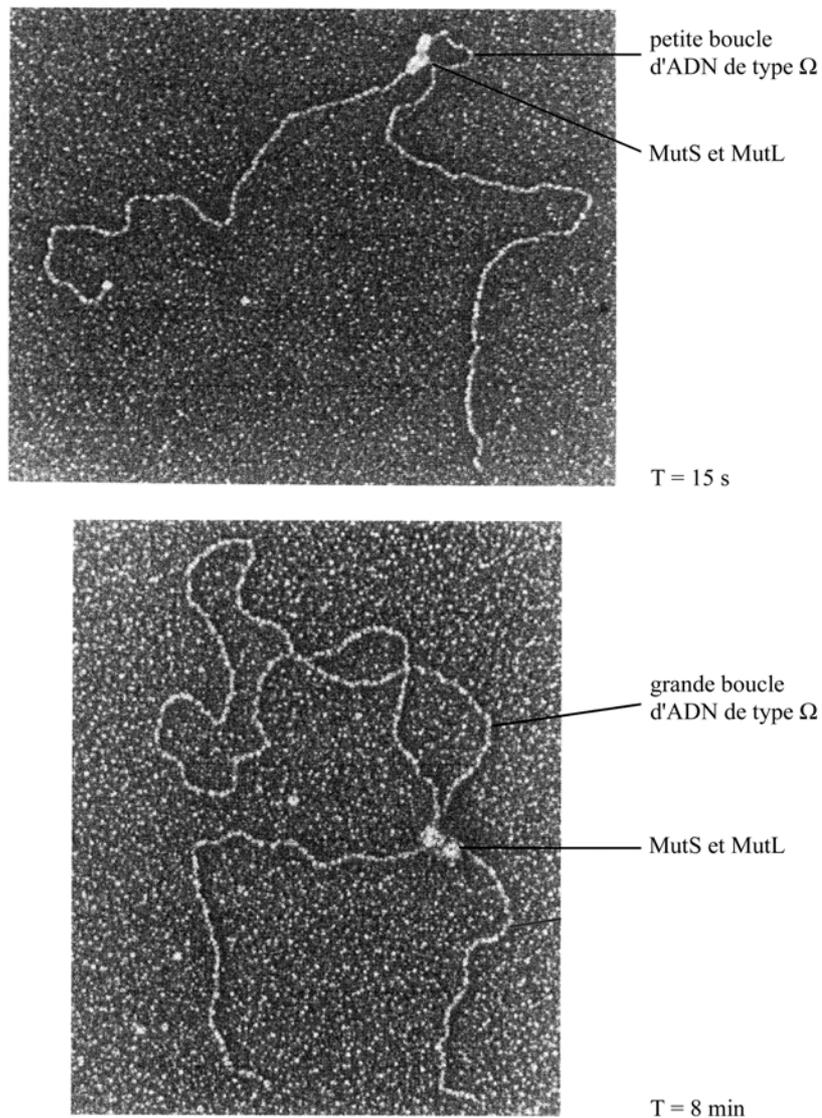


Fig. 9 : Observation au microscope électronique de boucles d'ADN contenant un mésappariement G/T, à la base du modèle de translocation de la protéine MutS en présence de MutS, de MutL et d'ATP (d'après Allen et coll., 1997). La présence des dimères de MutS et de MutL à la base de la boucle Ω a été révélée au moyen d'anticorps anti-MutS et anti-MutL. La taille des boucles augmente en fonction du temps.

La présence d'ATP γ S ne permet pas la formation des boucles tandis qu'un excès d'AMPPNP provoque le blocage de la croissance de la boucle. Ces résultats suggèrent que le mouvement de la protéine le long de l'hélice nécessite l'hydrolyse de l'ATP qui fournirait l'énergie nécessaire à la translocation (Allen et coll., 1997 ; Blackwell et coll., 1998).

Dans le modèle proposé par P. Modrich et son équipe, MutS et MutS α n'ont pas besoin d'ADP pour reconnaître un mésappariement. La fixation de l'ATP sur la protéine déclenche la dissociation de MutS ou MutS α du mésappariement et l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie pour la translocation. La formation d'une boucle Ω serait un moyen simple pour permettre à la protéine de scanner l'ADN dans les deux sens afin de chercher le signal de discrimination de brin et déclencher la réparation (fig. 10).

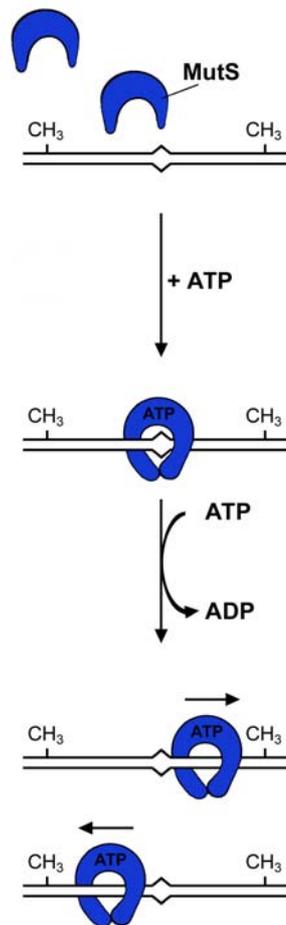


Fig. 10 : Modèle de translocation (d'après Allen et coll., 1997). La reconnaissance du mésappariement par MutS entraîne la fixation d'une molécule d'ATP par la protéine, ce qui induit un changement de conformation de la protéine et déclenche la formation d'une boucle d'ADN de type Ω . La protéine migre le long de la double hélice d'ADN à la recherche du site d(GATC) hémiméthylé le plus proche dans un mouvement nécessitant l'hydrolyse de l'ATP.

Il faut noter que l'ADP ne semble pas avoir le même rôle lorsque le nucléotide se fixe à MutS d'*E. coli* ou MutS α . En effet, la présence d'ADP a un faible effet négatif sur l'affinité de MutS α pour le mésappariement (Habraken et coll., 1998 ; Blackwell et coll., 1998) et promouvoit la dissociation du complexe hMutS α /hétéroduplexe (Blackwell et coll., 1998) tandis que l'ADP augmente la spécificité de la protéine MutS en réduisant l'interaction non spécifique avec l'ADN homoduplexe (Blackwell et coll., 2001). De plus, les plus fortes spécificités de MutS pour un hétéroduplexe sont observées en absence de nucléotide ou en présence d'ADP. Ces résultats suggèrent que MutS possède différents types d'interactions avec l'ADN, modulés par la fixation des différents nucléotides et par l'hydrolyse de l'ATP par l'une et/ou l'autre des deux sous-unités (Blackwell et coll., 2001). Les récents travaux de l'équipe de T. Sixma confirment l'hypothèse d'une telle modulation en démontrant que les deux sites ATPasiques chimiquement identiques de MutS possèdent une affinité différente pour l'ADP et sont impliqués chacun à leur tour dans l'hydrolyse de l'ATP, même en absence d'ADN (Lamers et coll., 2003).

b) Le modèle de diffusion passive ou "sliding clamp"

Dans ce modèle (fig. 11), les homologues eucaryotes de MutS agissent comme un "interrupteur" grâce à leurs changements de conformation régulés par un cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (Gradia et coll., 1997, 1999 ; Berardini et coll., 2000). MutS α sous forme ADP reconnaît un mésappariement avec une grande affinité. La fixation de la protéine sur le mésappariement induit l'échange ADP \rightarrow ATP (Gradia et coll., 1997, 1999) et la fixation de l'ATP sur MutS α provoque la dissociation du complexe protéine/hétéroduplexe (Gradia et coll., 1997, 1999).

Les analyses biochimiques démontrent que le mésappariement ou l'ID (jusqu'à quatre nucléotides) stimulent l'activité ATPasique (Gradia et coll., 1997, 1999 ; Blackwell et coll., 1998 ; Wilson et coll., 1999). Cependant, la présence d'un complexe Streptavidine/Biotine à chaque extrémité d'un hétéroduplexe empêche le départ de hMutS α en présence d'ATP et inhibe l'activité ATPasique de la protéine (Gradia et coll., 1999). Ces résultats suggèrent que l'hydrolyse de l'ATP n'intervient pas dans le départ de hMutS α du mésappariement (Gradia et coll., 1999).

L'échange ADP \rightarrow ATP induit le changement de la conformation de la protéine hMutS α permettant la formation de pinces qui vont encercler l'ADN. Cette nouvelle conformation fait chuter l'affinité de hMutS α pour l'hétéroduplexe, ce qui permet la diffusion passive de la protéine le long de l'ADN (Gradia et coll., 1999). Le recrutement de plusieurs protéines

hMutSα sur le mésappariement et leur diffusion dans les deux directions vont signaler la présence du mésappariement et activer les ADN polymérases et exonucléases impliquées dans la réparation (Gradia et coll., 1997, 1999).

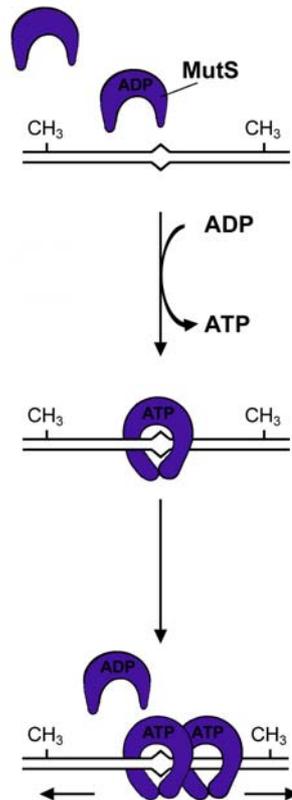


Fig. 11 : Modèle de “sliding clamp” (d’après Fishel, 1998). La protéine MutS sous forme ADP va se fixer sur le mésappariement, ce qui provoque l’échange ADP→ATP. La fixation d’ATP provoque un changement de conformation de la protéine qui peut diffuser le long de l’ADN. Le départ de MutS du mésappariement permet le recrutement d’autres protéines. Dans ce modèle, l’hydrolyse de l’ATP par MutS n’intervient que pour le recyclage de la protéine.

Dans ce modèle, l’hydrolyse de l’ATP n’est pas requise pour fournir de l’énergie au mouvement de hMutSα quittant le mésappariement mais permet de redonner une protéine libre (sous forme ADP) qui pourra se fixer de nouveau sur un mésappariement (Gradia et coll., 1997, 1999 ; Fishel, 1998).

c) Le troisième modèle

L’équipe de P. Hsieh et de W. Yang propose que MutS reste à proximité du mésappariement pour déclencher la réparation. Cette conclusion est basée sur deux faits :

- L'activité ATPasique et la reconnaissance du mésappariement sont deux activités qui semblent indissociables l'une de l'autre. La fixation de l'ADN sur MutS stimule l'échange ADP→ATP (Bjornson et coll., 2000) alors que la fixation de l'ATP réduit l'affinité de MutS pour un hétéroduplexe. Il a été montré que MutL stabilise le complexe MutS/hétéroduplexe en présence d'ATP en formant un complexe ternaire (Grilley et coll., 1989 ; Habraken et coll., 1998 ; Galio et coll., 1999) et bloquerait ainsi la migration de MutS déclenchée par l'ATP (Drotschmann et coll., 1998 ; Spampinato et Modrich, 2000 ; Schofield et coll., 2001^b).

- Cette équipe montre *in vitro* que le complexe MutS/MutL, en présence d'ATP et de Mg²⁺, active MutH dans une réaction en *trans* (le mésappariement et le site d(GATC) sont sur deux duplexes différents) aussi efficacement que dans une réaction en *cis* (Junop et coll., 2001 ; Schofield et coll., 2001^b). Si MutS s'éloignait du mésappariement pour aller activer MutH, le clivage serait plus efficace dans une réaction en *cis*.

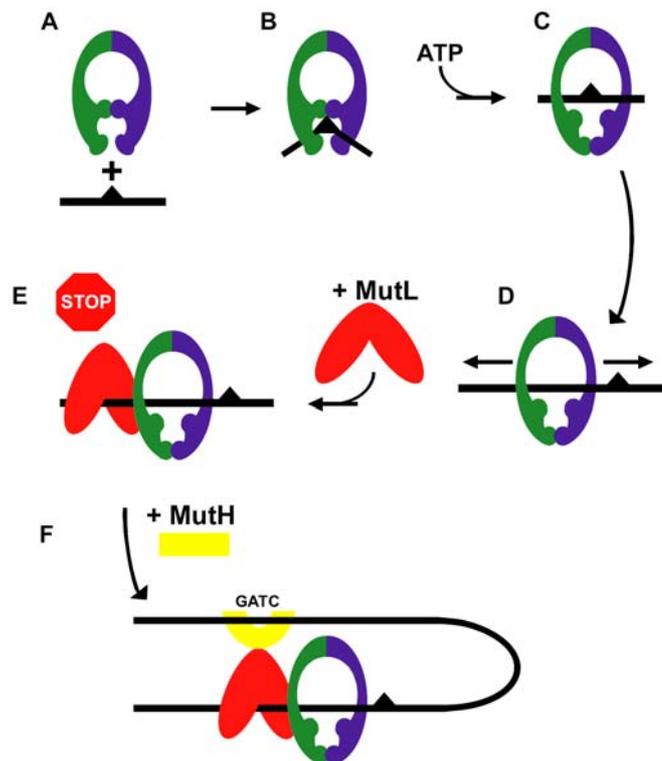


Fig. 12 : Mécanisme proposé par P. Hsieh sur les événements découlant de la reconnaissance d'un mésappariement par la protéine MutS (d'après Schofield et coll., 2001^b). La fixation d'ATP sur la protéine MutS elle-même fixée à un mésappariement induit un changement de conformation qui permet à la protéine de quitter le mésappariement. La protéine MutL va arrêter MutS en se fixant sur le complexe nucléoprotéique. Ce complexe ternaire va alors activer l'endonucléase MutH qui induira la réparation.

Ce modèle est présenté figure 12. MutS reconnaît (A) et se fixe sur le mésappariement (B), induisant un changement de conformation permettant le pincement de l'ADN au niveau

du mésappariement par les domaines I et IV des deux sous-unités (Obmolova et coll., 2000). La fixation d'une molécule d'ATP à MutS provoque un nouveau changement de conformation abolissant les contacts forts entre MutS et le mésappariement (C). MutS va alors commencer à s'éloigner du mésappariement par diffusion de l'ADN dans le canal de MutS (D) (Gradia et coll., 1999 ; Junop et coll., 2001). La protéine est rapidement arrêtée par MutL qui se fixe sur le complexe nucléoprotéique en interagissant avec MutS et l'ADN (E) (Bende et Grafstrom, 1991 ; Ban et coll., 1999). Le complexe MutS/MutL va signaler la présence du mésappariement et déclencherait l'activation de MutH par interaction protéine/protéine *via* MutL (F) (Ban et Yang, 1998^b ; Hall et Matson, 1999). Il y aura alors formation d'une boucle de type Ω , fermée à la base par MutS et MutL comme vu précédemment au microscope électronique (Allen et coll., 1997) ainsi que par MutH (Schofield et coll., 2001^b). L'hydrolyse, clairement impliquée dans la réparation des hétéroduplexes (Haber et Walker, 1991 ; Alani et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1997) permettrait de confirmer la présence du mésappariement reconnu par MutS et de déclencher un "signal de validation" autorisant la suite des événements pour réparer l'ADN (Junop et coll., 2001).

Les résultats de Modrich et de son équipe remettent en cause ce modèle. En effet, la spécificité de reconnaissance de MutS pour le mésappariement est abolie en présence d'ATP (sans Mg^{2+}) ou d'AMPPNP (Blackwell et coll., 2001). Or la fixation d'ATP sur MutS ne réduirait l'affinité de la protéine que lorsque celle-ci est fixée à un ADN homoduplexe, ce qui serait à la base du signal déclenchant la réparation (Junop et coll., 2001 ; Schofield et coll., 2001^b). De plus, les travaux de Bradley et coll. (2001) montrent *in vivo* que des spots de protéines du système MMR, contenant les protéines MutS et MutL, sont localisés au voisinage d'un mésappariement et non pas au niveau du mésappariement. Ceci est en accord avec le départ de MutS du mésappariement et de son mouvement le long de l'hélice provoqués par la fixation d'ATP sur la protéine.

VI Le système mismatch repair et la recombinaison

Le système MMR est impliqué dans la réparation des mésappariements et insertions/délétions présents dans les intermédiaires de recombinaison formés lors de

l'appariement de deux séquences légèrement divergentes (recombinaison homéologue) (Bishop et coll., 1987 ; Ray et coll., 1991 ; Paques et Haber, 1999). Il est aussi impliqué dans la suppression de la recombinaison entre deux séquences divergentes.

1- Chez *Escherichia coli*

La perte du système MMR provoque une augmentation dramatique du taux de recombinaison. L'ajout de MutS bloque l'échange de brin catalysé par la protéine RecA et inhibe ainsi la formation des intermédiaires de recombinaison entre des séquences divergeant de 3%. Cet effet inhibiteur est encore plus important en présence de MutL (Worth et coll., 1994). Des analyses génétiques montrent que MutS et MutL empêchent la recombinaison entre deux séquences divergentes (16% d'hétérologie) par deux mécanismes distincts. La première voie, indépendante de l'endonucléase MutH, requiert MutS, MutL, l'ADN hélicase UvrD et la nucléase RecBCD (qui appartient au système de recombinaison) (Stambuck et Radman, 1998). L'arrêt de la recombinaison se produit avant la migration de branches catalysée par les protéines RuvAB ou avant l'initiation de la synthèse d'ADN. La seconde voie requiert les fonctions d'excision de MutH. Cette voie bloque la recombinaison après le démarrage de la synthèse d'ADN et mène à la séparation des deux brins parentaux (Stambuck et Radman, 1998).

L'inhibition du système MMR aboutit à la disparition des "barrières génétiques" qui empêchent la recombinaison entre deux séquences provenant de deux espèces bactériennes (Rayssiguier et coll., 1989 ; Matic et coll., 2000).

2- Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les études sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* défectueuses au niveau de l'un des gènes du système MMR mettent en évidence le rôle de Msh2, Msh3 (Selva et coll., 1995), de Pms1 (Gendrel et Dutreix, 2001) et de Mlh1 et Mlh3 (Argueso et coll., 2002) dans la recombinaison. La recombinaison entre deux espèces est possible lorsque les homologues de MutS et de MutL sont défectueux (Alani et coll., 1994 ; Selva et coll., 1995 ; Datta et coll., 1996, 1997).

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer le rôle du système MMR dans le contrôle de la recombinaison (pour revue, Evans et Alani, 2000).

- Les mésappariements présents sur les intermédiaires de recombinaison sont reconnus par pMutSa (Sugawara et coll., 1997). La protéine va participer à l'arrêt de la recombinaison en facilitant le clivage de l'hétéroduplexe catalysé par le complexe endonucléasique pRad1/pRad10 (Sugawara et coll., 1997). La coupure de l'ADN pourrait induire un signal induisant la destruction de l'intermédiaire.

- Le rejet de l'intermédiaire de recombinaison semble impliquer le déroulement de l'hétéroduplexe par l'ADN hélicase Ggs1 qui interagit avec Msh2 (Myung et coll., 2001). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les doubles mutants *msh2/sgs1* de *S. cerevisiae* présentent un défaut dans la suppression des réarrangements entre séquences d'ADN divergentes, qui se traduit par une augmentation importante du taux de recombinaison homéologue (Myung et coll., 2001).

- Une troisième hypothèse propose que la fixation des protéines du système MMR sur le mésappariement bloque la formation de l'intermédiaire de recombinaison, *via* des interactions avec les protéines impliquées dans la recombinaison, comme pour *E. coli* (pour revues, Evans et Alani, 2000 ; Bellacosa, 2001^a).

Il faut noter que l'exonucléase Exo1 chez *S. cerevisiae* possède une activité inhibant la recombinaison (Chambers et coll., 1996 ; Lewis et coll., 2002). Cette protéine, qui interagit avec Msh2, participerait au contrôle de la recombinaison (Kleczkowska et coll., 2001).

3- Chez les eucaryotes supérieurs

Les études génétiques sur des cellules eucaryotes (cellules de souris ou Hela) démontrent que les protéines MSH2, MLH1 et PMS2 sont impliquées dans le contrôle de la recombinaison homéologue. La perte de la fonction de l'une de ces protéines entraîne une augmentation du taux de recombinaison qui prédispose la cellule à l'apparition d'un cancer (de Wind et coll., 1995 ; Ciottia et coll., 1998 ; Pichierri et coll., 2001 ; Viel et coll., 2002 ; Mohindra et coll., 2002). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de la recombinaison dépendant du système MMR ne sont pas complètement élucidés, et les interactions des protéines de ce système avec les protéines impliquées dans la recombinaison ne sont pas établies. Cependant, des études récentes ont montré que la protéine homologue de l'hélicase

Sgs1, la protéine BLM, interagit avec MLH1 (Langland et coll., 2001 ; Pedrazzi et coll., 2001) et pourrait avoir le même rôle que Sgs1 (Bellacosa, 2001^a). Les cellules BLM⁻ peuvent réparer les mésappariements, ce qui suggère que l'interaction entre BLM et MLH1 intervient dans la recombinaison (Langland et coll., 2001).

Les études génétiques menées sur des cellules de souris mâles et femelles infertiles montrent que les protéines MSH4, MSH5, MLH1 et PMS2 interviennent dans la recombinaison méiotique. En effet, dans les cellules déficientes dans l'une de ces protéines, la stérilité est due à une diminution du taux de crossing-over (Baker et coll., 1995, 1996 ; de Vries et coll., 1999 ; Kneitz et coll., 2000). Ces résultats suggèrent que le système MMR est aussi impliqué dans la régulation de la recombinaison méiotique. De plus, la mort cellulaire par apoptose est observée dans les cellules de souris Msh4⁻, Msh5⁻ et Mlh1⁻, suggérant qu'une méiose anormale induit un signal déclenchant la mort de la cellule (Nakawaga et coll. 1999).

VII Le système mismatch repair et les lésions de l'ADN

Du fait que les voies de réparation de l'ADN existent pour promouvoir la survie de la cellule, l'implication du système MMR dans la cytotoxicité de certaines drogues induisant des dommages sur l'ADN paraît paradoxale. Cependant, les études de ces dernières années le démontrent en reliant l'inactivation du système MMR à la tolérance des cellules MMR⁻ à différentes drogues (pour revues, Lage et Dietel, 1999 ; Karran, 2001).

Il semble en fait que la reconnaissance d'une lésion de l'ADN par le système MMR peut déclencher deux mécanismes opposés, la réparation ou la mort cellulaire, permettant dans les deux cas de maintenir l'intégrité du génome (fig. 13).

Dans le premier mécanisme, le système MMR reconnaît et répare soit la lésion elle-même, soit les produits de lésions induits par la présence du dommage sur l'ADN (telle que l'insertion d'une base non complémentaire en face de la lésion). Lorsque les cellules sont déficientes en système MMR fonctionnel, elles deviennent sensibles aux produits induisant de telles lésions qui ne sont plus réparées et persistent dans l'ADN. C'est le cas des dimères de thymine induits par les rayons ultraviolets (Wang et coll., 1999^b ; Liu et coll., 2000), des 8-oxoguanines induites par les espèces oxygénées réactives provenant du métabolisme cellulaire et des agents exogènes (pollution) (Ni et coll., 1999 ; Wyrzykowski et Volkert, 2003) et des

O6-(2-chloroéthyl)guanines induits par la drogue N-(2-chloroéthyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosourée (CCNU) (Aquilina et coll., 1998).

Le second mécanisme proposé pour expliquer le rôle du système MMR dans le maintien de l'intégrité cellulaire est le déclenchement d'un signal apoptotique conduisant à la mort cellulaire lorsque MutS α et MutL α interagissent avec certains types de dommages présents sur l'ADN. Dans ce cas, les cellules MMR⁻ deviennent résistantes (ou tolérantes) aux drogues produisant ces dommages. C'est le cas de plusieurs agents alkylants, d'antimétabolites, de composés du platine, de l'antracycline doxorubicine (qui s'intercale dans la double hélice et inhibe l'activité de la topoisomérase II après que l'enzyme ait coupé le double brin (Corbett et coll., 1993)) et des radiations ionisantes (résumés dans table I). Quelques hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes biochimiques dépendant du système MMR aboutissant à la mort des cellules, développées dans le chapitre IV, mais ceux-ci restent incompris.

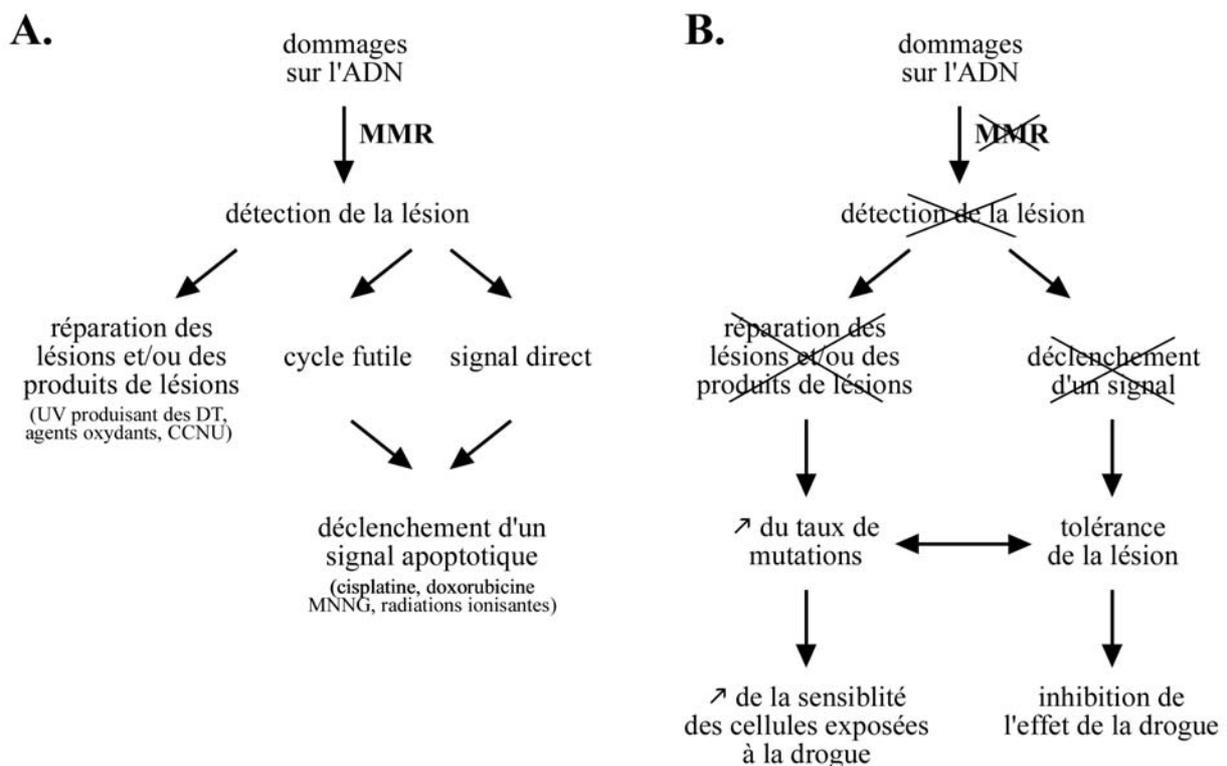


Fig. 13 : Rôle du système MMR dans le maintien de l'intégrité génomique après exposition des cellules à l'un des agents endommageant l'ADN (A) et conséquences de la déficience en système MMR dans les cellules exposées à ces mêmes agents (B). Le système MMR intervient soit en réparant les lésions et/ou les produits de lésions, soit en déclenchant un signal induisant la mort cellulaire.

	agents à l'origine du dommage de l'ADN	lésions formées sur l'ADN	références bibliographiques
agents alkylants	N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) N-méthyle-N-nitrouée (MNU) témозolamide (TMZ) procarbozine	O6-MetG, O4-MetT	Kat et coll., 1993 ; Koi et coll., 1994 Branch et coll., 1993 ; Brown et coll., 1997 Liu et coll., 1996 ; Pepponi et coll., 2003 Friedman et coll., 1997
antimétabolites	6-ThioG	S6-MetThioG	Hawn et coll., 1995 ; Swann et coll., 1996 ; Aebi et coll., 1996
	mercaptopurine		Swann et coll., 1996
dérivés platinés	cisplatine	adduits	Fram et coll., 1985 ; Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996, 1997
	carboplatine		Fink et coll., 1997 ; Durant et coll., 1999
	doxorubicine (Adriamycine)	CDB	Drummond et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996
	radiations ionisantes (e-, photons, rayons X,,,))	CSB, CDB	Fritzell et coll., 1997 ; Davis et coll., 1998

Table I : Présentation des principaux agents à l'origine d'une tolérance des cellules exposées déficientes en système MMR, des lésions que ces agents induisent à l'ADN et des références bibliographiques mettant en évidence une implication du système MMR dans leur effet cytotoxique.

Le fait que MutS et ses homologues eucaryotes MutS α reconnaissent des lésions telles les dimères de thymine T \sphericalangle T et les T \sphericalangle T/T (Wang et coll., 1999^b), les 8-oxoG/C et 8-oxoG/A (de Weese et coll., 1998 ; Ni et coll., 1999 ; Mazurek et coll., 2002), les O6-MetG/C, O4-MetT/A, les O6-MetG/T et O4-MetT/G (Babic et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996), l'adduit majoritaire intrabrin du cisplatine 1,2-d(GG) lorsqu'une thymine est mésincorporée en face de l'une des deux guanines pontées par le cisplatine (Yamada et coll., 1997) renforce l'hypothèse que le système MMR est un senseur général des différentes lésions de l'ADN. Les mécanismes biochimiques déclenchés par la reconnaissance de telles lésions ne sont pas compris et semblent différer d'un dommage détecté à l'autre, suggérant une surveillance complexe de l'ADN.

Cependant, il existe des systèmes connus qui fonctionnent spécifiquement dans la réparation des différents types de lésions de l'ADN. Dans le chapitre suivant, je présenterai les principaux systèmes de réparation de l'ADN ainsi que les connexions et les éventuelles compétitions qui peuvent exister entre ces systèmes et le système MMR.

CHAPITRE II : LES AUTRES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN

I Systèmes de réparation des lésions et bases modifiées

1- Réparation par réversion

a) La photoréactivation

La photoréactivation et la réparation par excision de nucléotides (REN) sont les deux voies impliquées dans l'enlèvement des principales lésions de l'ADN induites par les rayons ultraviolets (UV) : les dimères de thymine (DT) (Kim et Sancar, 1991). Les UV pontent deux thymine adjacentes, ce qui forme un noyau cyclobutane dans la double hélice (fig. 14).

La photoréactivation est un mécanisme de réparation par réversion qui agit directement sur les DT de façon UV-dépendante. La réaction est catalysée par l'ADN photolyase ou enzyme de photoréactivation, une flavoprotéine qui utilise la lumière bleue et le transfert d'électrons pour couper le noyau cyclobutane (pour revues, Sancar, 1996 ; Christine et coll., 2002).

La réparation par photoréactivation est UV dépendante. Si la lumière est trop faible pour permettre à la photolyase de fonctionner, celle-ci se fixe sur le dimère et stimule le système REN (Sancar et Smith, 1989).

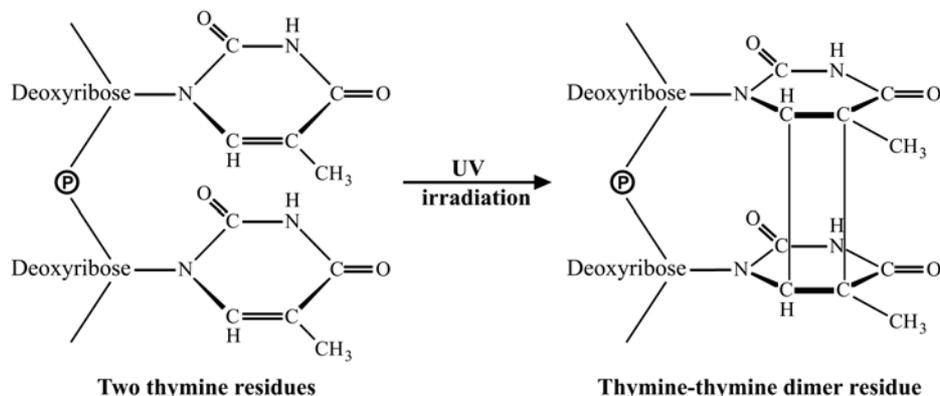


Fig. 14: Formation des dimères de thymine sous action des rayons ultraviolets (adapté de Lodish et coll., 1999). Les UV induisent la formation de liaisons covalentes entre deux thymine adjacentes, formant ainsi un noyau cyclobutane dans la double hélice d'ADN.

Le système MMR intervient dans la réparation des DT reconnus par la protéine hMutS α , confirmé par le fait que le taux de mutations augmente dans les cellules MMR⁻ exposées aux rayons UV (Wang et coll., 1999^b ; Liu et coll., 2000).

La photolyase d'*E. coli* reconnaît les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine (Ozer et coll., 1995), tandis que la photolyase de *Saccharomyces cerevisiae* reconnaît les adduits du cisplatine, de la moutarde nitrogénée (2-chloro-N-(2-chloroéthyle)-N-méthyléthanamine), de l'agent alkylant N-méthyle-N'-nitro-N-nitroguanidine (MNNG) et de la 4-nitroquinoline oxyde (Fox et coll., 1994). Fox et coll. (1994) observent une résistance des cellules à ces agents lorsque la photolyase est mutée. Ils proposent comme hypothèse que l'enzyme se fixe sur ces adduits et les protège de la réparation .

b) Le transfert des groupements méthyles

Ce mécanisme de réparation par réversion est beaucoup moins spécifique que la photoréactivation. Il concerne les O4-méthyle thymines (O4-MetT) et les O6-méthyle guanines (O6-MetG) plus fréquentes, (pour revue, Wood et coll., 2001).

Deux protéines d'*E. coli* sont impliquées dans ce système de réparation: les DNA méthyle transférases codées par les gènes *ada* et *cgt* (Wood et coll., 2001 ; Kleibl, 2002). Chez l'homme, la méthyle transférase MGMT (O6-MetG méthyle transférase) agit aussi efficacement sur les O6-MetG que sur les O4-MetT (Kawate et coll., 1995).

Ces enzymes-suicides fonctionnent de la même façon. Elles catalysent la réaction de transfert des groupements méthyles des bases modifiées sur un de leurs sites cystéiques accepteurs, ce qui aboutit à leur inactivation et à la récupération de bases non modifiées (Kawate et coll., 1995). Les cellules déficientes en MGMT sont hypersensibles aux agents alkylants N-méthyle-N-nitrouée (MNU) et MNNG (Karran et Bignami, 1992 ; Siraishi et coll., 2000).

Le système MMR intervient dans la cytotoxicité des agents alkylants (voir table I chap. I VII). Duckett et coll. (1996) ont montré que hMutS α reconnaît fortement les O6-MetG et les O4-MetT ainsi que les mésappariements O6-MetG/T et O4-MetT/G. De plus, les cellules déficientes en hMutS α sont résistantes aux agents méthylants et sont incapables d'enlever les lésions O6-MetG (Duckett et coll., 1999). Mais aucune information n'est disponible sur une éventuelle relation ou compétition entre les protéines du système MMR et la protéine MGMT lors de la reconnaissance et/ou de la réparation de ces lésions.

2- Le système de réparation par excision de nucléotides

Le système de réparation par excision de nucléotides (REN) est le système le moins spécifique car il reconnaît préférentiellement les distorsions de l'ADN induites par les lésions que les lésions elles-mêmes. Il existe deux mécanismes d'excision pouvant réparer ces dommages. Le système REN global surveille l'ensemble du génome tandis que le système de réparation couplée à la transcription (RCT) se focalise sur les lésions bloquant l'ARN polymérase II au cours de la transcription des gènes (Vos et Wauthier, 1991; Hanawalt, 1994).

a) La réparation par excision de nucléotides procaryote

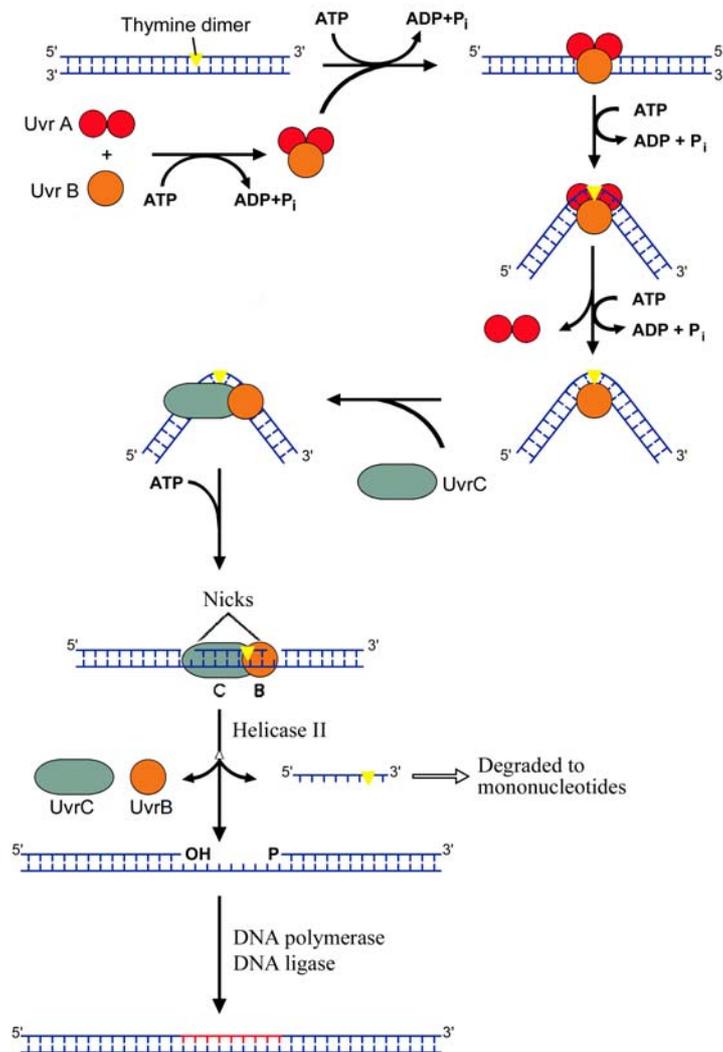


Fig. 15 : Réparation d'un dimère de thymines par excision de nucléotides chez *E. coli* par le mécanisme UvrABC (REN procaryote) (adapté de Lodish et coll., 1999).

Le système REN procaryote ou système UvrABC (fig. 15) est initié par le complexe protéique UvrA₂B qui reconnaît et se fixe sur un dommage de l'ADN. UvrA se dissocie du complexe, laissant un complexe UvrB/ADN très stable. UvrC, qui possède une activité endonucléase, peut alors se fixer sur UvrB. La nature du dommage va déterminer précisément la position des sites de clivage (pour revue, Lodish et coll., 1999).

Dans le cas des dimères de thymine, UvrC clive à 4-5 nucléotides en 3' de la lésion et à 9 nucléotides en 5' de la lésion (Verhoeven et coll., 2002). UvrC et le fragment de 13-14 bases se dissocient du complexe nucléoprotéique, aidés par l'ADN hélicase II (UvrD). L'extrémité 3'OH de l'incision du côté 5' est alors accessible à l'ADN polymérase I qui resynthétise à partir du brin matrice et décroche UvrB. La continuité du brin réparé est assurée par l'ADN ligase (pour revue, Lodish et coll., 1999).

b) La réparation par excision de nucléotides eucaryote

Au moins 16 protéines et complexes protéiques interviennent dans la réparation par excision de nucléotides eucaryote (fig. 16) (pour revues, Sancar, 1996 ; Wood, 1996). Le système REN intervient surtout pour enlever les photoproduits de l'ADN induits par les UV (Szymkowski et coll., 1993) ainsi que les adduits du psoralène (Svoboda et coll., 1993), de la 4-nitroquinoline (Balajee et Bohr, 2000) et du cisplatine (Hansson et Wood, 1989 ; Gunz et coll., 1996).

La protéine XPA est impliquée dans la reconnaissance des dommages à réparer. Son interaction avec la protéine hRPA augmente son affinité pour l'ADN endommagé (He et coll., 1995). Le complexe XPA/hRPA recrute le facteur de transcription TFIIH qui déroule l'ADN pour permettre au complexe XPC/hHR23B de se fixer sur la lésion tout en interagissant avec XPA et TFIIH. La nucléase XPG est alors recrutée par hRPA et TFIIH et va couper l'ADN à 5-6 nucléotides du côté 3' de la lésion. Puis l'endonucléase XPF/ERCC1 est recrutée par XPA, XPC et TFIIH et va couper à son tour à 20-24 nucléotides en 5' de la lésion. Le fragment nucléotidique et toutes les protéines exceptée hRPA sont "chassées" par l'ATPase RFC (replication factor C). RFC est un facteur protéique accessoire qui recrute le facteur de processivité PCNA sur l'ADN dans une réaction ATP-dépendante, formant ainsi un complexe pouvant glisser sur l'ADN en entraînant les ADN polymérases β ou ϵ qui resynthétisent l'ADN. Cette étape suivie de la ligation par l'ADN ligase I (pour revues, Sancar, 1996 ; Wood, 1996).

La protéine XPE ou UV-DDB (UV-Dommaged DNA binding protein) a un rôle accessoire dans le REN (Aboussekhra et coll., 1995). Elle reconnaît les sites apuriques créés

par les UV, ainsi que les adduits de la méchloroéthamine et du cisplatine (Payne et Chu, 1994).

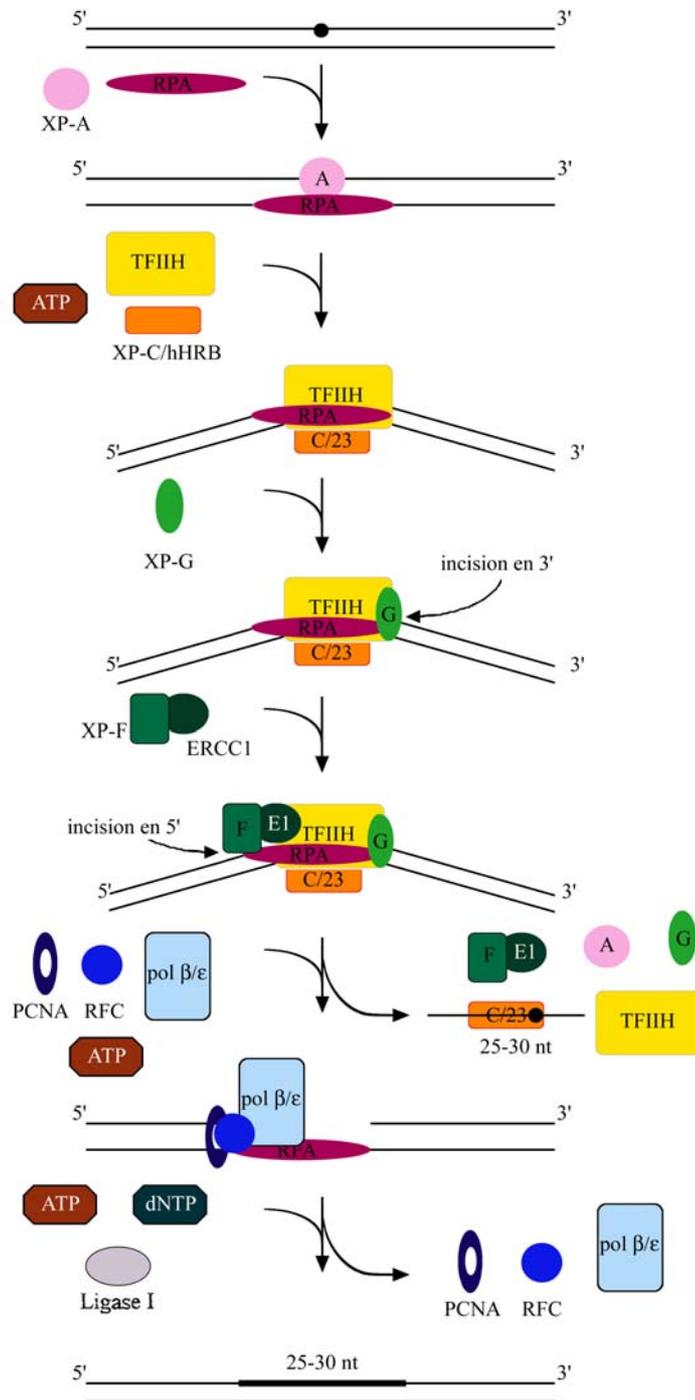


Fig. 16 : Mécanisme du système de réparation par excision de nucléotides eucaryote (d'après thèse de N. Tanguy le Gac, 1999).

Il semble qu'au moins trois protéines du système REN (XPA, RPA et XPE) sont capables de reconnaître efficacement les adduits du cisplatine (Jones et Wood, 1993 ; Kurakoa et coll., 1996 ; Patrick et Turchi, 1998 ; Payne et Chu, 1994) (voir chap. III III 2 a).

Les cellules déficientes en système REN fonctionnel sont sensibles au cisplatine (Fraval et coll., 1978 ; Poll et coll., 1984 ; Plooy et coll., 1985 ; Djit et coll., 1988). Les essais de réparation *in vitro* montrent que le nombre d'adduits majoritaires intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) est plus faible dans certaines lignées cellulaires résistantes à la drogue (Dempke et coll., 1992 ; Shellard et coll., 1993) et que les adduits du cisplatine sont enlevés avec des efficacités variables selon la nature de l'adduit (Szymkowski et coll., 1992 ; Calsou et coll., 1992 ; Moggs et coll., 1996 ; Zamble et coll., 1996). Ainsi, les adduits monofonctionnels, les adduits intrabrins 1,3-d(GpTpG) et les adduits interbrins sont très bien réparés à l'opposé des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG). Des travaux démontrent que les composés de lésion de l'adduit 1,2-d(GpG) contenant une thymine en face de l'une des deux guanines platinées sont mieux réparés que l'adduit seul (Moggs et coll., 1997 ; Mu et coll., 1997). Cet effet est aussi observé lorsque les extraits cellulaires sont déficients en protéine hMutS α (Moggs et coll., 1997). Ces résultats suggèrent qu'une compétition pourrait exister entre le système MMR et le système REN vis-à-vis des adduits du cisplatine.

Le système REN semble détecter et réparer les mésappariements présents dans l'ADN indépendamment du système MMR (Huang et coll., 1994). Malgré les interactions entre les protéines du système REN et MSH2 mises en évidence *in vitro* et *in vivo* (Bertrand et coll., 1998), les relations entre ces deux systèmes ne sont pas comprises (pour revue, Sancar, 1999).

c) La réparation couplée à la transcription

Ce système répare les lésions telles que les dimères de thymines (Bohr et coll., 1985), les thymines glycols (Cooper et coll., 1997) et les 8-oxoguanines (8-oxoG) présents sur le brin transcrit (le Page et coll., 2000^a) et pourrait intervenir dans la cytotoxicité du cisplatine (Furuta et coll., 2002).

La réparation couplée à la transcription (RCT) est enclenchée lorsque l'ARN polymérase II se retrouve bloquée sur la lésion présente sur le brin en cours de transcription (Selby et Sancar, 1990 ; Donahue et coll., 1994). L'ARN polymérase stabilisée sur la lésion recrute le facteur TRCF (Transcription-repair coupling factor) chez *E. coli* (Selby et coll., 1991) qui provoque le départ de l'ARN polymérase et du transcrit en cours d'élongation tout en recrutant le complexe UvrA₂B (Selby et Sancar, 1993). Chez l'homme, le système RCT requiert en premier lieu les protéines CSB et CSA (produits des gènes mutés dans le Syndrome de Cockayne) puis TFIIH et XPG. Les étapes suivantes sont les mêmes que celles du REN (pour revue, Hoeijmakers, 2001).

Deux autres protéines interviennent dans le système RCT humain : les protéines BRCA1 et BRCA2, produits des gènes de susceptibilité de cancer ovarien et du sein. BRCA1 interagit avec l'ARN polymérase II ainsi que les facteurs de transcription TFIIE, TFIIIF et TFIIH (Scully et coll., 1997^a). De plus, des cellules déficientes en protéines BRCA1 ou BRCA2 ne peuvent plus réparer les lésions des brins transcrits telles que les thymines glycols et les 8-oxoguanines et deviennent hypersensibles aux radiations ionisantes, aux peroxydes et au cisplatine (Gowen et coll., 1998; Abbott et coll., 1999 ; Le Page et coll., 2000^b ; Bhattacharyya et coll., 2000).

L'intervention de ces deux protéines ne semble pas être restreinte qu'au système RCT puisqu'elles interagissent avec la protéine hRad51 pendant la réparation par recombinaison (Scully et coll., 1997^b ; Mizuta et coll., 1997) ainsi qu'avec les protéines du système mismatch repair (Wang et coll., 2001). De récentes études tendent à prouver que les protéines du système MMR ont un rôle dans la réparation couplée à la transcription. Cette liaison avait été supposée lorsque Champe et son équipe ont démontré que des cellules d'*E. coli* et humaines déficientes en protéines MutS et MutL (Mellon et Champe, 1996) et hMSH2 et hMLH1 (Mellon et coll., 1996) présentent un défaut de la réparation des dimères de thymines *via* le système RCT. L'hypothèse proposée est que le système MMR, et en particulier la protéine hMutS α , fournit un signal qui déclencherait la réparation couplée à la transcription grâce aux protéines BRCA1 et BRCA2 (Leadon, 1999 ; Wang et coll., 2000). En effet, BRCA1 interagit directement avec hMSH2, hMSH3 et hMSH6 (Wang et coll., 2001) lors de la formation d'un gros complexe protéique (> 2MDa) appelé BASC (BRCA1 associated genome surveillance complex) (Wang et coll., 2000). Ce complexe comprend en plus les protéines hMLH1, ATM (qui intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire), BLM (ADN hélicase qui interagit avec hMLH1), le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 (cf. § ci-dessous) et l'ATPase RFC qui recrute le facteur PCNA sur l'ADN. De plus, BRCA1 semble avoir une affinité plus grande pour hMutS α ayant fixé une molécule d'ATP que pour hMutS α /ADP (Wang et coll., 2001).

3- La réparation des cassures de l'ADN

Les origines de ces cassures sont essentiellement dues à un clivage de l'ADN pendant la réplication, aux radiations ionisantes, à des agents radiomimétiques ou des drogues anti-cancéreuses comme la bléomycine ou le cisplatine.

Lors d'une cassure simple brin, les deux extrémités ne peuvent pas être réunies par simple ligation car les extrémités 3'OH sont souvent modifiées. Ce sont certainement les protéines des dernières étapes de la réparation par excision de base qui interviennent (AP endonucléase, dRPase, polymérase, XRCC1, ligase, voir chap. II II 1 b) (pour revue, Povirk, 1996).

Les cassures double brin sont les lésions les plus délétères car leur réparation entraîne souvent la perte d'un fragment d'ADN. Outre les radiations ionisantes et le métabolisme oxydatif, la méiose et la recombinaison V(D)J (réarrangement des fragments variables (V), de jonctions (J) et de diversité (D) des gènes codant pour les immunoglobulines et les récepteurs des lymphocytes T) peuvent être à l'origine de ce type de lésions. Les cellules eucaryotes possèdent des systèmes hautement conservés pour détecter rapidement ces lésions, les signaler et les réparer (pour revue, Jackson, 2002).

Il existe principalement 3 mécanismes de réparation des cassures double brin : la recombinaison homologue (RH), la recombinaison illégitime (RI) et la réparation par jonction d'extrémités non homologues (JENH) (pour revue, Haber, 1999). La signalisation des cassures double brin (CDB) passent par les protéines ATM et ATR (Morrison et coll., 2000 ; Shilov et Kastan, 2001 ; Abraham, 2001). Ce sont des protéines impliquées dans les voies de signalisation reliées à la croissance et la différenciation cellulaires (Shilov et Kastan, 2001). ATM est recrutée et activée par les CDB (Andegeko et coll., 2001) et va phosphoryler différentes protéines telles que p53, Chk2 (Hirao et coll., 2000), BRCA1, NBS1 et H₂A (Andegeko et coll., 2001) d'où un effet sur la réparation de l'ADN, l'altération de la chromatine (Rogakou et coll., 1998 ; Downs et coll., 2000), l'augmentation du niveau de dNTP (Tanaka et coll., 2000), la progression dans le cycle cellulaire (Hirao et coll., 2000) et l'apoptose (Herzog et coll., 1998). De plus, la protéine ATM interagit avec les protéines du système MMR au sein du supercomplexe BASC (Wang et coll., 2000).

Le système JENH est caractérisé par sa rapidité à détecter les erreurs et par sa mutagenicité tandis que la RH est fidèle mais ne peut avoir lieu que pendant la phase S et la phase G₂ (pour revue, Jackson, 2002).

a) La recombinaison homologue

Cette voie nécessite la protéine Rad52 qui interagit avec le complexe nucléoprotéique Rad51/ADN simple brin, ainsi que les protéines Rad54, Rad55 et Rad57 (pour revue, Haber, 1999).

Il semblerait que Rad52 et la protéine Ku appartenant au système JENH soient en compétition pour se fixer sur les extrémités de la cassure. Selon la protéine fixée sur la cassure, la voie de réparation correspondante est enclenchée (Van Dyck et coll., 1999).

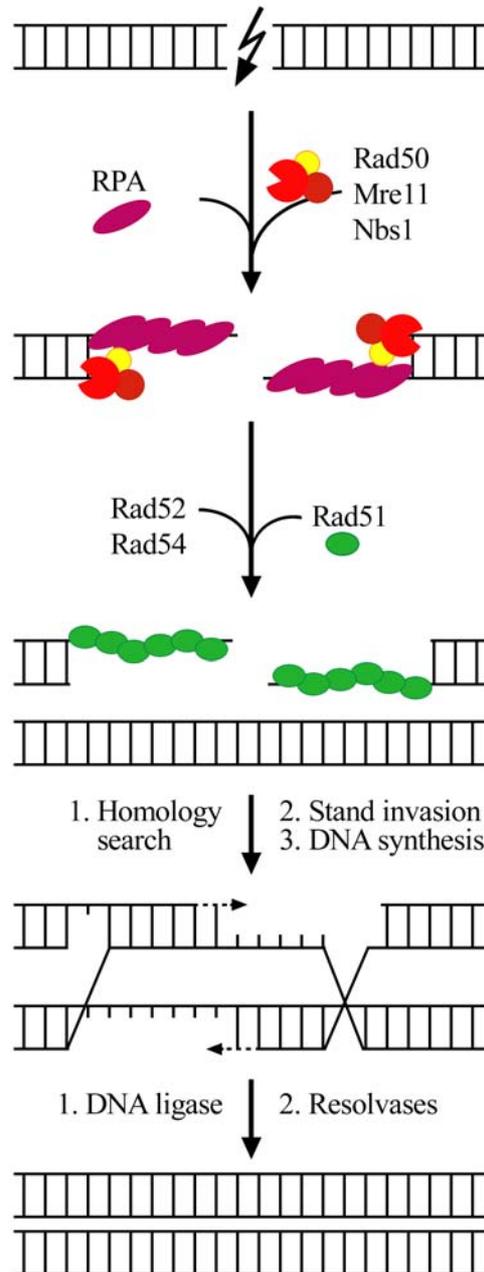


Fig. 17 : Mécanisme de réparation par recombinaison homologue (adapté de Hoeijmakers, 2001).

Le complexe Rad50/Mer11/Nbs1 possède une activité 5'→3' exonucléase qui dégrade les extrémités 5' pour exposer les extrémités 3' de la cassure (fig. 17). La protéine RPA facilite l'assemblage du filament nucléoprotéique Rad51/ADN simple brin. Après fixation de Rad52, Rad54, Rad55 et Rad57, ce filament interagit avec une molécule d'ADN double brin

possédant la même séquence. Rad51 va alors catalyser l'échange de brin. L'extrémité 3' de l'ADN endommagé est "allongée" par une polymérase qui copie les informations génétiques à partir du brin d'ADN non endommagé. Les jonctions de Hollidays sont dégradées par des résolvases et la ligation par l'ADN ligase I redonne deux molécules d'ADN intactes (pour revue, Hoeijmakers, 2001).

Rad51 interagit avec les protéines BRCA1 et BRCA2. Les études suggèrent que ces deux protéines interviennent dans la recombinaison homologue (Tutt et coll., 2001). En effet, les cellules déficientes en BRCA1 et BRCA2 souffrent d'instabilité chromosomique (Tirkkonen et coll., 1997 ; Xu et coll., 1999) et sont sensibles aux lésions de l'ADN normalement réparées par la recombinaison homologue (Scully et coll., 1999). L'interaction entre Rad51 et BRCA2 régulerait la localisation nucléaire de Rad51 ainsi que sa fixation sur l'ADN (Davies et coll., 2001). BRCA1 complexée à Rad51 est impliquée dans le remodelage de la chromatine (Bochar et coll., 2000), la maintenance de l'intégrité génomique (Moynahan et coll., 1999 ; Tutt et coll., 2001), le contrôle de la transcription et la recombinaison homologue (Scully et coll., 1997,^{a,b}).

L'un des rôles fondamentaux du système MMR est sa participation au contrôle de la recombinaison homologue (voir chap. I VI). Cependant le processus biochimique permettant d'expliquer clairement le rôle du système MMR dans ce phénomène n'est pas compris.

b) La recombinaison illégitime

La recombinaison illégitime (RI) répare les CDB présentes dans les régions de séquences répétées. Cette voie est mutagène car elle mène à la délétion de l'une de ces répétitions et d'une séquence d'ADN contenue entre ces répétitions (Kim et coll., 2001). Le processus débute de la même façon que la recombinaison homologue. La protéine Rad52 se fixe sur les extrémités de la cassure et le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 dégrade les extrémités 5' jusqu'à l'exposition de régions homologues entourant la CDB.

Rad52 est une protéine d'hybridation de brin qui permet le rapprochement des extrémités et stimulerait l'alignement et l'hybridation des régions homologues présentes de chaque côté de la CDB (Ivanov et coll., 1996). Une homologie de 29 paires de bases suffit pour déclencher la réparation par le système RI (Sugawara et coll., 2000). La resynthèse de l'ADN, la dégradation des extrémités 3' non hybridées par une exonucléase et la ligation aboutissent à la délétion d'un élément répété et d'une séquence contenue entre les répétitions (Haber, 1999 ; Tauchi et coll., 2001 ; Preston et coll., 2002).

La recombinaison illégitime provoquant des délétions, les cellules minimiseraient son utilisation grâce à la protéine BRCA2 qui favoriserait la recombinaison homologue et préviendrait la “non-utilisation” de la RI (Tutt et coll., 2001). Il est possible que cette voie existe pour le cas où les deux autres voies de recombinaison homologue et de jonction d’extrémités non homologues ne pourraient pas intervenir (Preston et coll., 2002).

Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que pMsh2-pMsh3 participe à l’enlèvement des extrémités non homologues pendant la réparation des CDB par recombinaison illégitime (Sugawara et coll., 1997 ; Evans et coll., 2000). J.E. Haber et son équipe proposent un modèle dans lequel pMutS β stabilise les intermédiaires de recombinaison en se fixant sur les extrémités simple brin non hybridées, ce qui permettrait au complexe endonucléasique pRad1/pRad10 de localiser et de cliver l’ADN au niveau de la jonction simple brin/double brin (Sugawara et coll., 1997 ; Evans et coll., 2000). Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence d’une interaction entre pMSH2 et pRad1 et pRad10 (Bertrand et coll., 1998).

c) La réparation par jonction d’extrémités non homologues

La réparation par jonction d’extrémités non homologues (JENH) est un système qui relie simplement les extrémités d’une CDB sans avoir recours à la synthèse d’ADN à partir d’une région homologue (fig. 18). Il semble que cette voie prédomine pour réparer les cassures double brin d’ADN dans les cellules animales (Jeong-Yu et Carroll, 1992 ; Godwin et coll., 1994).

Le complexe Ku, formé de deux sous-unités Ku70 et Ku80 (ou Ku86), se fixe spécifiquement sur les extrémités de la CDB (Mimori et Hardin, 1986) sans spécificité de séquence (de Vries et coll., 1989 ; Paillard et Strauss, 1991). Il possède une activité ATPasique ADN-dépendante (Cao et coll., 1994) ainsi qu’une activité hélicase 3’→5’ ATP-dépendante (Tuteja et coll., 1994). Il protège les extrémités de la cassure contre la dégradation exonucléasique jusqu’à ce que la réparation soit terminée. La fixation de Ku sur la CDB permet le recrutement de la protéine DNA-PK_{CS} pour former le complexe DNA-PK, avec une sous-unité régulatrice Ku70/Ku80 et une sous-unité catalytique DNA-PK_{CS} (Anderson, 1993 ; Gottlieb et Jackson, 1993 ; Dynan et Yoo, 1998). La formation de DNA-PK entraîne la phosphorylation de Ku et de DNA-PK_{CS}, ce qui permet d’activer le complexe (Suwa et coll., 1994) et de rapprocher les deux extrémités de la CDB. Avec l’aide du complexe Rad50/Mre11/Nbs1, DNA-PK déroule l’ADN de chaque côté de la cassure (Paull et Gellert, 1999), ce qui expose les régions de microhomologie qui pourront s’apparier. Les bases non appariées font une torsion de 180° pour sortir de la double hélice (flap) et sont enlevées par la

Flap-endonucléase (FEN-1) (Harrington et Lieber, 1994 ; Wu et coll., 1999). L'ADN se linéarise et le complexe ligase IV/XRCC4, avec XRCC4 phosphorylé par DNA-PK (Leber et coll., 1998), catalyse la jonction des deux extrémités par ligation (Li et coll., 1995 ; Critchlow et coll., 1997). Ce système est hautement mutagène car il aboutit à une délétion de 1 à 10 paires de bases au niveau du point de jonction (Chu, 1997).

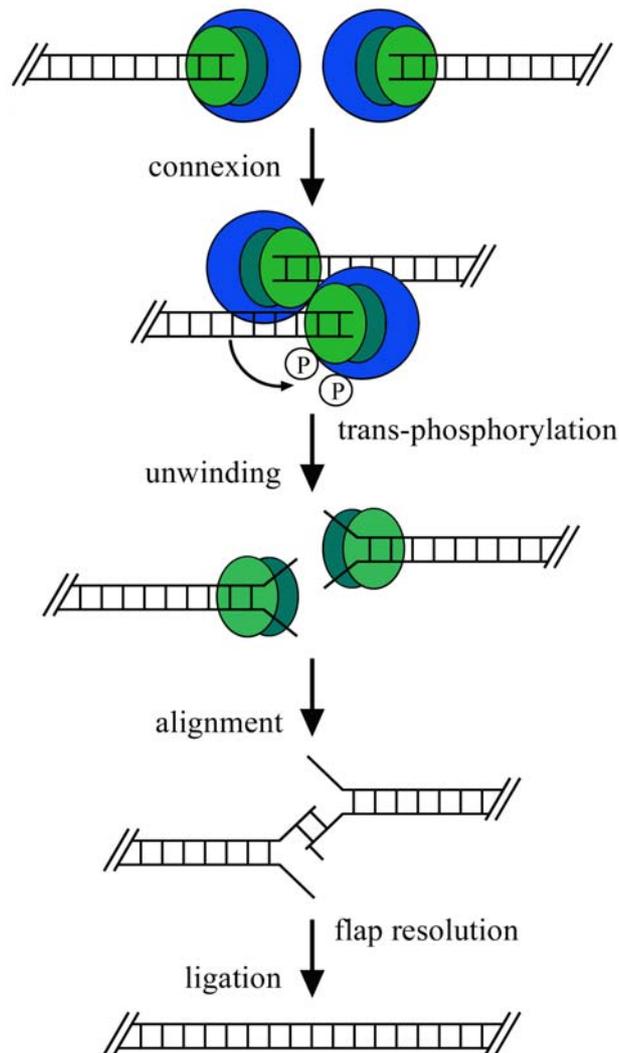


Fig. 18 : Présentation du système de réparation par jonction d'extrémités non homologues (d'après Chu, 1997). Les deux sous-unités de Ku sont en vert, et DNA-PK_{CS} en bleu.

La présence d'adduits du cisplatine ne modifie pas l'affinité de Ku pour l'ADN, n'empêche pas le recrutement de DNA-PK_{CS} mais ne permet pas l'activation du complexe DNA-PK qui perd son activité kinase (voir chap. III III 2 d).

II Les systèmes de réparation des mésappariements indépendants du système MMR

On parle de mésappariements lorsque deux bases opposées forment une paire de bases différente des paires de bases de Watson-Crick A/T et C/G. Ces mésappariements ont pour origine les erreurs commises lors de la réplication, de la recombinaison entre deux séquences ne présentant pas 100% d'homologie, de la réplication des bases altérées par le métabolisme cellulaire ou proviennent de la transformation spontanée d'une base en une autre base (par exemple, la déamination spontanée des 5-méthyle cytosines (5-MetC) et des cytosines donnant respectivement des thymines et des uraciles). Ces mésappariements sont mutagènes s'ils ne sont pas enlevés avant la réplication.

En plus du système MMR, deux systèmes de réparation interviennent pour empêcher l'introduction d'une mutation du fait de la présence d'un mésappariement. La réparation par excision de base (REB) est la principale voie de réparation des dommages de l'ADN dus au métabolisme cellulaire (méthylation, déamination, oxydation) tandis que le système "very short pathway" (VSP) ne répare que les mésappariements G/T et G/U (U pour uracile) dans un contexte séquentiel précis.

1- La réparation par excision de base

Le système de réparation par excision de base (REB) agit en permanence sur l'ADN pour réparer les bases altérées par méthylation, déamination ou oxydation. Il peut aussi réparer les mésappariements ainsi que les mésappariements formés avec une base altérée (Krokan et coll., 1997). Ce système est caractérisé par un ensemble d'ADN glycosylases ayant chacune un spectre de reconnaissance réduit. Il existe deux classes d'ADN glycosylases : les ADN glycosylases strictes qui ne catalysent que le clivage de la base altérée, et les ADN glycosylases qui possèdent en plus une activité lyase qui catalyse le clivage du squelette phosphodiester en 5' ou en 3' du site créé lors du clivage de la base.

Le système REB ne bloque pas la transcription et la réplication, ce qui fait que les dommages de l'ADN réparés par ce système sont très mutagènes (pour revue, Wood, 1996).

a) Le système REB procaryote

La caractéristique mécanistique du système REB est le clivage de la liaison N-glycosidique (entre la base et le sucre) par les ADN glycosylases pour exciser la base altérée ou mésappariée. Ce clivage crée un site apurique/apyrimidique appelé site AP. Une AP endonucléase ou une ADN glycosylase/lyase clive en 5' ou en 3' de ce site AP afin que le déoxyribose soit excisé à son tour par une 5'- ou une 3'-dRPase (ADN déoxyribo-phosphatase). La brèche est alors comblée par l'ADN polymérase I et la continuité du brin est assurée par l'ADN ligase (pour revue, Wood, 1996).

b) Le système REB eucaryote

La réparation par excision de base eucaryote diffère du système REB procaryote à deux niveaux. D'une part, seize polypeptides minimum interviennent dans le REB humain alors que 4 à 5 protéines suffisent chez *E. coli*. D'autre part, il existe deux voies de réparation par excision de base chez les eucaryotes. Une voie dite "courte" (short-patch pathway) qui n'élimine qu'une base alors que la voie dite "longue" (long-patch pathway) enlève 2 à 6 bases (pour revues, Wood, 1996 ; Sancar, 1996 ; Hoeijmakers, 2001). C'est la nature de la brèche qui oriente la réparation vers l'une de ces deux voies (fig. 19). Si les extrémités ne sont pas modifiées, la voie courte sera enclenchée par recrutement de la AP endonucléase HAP1 (Ape1) qui clive en 5' du site AP. La voie courte du système REB fait intervenir l'ADN polymérase β . L'activité polymérase de pol β permet la mise en place de la bonne base et son activité dRPase, augmentée par l'interaction entre pol β et HAP1 enlève le phosphodiester. Pol β interagit avec l'ADN ligase III *via* XRCC1 pour permettre à la ligase de rétablir la continuité du brin d'ADN (Ikeda et coll., 1998).

Si ces extrémités sont réduites ou oxydées, la protéine PARP (poly (ADP-Ribose) polymérase) se fixe dessus et recrute les protéines impliquées dans la réparation par la voie longue (Klungland et Lindahl, 1997). Cette voie fait intervenir les ADN polymérases δ et ϵ , associées au facteur PCNA, pour la resynthèse du fragment nucléotidique. La DNase IV (ou Flap endonucléase FEN-1) liée spécifiquement à PCNA (Li et coll., 1995 ; Wu et coll., 1996) possède une activité exonucléase 5'→3' et va digérer les 2-10 nucléotides contenant la lésion. La continuité du brin d'ADN est assurée par l'ADN ligase I (Wood, 1996 ; Klungland et Lindahl, 1997; Hoeijmakers, 2001).

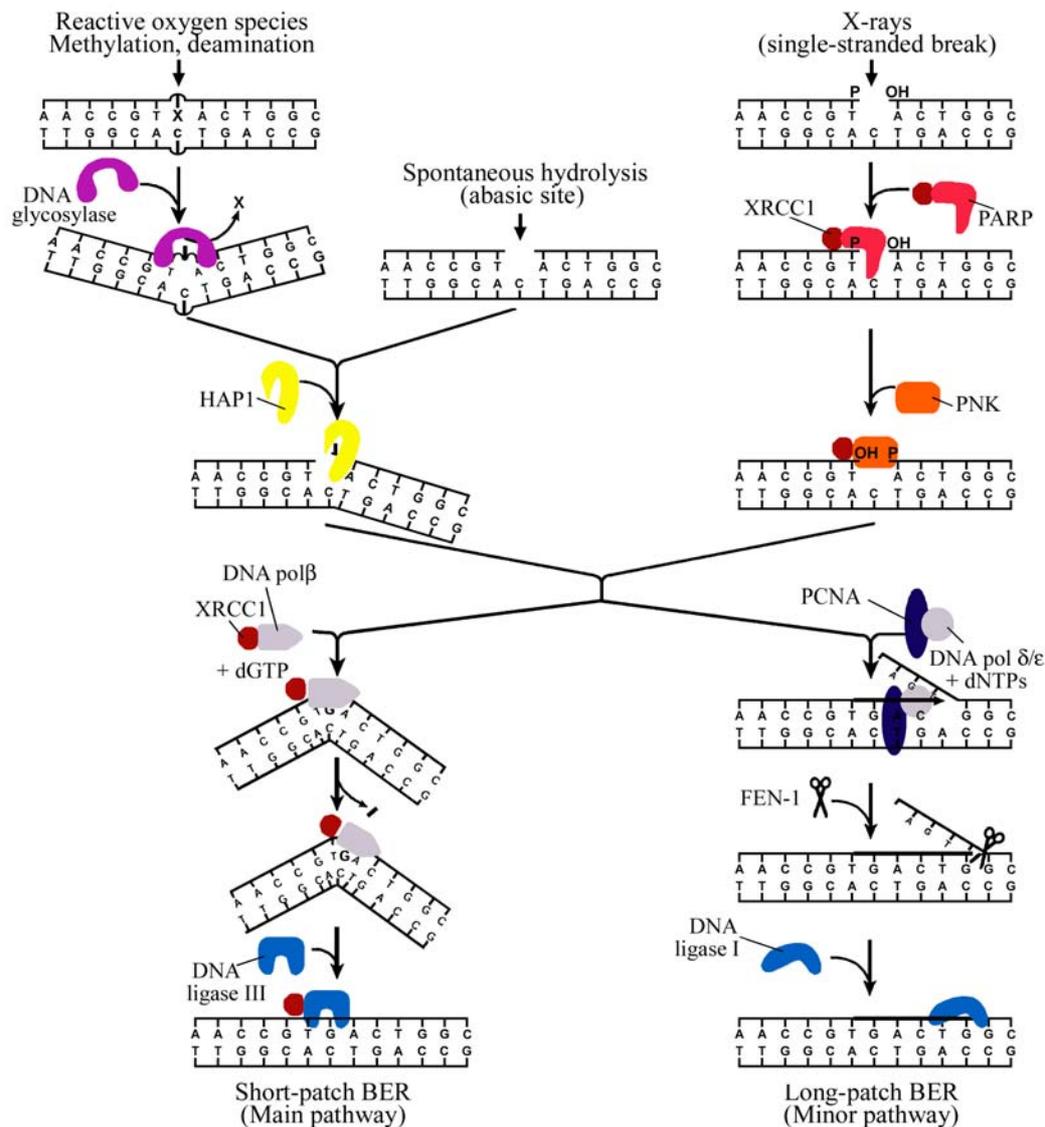


Fig. 19 : Présentation des deux voies de réparation par excision de base eucaryote. La voie “courte” élimine une seule base tandis que la voie “longue” enlève 2 à 6 bases (d’après Hoeijmakers, 2001).

La protéine PARP pourrait déclencher un signal qui recruterait les protéines du REB impliquées dans la voie longue et ralentirait ou arrêterait la réplication le temps que la réparation par le système REB soit achevée (Wood, 1996 ; Berstein et coll., 2002).

c) Interactions entre le système MMR et le système REB

Des études récentes mettent en évidence des interactions entre le système MMR et le système REB. D’un côté, Gu et coll. (2002) démontrent que l’ADN glycosylase hMYH, (homologue humain de MutY qui reconnaît et clive les lésions 8-oxoG et les mésappariements G/A et 8-oxoG/A (Bjoras et coll., 1997 ; Slupska et coll., 1999)) interagit

physiquement avec hMSH6 et que hMutS α stimule la fixation et le clivage des mésappariements 8-oxoG/A catalysés par hMYH. De plus, le facteur PCNA interagit avec hMYH (Parker et coll., 2001) et avec hMSH6 (Flores-Rozas et coll., 2000 ; Parker et coll., 2001 ; Kleczkowska et coll., 2001). Il y aurait une coopération entre les deux systèmes MMR et REB *via* PCNA pour protéger l'ADN contre les effets mutagènes des lésions 8-oxoG et des mésappariements G/A (Gu et coll., 2002).

D'autres travaux ont isolé par co-précipitation un complexe protéique contenant l'ADN glycosylase MED1 (methyl-CpG-binding endonuclease 1) et MLH1 (Bellacosa et coll., 1999). L'activité glycosylase de cette enzyme enlève les thymines et uraciles des mésappariements G/T et G/U présents dans les sites d(CG) méthylés ou non (Hendrich et coll., 1999 ; Petronzelli et coll., 2000^{a,b}). La mutagenèse provoquée par déamination spontanée des 5-MetC en thymine et des cytosines en uracile est l'un des mécanismes à l'origine d'instabilité microsatellite. Or la transfection de mutants MED1 ayant un défaut dans le domaine MBD (methyl-CpG-binding domain), mais pouvant toujours interagir avec MLH1, est associée à une instabilité microsatellite (Bellacosa, 2001^b). Ces résultats suggèrent que MED1 a un rôle dans le système MMR ainsi que dans le maintien de l'intégrité génomique des sites d(GC) (Bellacosa, 2001^{a,b}).

2- Le système de réparation "very short pathway"

Chez *E. coli*, le système "very short pathway" (VSP) est une voie de réparation très spécifique qui ne s'occupe que des mésappariements G/T provenant de la déamination spontanée de la 5-méthyle-cytosine qui donne une thymine. Ce mésappariement se produit dans un contexte séquentiel très précis d(CCWGG) (où W est un A ou un T), d(CAGG) ou d(CCAG) (Marinus et coll., 1984 ; Lieb et coll., 1986; Zell et Fritz, 1987). Ce sont les sites de reconnaissance de la protéine Dcm d'*E. coli* (DNA cytosine méthylase), protéine à l'origine de la méthylation de la cytosine en 5' de la thymine ou de l'adénine. Le système VSP dépend de la protéine Vsr, une ADN mismatch endonucléase qui coupe en 5' de la thymine à éliminer (Hennecke et coll., 1991). Cette thymine est alors remplacée par une cytosine par l'ADN polymérase I (Dzidic et Radman, 1989) et l'ADN ligase (Modrich, 1991) (fig. 20). Le mésappariement G/T hors de son contexte séquentiel est faiblement pris en charge par la voie VSP (Lieb et Rehmat, 1995). Le système VSP peut réparer aussi les mésappariements G/U, U provenant de la déamination de C (Gabbara et coll., 1994).

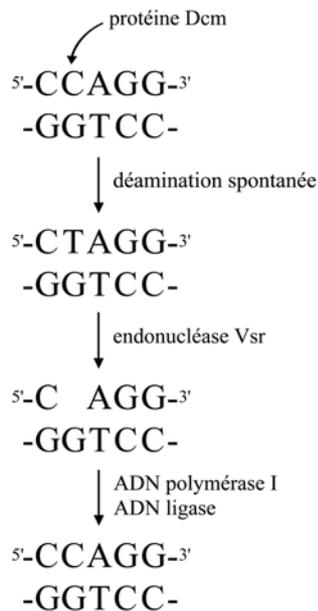


Fig. 20 : Réparation d'un mésappariement G/T par l'endonucléase Vsr. Chez *E. coli*, la protéine Dcm méthyle la cytosine en 5' de l'adénine, la 5-MetC étant susceptible de donner une thymine par déamination spontanée, à l'origine de l'introduction d'un mésappariement T/G. L'intervention des protéines Vsr, ADN polymérase I et ADN ligase permet de restaurer une paire de base C/G.

Le gène *vsr* et le gène *dcm* sont localisés côte à côte dans le génome d'*E. coli* et sont transcrits à partir du même promoteur (Sohail et coll., 1990). L'extrémité en 5' du gène *vsr* chevauche l'extrémité en 3' du gène *dcm*. Cet arrangement permettrait à la protéine Vsr d'être produite avant Dcm pour minimiser les effets mutagéniques de la méthylation des cytosines. Il semblerait que la protéine Vsr soit régulée de façon post-transcriptionnelle par la Dam-méthylase (Bell et Cupples, 2001).

Des études ont montré que MutS et MutL interviennent dans la voie VSP. En effet, le système est beaucoup moins efficace lorsque les gènes *mutS* ou *mutL* ne sont plus fonctionnels (Zell et Fritz, 1987). Le système VSP est fortement stimulé par MutS et MutL (Jones et coll., 1987 ; Hennecke et coll., 1991) mais pas par MutH (Zell et Fritz, 1987). Le co-cristal de Vsr avec un mésappariement G/T montre que plusieurs résidus de la protéine sont intercalés dans la double hélice, entraînant une déformation de l'empilement des bases et l'élargissement du petit et du grand sillon de l'ADN (Tsutakawa et coll., 1999). Il est difficile d'imaginer les protéines Vsr et MutS fixées en même temps sur le mésappariement G/T. L'hypothèse proposée par Lieb et coll. (2001) est que le contexte séquentiel permettrait la fixation de Vsr sur la thymine après le départ de la protéine MutS. De plus, la protéine Vsr

peut réduire la quantité de MutL disponible pour le système MMR en formant un complexe Vsr/MutL, ce qui permettrait à la protéine Vsr de se fixer sur le mésappariement (Drotshmann et coll., 1998).

Le système amené à réparer le mésappariement G/T serait influencé par le cycle cellulaire. En effet, le système MMR est plus efficace pendant la croissance exponentielle alors que le système VSP répare le mésappariement pendant la phase stationnaire (Bhagwat et Lieb, 2002).

Les cellules eucaryotes sont confrontées au problème de l'instabilité des cytosines méthylées dans les séquences d(CG). Wiebauer et Jiricny (1989) ont mis en évidence dans les cellules HeLa une réparation spécifique du mésappariement G/T présent dans les îlots d(CG). Cette voie courte est initiée par la thymine DNA glycosylase TDG qui enlève le T, conduisant à la formation d'un site AP reconnu par l'AP endonucléase HAP1. Le processus se termine par action de l'ADN polymérase β et de l'ADN ligase (Wiebauer et Jiricny, 1990; Neddermann et coll., 1996).

CHAPITRE III : LE CISPLATINE

Le *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) (cisplatine), comme son isomère stable *trans*-dichlorodiammineplatinum (II) (transplatine), est une molécule inorganique de structure plan-carré qui possède deux groupements chlorure labiles, deux groupements ammoniac inertes et un atome de platine central (fig. 21).

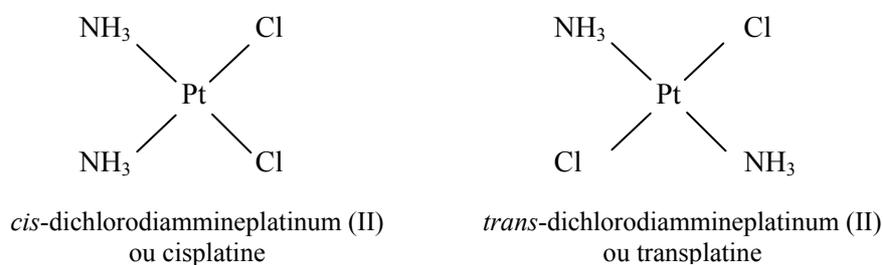


Fig. 21 : Formes isomères du dichlorodiammineplatine (II).

La découverte du cisplatine comme agent anticancéreux a été fortuite. En effet, l'équipe de B. Rosenberg, lors de l'étude de l'influence d'un champ électrique sur la croissance des bactéries *Escherichia coli*, a observé une inhibition de la croissance due à la présence de sels de platine provenant de l'électrolyse des électrodes (Rosenberg et coll., 1965). Parmi les dérivés du platine testés, le cisplatine s'est avéré ensuite être très efficace pour bloquer la croissance des cellules à division rapide telles que les cellules tumorales. Actuellement, le cisplatine est le médicament le plus utilisé en chimiothérapie humaine, notamment contre les cancers des testicules, des ovaires, de la vessie, et ce malgré les effets secondaires qu'il entraîne (nausées, vomissements, néphrotoxicité, neurotoxicité) et l'émergence d'une résistance cellulaire.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action du cisplatine. La formation d'adduits sur l'ADN, ses effets biochimiques sur la réplication, la transcription et la réparation ainsi que la reconnaissance de ces adduits par des protéines cellulaires permettent de penser que l'ADN est la cible pharmacologique du cisplatine.

I Le cisplatine et l'ADN

1- Réactivité du cisplatine

Lors du passage du cisplatine du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire, la concentration en ions chlorure passe de 100 à 4 mM. Le cisplatine, inactif dans le milieu extracellulaire, perd ses ions Cl^- substitués par des groupements OH ou H_2O pour former des espèces mono aqua et diaqua chargées positivement (fig. 22). A pH physiologique, ces espèces cationiques vont réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN, l'ARN et des protéines (pour revues, Lepre et Lippard, 1990 ; Kartalou et Essigmann, 2001^a)

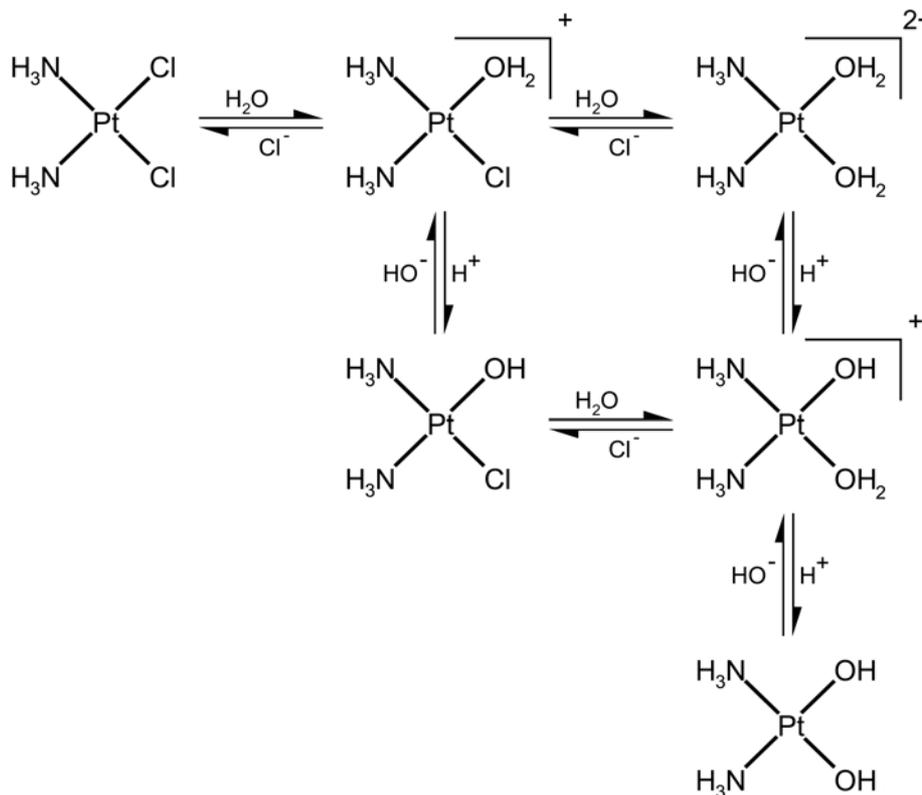


Fig. 22 : Hydrolyse du cisplatine en milieu aqueux (d'après Jennerwein et Andrews, 1995).

90% du cisplatine réagit avec les acides aminés des plasmaprotéines (de Conti et coll., 1973 ; Manaka et Wolf, 1978) possédant un groupement thiol ou thioester (cystéine, méthionine) (Lempers et coll., 1988) et va ainsi être éliminé principalement par les reins (Gormley et coll., 1981). Seulement 2 à 3% du platine libre arrive dans le cytoplasme sous

forme cationique pouvant réagir avec les espèces nucléophiles présentes dans la cellule. Dans le noyau, le cisplatine réagit avec les N7 des guanines et des adénines pour former des adduits bifonctionnels (Lepre et Lippard, 1990).

2- Les adduits du cisplatine

a) Les adduits monofonctionnels

La réaction du cisplatine et du transplatine avec l'ADN se fait en deux étapes. Après formation de la liaison covalente entre un groupement OH et l'azote N7 d'une purine, l'adduit monofonctionnel, instable en solution aqueuse, va évoluer en 2-3 heures vers un adduit bifonctionnel après hydrolyse du second groupement chloro (Bancroft et coll., 1990). La nature transitoire de ce type d'adduits ne permet pas de déterminer sa structure. Les informations sont obtenues par étude des adduits des dérivés du platine tel que le diéthylènechlorotriamineplatine (II) [Pt(dien)Cl] qui ne peut former que des adduits monofonctionnels.

Les adduits monofonctionnels ne représentent que 1 à 2 % des lésions formées par le cisplatine (Eastman, 1983 ; Fichtinger-Schepman et coll., 1985). Aucune torsion de la double hélice n'a été détectée (Bellon et Lippard, 1990) mais la conformation de l'ADN est perturbée au niveau de la lésion. Cette dénaturation locale est influencée par la séquence environnante de la base pontée par le cisplatine (Brabec et coll., 1992, 1994).

b) Les adduits bifonctionnels

Les pontages intrabrins formés entre deux purines présentes sur le même brin d'ADN sont les adduits majoritaires du cisplatine et du transplatine (pour revue, Kartalou et Essigmann, 2001^b). Les adduits 1,2 se forment entre deux purines adjacentes tandis que les adduits 1,3 se forment avec deux purines séparées par une base (fig. 23). Les pontages interbrins se font dans le site d(GC/GC) entre les deux guanines présentes chacune sur un brin d'ADN (Lemaire et coll., 1991 ; Hopkins et coll., 1991).

Les adduits intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) sont les adduits majoritaires formés par le cisplatine (respectivement 65 et 25% de la totalité des adduits du cisplatine). La guanine est dix fois plus réactive avec le cisplatine que l'adénine (Caradonna et coll., 1982). L'orientation de l'adénine présente en 3' de la guanine pontée par le cisplatine ne permet pas la formation d'adduits 1,2-d(GA) (Eastman, 1985).

Les adduits 1,3-d(GpNpG) ne représentent que 5 à 10 % des adduits (Fichtinger-Schepman et coll., 1985 ; Eastman, 1987) tandis que les adduits interbrins et les adduits pontages ADN/protéine sont minoritaires (Plooy et coll., 1984 ; Roberts et Friedlos, 1987) (table II). Les études *in vivo* sur l'ADN de cellules de patients traités au cisplatine donnent les mêmes résultats (Fichtinger-Schepman et coll., 1987).

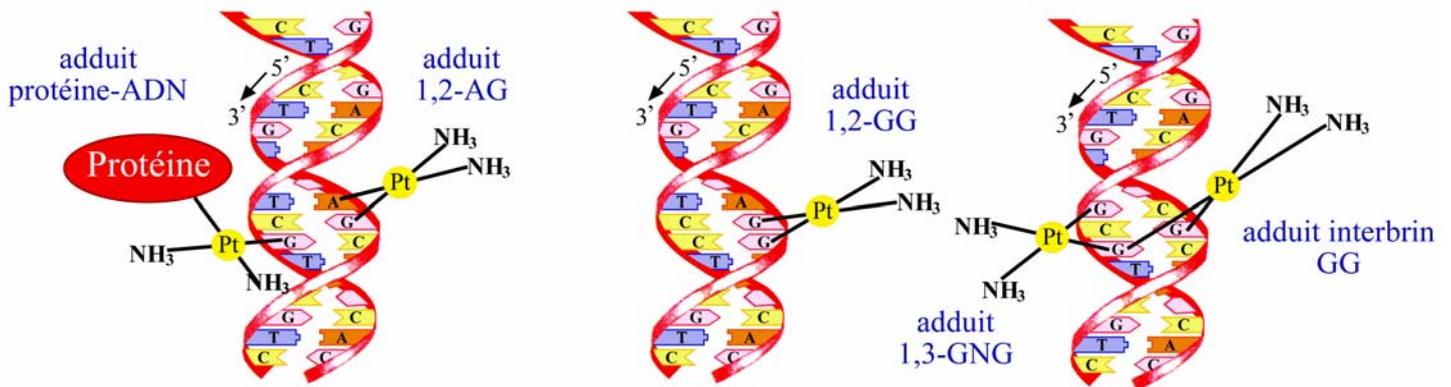


Fig. 23 : Nature des adduits bifonctionnels du cisplatine formés avec l'ADN (d'après thèse de M.A. Elizondo-Riojas, 2001).

A noter que la stéréochimie de l'isomère inactif du cisplatine ne permet pas la formation d'adduits intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) (Lepre et coll., 1987 ; Estman et coll., 1988). Il se forme majoritairement des adduits 1,3-d(GpNpG) et des pontages interbrins (Brabec et Leng, 1993).

3- La structure des adduits du cisplatine

Les altérations structurales de l'ADN dues à la fixation du cisplatine ont été étudiées par gel d'électrophorèse, résonance magnétique nucléaire en solution (RMN) et cristallographie par rayons X. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau II.

Table II : Caractérisation des adduits du cisplatine : pourcentage et déformation de l'ADN pour chaque adduit (d'après Kartalou et coll., 2001^b). Les techniques d'analyses des déformations (torsion et déroulement) sont l'électrophorèse (a), la cristallographie (b) et la résonance magnétique nucléaire en solution (c).

adduit	% de la totalité des adduits	courbure de l'ADN (en °)	déroulement de l'ADN (en °)	références bibliographiques
monofonctionnel	1	0	5 a	Bellon et Lippard, 1990
intrabrin 1,2-d(GpG)	65	32-34 a	13 a	Bellon et Lippard, 1990
		39-55 b		Takahara et coll., 1995
		78 c	25 c	Gelasco et Lippard, 1998
		58 c	21 c	Yang et coll., 1995
intrabrin 1,2-d(ApG)	25	32-34 a	13 a	Bellon et Lippard, 1990
		55 c		Fouchet et coll., 1997
intrabrin 1,3-d(GpNpG)	5-10	25-35 a	23 a	Anin et Leng, 1990 Bellon et Lippard, 1990 Bellon et coll., 1991
		20 c	19 c	van Garderen et van Houte, 1994
interbrin d(G*pC/G*pC)	2	45 a	79 a	Malinge et coll., 1994
		47 b	70 c	Coste et coll., 1999
		20 c	87 c	Huang et coll., 1995
		40 c	76 c	Paquet et coll., 1996

Les duplexes contenant un adduit 1,2-d(GpG) gardent une conformation B, perturbée seulement au niveau du site de platination. La présence de l'adduit 1,2-d(GpG) induit une courbure de l'ADN vers le grand sillon, accompagnée de l'élargissement du petit sillon et du déroulement de l'hélice au niveau du site de platination (fig. 24) (Herman et coll., 1990 ; Yang et coll., 1995 ; Takahara et coll., 1995 ; Gelasco et Lippard, 1998 ; Marzilli et coll., 2001 ; Elizondo-Riojas et Kozelka, 2001.). La paire de bases G/C impliquant la guanine platinée en 5' de l'adduit est mobile du fait de l'oscillation de la cytosine entre ses deux bases voisines (Herman et coll., 1990).

L'étude de simulation moléculaire dynamique, en accord avec les données de cristallographie et de RMN, indique que le site de platination reste rigide tandis que le reste du duplexe est flexible. Les ligands NH₃ du cisplatine interagissent avec les bases entourant l'adduit (formation de liaisons H) et affectent la forme du petit sillon (Elizondo-Riojas et

Kozelka, 2001). Les mouvements, mis en évidence dans cette étude, pourraient permettre à l'ADN platiné de s'adapter aux protéines se fixant sur l'adduit 1,2-d(GpG) (voir § III) et d'adopter la conformation lui demandant la plus faible énergie.

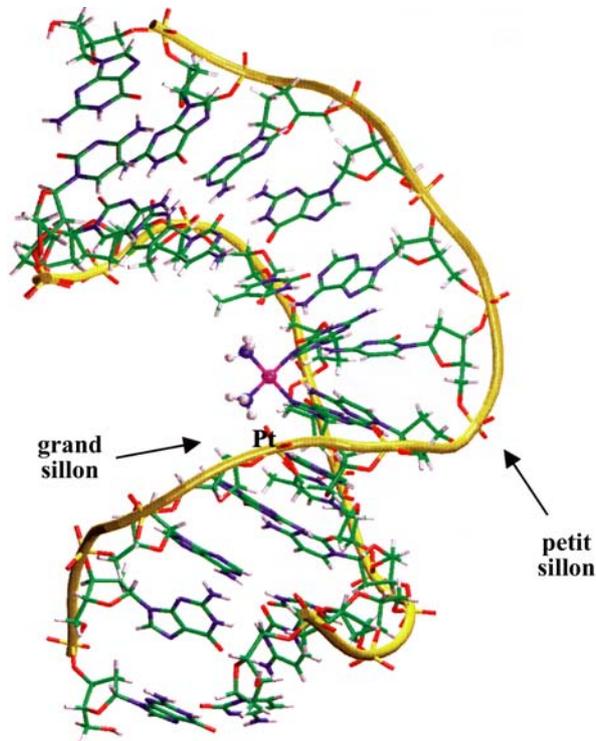


Fig. 24 : Structure de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine (d'après Gelasco et Lippard, 1998). Cette structure est obtenue par analyse par RMN en solution.

La comparaison des structures obtenues par cristallographie et par RMN en solution, en superposant les squelettes sucre/phosphate, révèle une similarité dans la courbure globale de l'hélice. Les différences observées pourraient venir de la cristallographie qui limiterait les degrés de courbure et de déroulement de l'ADN (Gelasco et Lippard, 1998).

Il semble que la nature des bases avoisinant l'adduit 1,2-d(GpG) influence les déformations induites par le pontage des deux guanines adjacentes (Parkinson et coll, 2000).

Peu d'informations sont disponibles sur la structure précise de l'adduit 1,2-d(ApG) dans un duplexe, en comparaison des données disponibles sur l'adduit 1,2-d(GpG). L'adénine et la guanine pontées par le cisplatine sont dans deux plans pratiquement à angle droit, le plan de la guanine étant perpendiculaire au plan du cisplatine (Schröder et coll., 1996). La distorsion de la double hélice localisée au niveau du site de platination de l'adduit 1,2-d(ApG) est plus importante que celle induite par l'adduit 1,2-d(GpG) (Fouchet et coll., 1997).

L'inclinaison de l'adénine platinée A* perturbe la paire de bases A*/T (entraînant l'interruption de la liaison H entre le H3 de T et le N1 de A*) ainsi que les deux paires de bases entourant cette paire A*/T (Fouchet et coll., 1997).

Il semble que cet adduit existe en solution sous deux formes en équilibre (Schröder et coll., 1996).

Les études par RMN en solution de l'adduit 1,3-d(GpTpG) montre un déroulement de l'ADN et une courbure vers le grand sillon, plus prononcée du coté 5' de l'adduit (van Garderen et van Houte, 1994 ; Teuben et coll., 1999). Les paires de bases G/C en 5' de l'adduit et T/A sont dénaturées (Marrot et Leng, 1989). Cette thymine centrale est extrudée dans le petit sillon et l'adénine est empilée avec les deux cytosines flanquantes (van Garderen et van Houte, 1994 ; Teuben et coll., 1999).

Les études par RMN en solution (Huang et coll., 1995 ; Paquet et coll., 1996) et cristallographiques (Coste et coll., 1999) de l'adduit interbrin d(G*pC/G*pC) mettent en évidence la courbure de la double hélice vers le petit sillon ainsi qu'un déroulement important de l'ADN. Les deux cytosines complémentaires sont extrahélicales et se retrouvent exposées au solvant.

Le mécanisme d'action cytotoxique du cisplatine n'est pas complètement élucidé. Les modifications structurales provoquées par le pontage du cisplatine sur l'ADN sont certainement à l'origine de ce mécanisme, car leur présence perturbe les étapes de réplication et de transcription de l'ADN et modifie le comportement de protéines cellulaires qui reconnaissent ces lésions.

II Effets biochimiques des adduits du cisplatine

1- Inhibition de la réplication par le cisplatine

Les études *in vitro* ont montré que les points d'arrêt de l'élongation de l'ADN correspondent aux sites de platination des adduits bifonctionnels du cisplatine et que les

adduits monofonctionnels inhibent peu ou pas la réplication (Pinto et Lippard, 1985 ; Villani et coll., 1988 ; Hoffmann et coll., 1989).

Les adduits intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) bloquent les ADN polymérases procaryotes (pol I, pol III et fragment de Klenow), phagiques (T4 et T7 ADN polymérases), virales (transcriptase réverse du VIH-1) et eucaryotes (Comess et coll., 1992 ; Huang et coll., 1993 ; Hoffmann et coll., 1995, 1996^a, 1996^b, 1997).

Chez les procaryotes, la T4 ADN polymérase est arrêtée plus efficacement par les adduits intrabrins du cisplatine 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG) et 1,3-d(GpCpG) que le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (Comess et coll., 1992). Chez les eucaryotes, les ADN polymérases α , δ , ϵ , κ et λ sont complètement bloquées par les adduits du cisplatine (Villani et coll., 1988 ; Hoffmann et coll., 1995 ; Gerlach et coll., 2001 ; Maga et coll., 2002), même en présence des protéines accessoires PCNA et RPA (Hoffmann et coll., 1995 ; Maga et coll., 2002). Les ADN polymérases humaines β , η et μ sont impliquées *in vitro* dans la réplication d'ADN contenant l'adduit intrabrin majoritaire et introduisent des mutations (Hoffmann et coll., 1995 ; Vaisman et coll., 2000 ; Basset et coll., 2002 ; Havener et coll., 2003), pol η et pol μ étant significativement plus efficaces que pol β (Vaisman et coll., 2000 ; Havener et coll., 2003). Cependant, la polymérase β peut continuer l'élongation des produits de réplication des ADN polymérases α , δ , γ arrêtées au niveau de l'adduit (Hoffmann et coll., 1995).

Les études réalisées en utilisant l'ADN du virus SV40 comme minichromosome modèle ont montré que le cisplatine et le transplatine inhibaient efficacement la réplication quand la même quantité de platine est fixée sur le génome viral. Mais l'inhibition due à l'isomère inactif est transitoire. Cette différence vient du fait que les adduits du transplatine seraient réparés plus efficacement que ceux du cisplatine. Il semble que ces deux composés inhibent fortement la réplication procaryote et eucaryote en se fixant à l'ADN, mais que la réparation de leurs adduits est différente (Cicarelli et coll., 1985).

Des études ont été menées sur le rôle des ADN hélicases dans l'inhibition de la réplication de l'ADN endommagé par le cisplatine (Naegeli et coll., 1993 ; Huang et coll., 1993 ; Villani et Tanguy le Gac., 2000). En effet, les hélicases sont les protéines en tête du complexe de réplication et vont interagir en premier avec les lésions de l'ADN. Leur inhibition par les adduits du cisplatine pourrait conduire au blocage du complexe réplcatif. Il a été montré que les hélicases 3'→5' (protéine UPL9) et 5'→3' du virus *Herpes simplex* ne sont pas inhibées par les adduits 1,2-d(GpG) en présence de la protéine ICP8 (single-strand DNA

binding protein) et peuvent dérouler l'ADN platiné (Villani et coll., 1994 ; Tanguy le Gac et coll., 1998). ICP8 agit en stabilisant le complexe UPI9/ADN pour empêcher sa dissociation (Boehmer, 1998). La capacité de l'hélicase à dérouler l'ADN endommagé pourrait participer au mécanisme permettant la réplication translésionnelle de l'adduit majoritaire du cisplatine (Villani et Tanguy le Gac, 2000).

Il est admis que la réplication translésionnelle est nécessaire pour rendre compte des propriétés mutagènes du cisplatine. On pense qu'en fonction de la nature de l'ADN polymérase impliquée, la réplication pourra être fidèle (par incorporation des bases complémentaires en face de l'adduit) ou mutagène.

2- Réplication translésionnelle et mutagenicité du cisplatine

a) Chez les procaryotes

Chez *Escherichia coli*, le cisplatine induit le système SOS qui conduit à l'effet mutagène de la drogue (Caillet-Fauquet et coll., 1977 ; Rajagopalan et coll., 1992 ; Becherel et Fuchs, 1999 ; Bhattacharyya et Beck, 2002). L'induction précoce du système SOS pourrait aboutir à l'augmentation des activités de réparation de l'ADN dans le but d'enlever les adduits du cisplatine et à la synthèse translésionnelle par certaines ADN polymérases à l'origine de la tolérance des adduits (Bhattacharya et Beck, 2002). Les ADN polymérases impliquées dans ce phénomène sont les polymérases pol II (Rajagopalan et coll., 1992) et pol V qui appartient au système SOS(complexe protéique UmuD'₂C) (Tang et coll., 1998, 1999).

Il a été montré que le cisplatine induit efficacement *in vivo* des mutations lorsque le système SOS est activé (Burnouf et coll., 1987, 1990 ; Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1994, 1995). Ces mutations sont localisées principalement au niveau des séquences d(ApG) et d(GpG) (Burnouf et coll., 1987, 1990 ; Cariello et coll., 1992 ; Bradley et coll., 1993), l'adduit 1,2-d(ApG) étant cinq fois plus mutagène que l'adduit 1,2-d(GpG) (Burnouf et coll., 1987 ; Yarema et coll., 1995). Les mutations sont essentiellement des transversions A→T et G→T plus souvent localisées au niveau de la purine platinée en 5' de l'adduit qu'en 3' de l'adduit (Burnouf et coll., 1987 ; Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1994, 1995). Ces derniers résultats peuvent être reliés à la torsion de l'ADN au niveau des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG), plus prononcée du côté 5' de l'adduit que du côté 3' (Marrot et Leng., 1989 ; Herman et coll., 1990 ; Fouchet et coll., 1997).

b) Chez les eucaryotes

Différentes études montrent que la synthèse translésionnelle des adduits du cisplatine se produit *in vivo* et est augmentée dans les lignées cellulaires HeLa et de carcinomes résistantes au cisplatine (Pillaire et coll., 1994 ; Gibbons et coll., 1991 ; Mamenta et coll., 1994 ; Vaisman et coll., 1998).

Les mutations observées le plus fréquemment sont des insertions/délétions d'une base et des substitutions localisées au niveau des sites d(ApG), d(GpG), d(AGG) et d(GAG) (de Boer et Glickman, 1989 ; Mis et Kunz, 1990 ; Bublely et coll., 1991). Contrairement aux études sur *E. coli*, des substitutions de bases (majoritairement des transversions G→T) sont localisées de une à quelques bases de l'adduit 1,2-d(GpG), principalement en 3' de l'adduit (Pillaire et coll., 1994 ; Chaney et Vaisman, 1999). Des délétions de fragments d'ADN induites par le cisplatine ont aussi été observées (Bublely et coll., 1991 ; Cizeau et coll., 1994).

L'ADN polymérase β est l'une des polymérases impliquées dans la mutagenèse du cisplatine (Hoffmann et coll., 1996^a, Chaney et Vaisman, 1999). Une augmentation de son taux cellulaire, corrélée à l'augmentation du taux de mutations, pourrait avoir un rôle dans la prédisposition au cancer et/ou la progression des tumeurs (Canitrot et coll., 1998, 1999 ; Gomi et coll., 1996). De plus, une augmentation de son expression et de son activité a été mise en évidence dans des cellules humaines de tumeur ovarienne résistantes au cisplatine (Canitrot et coll., 1998 ; Bergoglio et coll., 2001).

Les résultats des études sur les mutations induites par les adduits 1,3-d(GpNpG) dans les cellules eucaryotes et procaryotes ne sont pas très clairs car certaines équipes montrent que ces adduits ne sont pas mutagènes (Burnouf et coll., 1987 ; Mis et Kunz, 1990) en contradiction avec les résultats de Brouwer et coll. (1981) et de Yarema et coll. (1994, 1995).

3- Effets du cisplatine sur la transcription

Pour expliquer l'arrêt en phase G₂ induit par le cisplatine, Sorenson et Eastman (1988, 1990) suggèrent que la mort cellulaire induite par la drogue pourrait être une conséquence de l'incapacité des cellules traitées à transcrire les gènes nécessaires à leur entrée en mitose.

Les études *in vitro* ont montré que les adduits du platine provoquent un blocage de la phase d'élongation de la synthèse de l'ARN (Corda et coll., 1991). Les lésions bifonctionnelles du cisplatine bloquent l'ARN polymérase d'*E. coli* et l'ARN polymérase de germe de blé (Corda et coll., 1991), l'adduit 1,2-d(GpG) ayant plus d'effet que l'adduit 1,2-

d(ApG) (Corda et coll., 1992). Les adduits du transplatine et les adduits monofonctionnels n'empêchent pas la synthèse d'ARN par les ARN polymérase.

In vivo, les adduits du cisplatine inhibent deux à trois fois plus la transcription que les adduits du transplatine (Mello et coll., 1995). Cette différence n'est pas due à la réparation des lésions du transplatine par le système de réparation par excision des nucléotides mais au fait que 60 à 76 % des adduits du transplatine sont transcrits, contre moins de 17 % des adduits du cisplatine (Mello et coll., 1995).

Il a été montré *in vitro* que les cellules traitées par le cisplatine induisent l'ubiquitination de l'ARN polymérase II et sa dégradation (Bregman et coll., 1996). L'ARN polymérase II reste fixée sur les adduits du cisplatine, ce qui arrêterait la transcription et empêcherait la réparation couplée à la transcription de ces lésions (Lee et coll., 2002).

L'action du cisplatine sur l'activité des promoteurs semble être sélective puisque cette activité peut être réprimée dans certains cas (Evans et Gralla, 1992) ou augmentée dans d'autres cas (Zoumpourlis et coll., 1992). Par exemple, Treiber et coll. (1994) ont montré que les adduits du cisplatine détournent le facteur de transcription hUBF (human Upstream Binding Factor) de son promoteur en le séquestrant, tandis que les adduits du transplatine ne sont pas reconnus par hUBF. Une conséquence de cette séquestration serait la diminution de la synthèse des ARN ribosomiaux, ce qui pourrait expliquer que le cisplatine soit préférentiellement cytotoxique pour les cellules à division rapide (Treiber et coll., 1994 ; Jordan et Carmo-Fonseca, 1998). De plus, l'accessibilité des adduits du cisplatine reconnus par hUBF devient impossible pour que la réparation ait lieu (Treiber et coll., 1994). Le facteur de transcription TBP (TATA Binding Protein) pourrait être aussi piégé par les adduits du cisplatine (Vichi et coll., 1997 ; Coin et coll., 1998 ; Jung et coll., 2001), ce qui inhiberait totalement la transcription. Un autre facteur de transcription, la protéine YB-1 (Y-box binding protein), reconnaît les adduits 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG) et 1,3-d(GpNpG) et serait ainsi détourné de sa séquence cible (Ise et coll., 1999).

Les adduits du cisplatine semblent donc perturber la transcription à différents niveaux : en bloquant les ARN polymérase et en piégeant certains facteurs de transcription, les empêchant ainsi de se fixer sur leurs promoteurs pour agir sur la structure chromatinienne (Mymrik et coll., 1995).

III Reconnaissance des adduits du cisplatine par les protéines cellulaires

Les déformations structurales de l'ADN induites par les adduits du cisplatine sont reconnues par des protéines cellulaires tels que les protéines à boîtes HMG et les protéines intervenant dans la réparation de l'ADN. Ces interactions ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années pour comprendre leurs rôles dans la cytotoxicité du cisplatine (pour revues, Zamble et Lippard, 1999 ; Cohen et Lippard, 2001 ; Kartalou et Essigmann, 2001^b).

1- Les protéines à boîte HMG

La recherche de protéines interagissant avec les adduits du cisplatine a permis d'isoler les protéines SSRP1 (Structure Specific Recognition Protein) (Toney et coll., 1989 ; Bruhn et coll., 1992), HMG-1 et 2 humaines (Hughes et coll., 1992 ; Billings et coll., 1992), HMG-1 de rat (rHMG) (Pil et Lippard, 1992), tsHMG de souris (Ohndorf et coll., 1997), le facteur SRY humain (Trimmer et coll., 1998) et les facteurs de transcription hUBF (voir § précédent) et Ixr1 de levure (Brown et coll., 1993^a ; McA'Nulty et coll., 1996). Toutes ces protéines appartiennent à la famille des protéines à boîtes HMG (pour High Mobility Group Protein).

Il existe deux classes de protéines à domaines HMG :

- la classe 1 comprend les protéines ayant au moins deux boîtes HMG. Elles se fixent sur des structures particulières de l'ADN (courbures, jonctions de Hollyday, boucles...).
- la classe 2 comprend les protéines ne possédant qu'une seule boîte HMG. Elles se fixent de façon séquence spécifique et reconnaissent aussi des structures particulières de l'ADN.

Les protéines à boîte HMG semblent intervenir dans la cytotoxicité du cisplatine et de certains de ses dérivés. Elles reconnaissent fortement les adduits majoritaires du cisplatine ainsi que les adduits des dérivés cliniquement actifs (DACH Pt, iproplatine et carboplatine) (Donahue et coll., 1990 ; Andrews et Jones, 1991 ; Billings et coll., 1992 ; Treiber et coll., 1994) tandis que les adduits monofonctionnels et les adduits 1,3-d(GpNpG) du transplatine ne sont pas reconnus (Donahue et coll., 1990 ; Andrews et Jones, 1991 ; Pil et Lippard, 1992). Les protéines rHMG-1 (HMG-1 de rat), tsHMG (testis-specific HMG) et SRY (testis-determining factor) inhibent *in vitro* et *in vivo* la réparation par excision de nucléotides des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) du cisplatine mais pas des adduits 1,3-d(GpTpG) (Brown

et coll., 1993^a ; Huang et coll., 1994 ; Zamble et coll., 1995, 1996 ; McA'Nulty et coll., 1996 ; Trimmer et coll., 1998). L'hypothèse proposée est que les protéines HMG protègent ces adduits de la réparation par le système REN et leur permettent ainsi de persister (Zamble et coll., 1995). Cependant, S.J. Lippard et son équipe montrent récemment que les cellules embryonnaires de souris déficientes en protéines Hmgb1 ne sont pas plus sensibles au cisplatine que les cellules non mutées, ce qui est en contradiction avec les résultats précédents. S.J. Lippard propose que l'effet cytotoxique du cisplatine médié par Hmgb pourrait dépendre du type cellulaire (Wei et coll., 2003).

rHMG-1 se fixe préférentiellement sur l'ADN ayant une structure mimant la fourche de réplication et contenant un adduit 1,2-d(GpG) et inhibe la réplication translésionnelle (Hoffmann et coll., 1997 ; Vaisman et coll., 1999). Une autre conséquence de l'interaction entre les protéines à boîte HMG et les adduits du cisplatine est le détournement de certains facteurs de transcription appartenant à cette famille protéique (voir § précédent).

Enfin, la protéine HMG-1 interagit *in vivo* avec la protéine p53 impliquée dans le déclenchement de l'apoptose (Imamura et coll., 2001). La présence de protéines HMG-1 augmente la fixation de p53 sur l'ADN et stimule son activité de transactivation. HMG-1, en se fixant fortement sur les adduits majoritaires du cisplatine, pourrait permettre l'interaction entre p53 et l'adduit et participer au déclenchement d'un signal apoptotique (Jayaraman et coll., 1998). Mais ce mécanisme est peu clair puisqu'il a aussi été montré que la fixation de HMG-1 sur l'ADN modifié par le cisplatine est stimulée *in vitro* en présence de p53 (Imamura et coll., 2001).

2- Protéines de réparation et cisplatine

Pour essayer de comprendre le mécanisme cytotoxique du cisplatine, les études ont notamment porté sur la réparation des adduits du cisplatine. Quelque soit le système de réparation impliqué dans l'effet du cisplatine, une étape ayant fait l'objet de nombreuses études est la reconnaissance des adduits du cisplatine. Des études reliant la sensibilité des cellules procaryotes et eucaryotes déficientes pour les protéines appartenant à différents systèmes de réparation au cisplatine ont permis de mettre en évidence les systèmes de réparation modulant l'effet cytotoxique de la drogue.

a) Les protéines impliquées dans le système REN

Les cellules déficientes pour l'une des protéines impliquées dans le système REN procaryote sont sensibles au cisplatine (Beck et coll., 1985 ; Tanaka et coll., 1998). Le complexe protéique UvrAB se fixe sur les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine et l'endonucléase coupe l'ADN en 5' et en 3' de l'adduit (Visse et coll., 1991 ; Brandsma et coll., 1996).

Chez les eucaryotes, plusieurs protéines du système REN ont un rôle dans l'effet cytotoxique du cisplatine. C'est le cas de la protéine XPA, impliquée dans la reconnaissance des lésions de l'ADN réparées par le système REN. Elle interagit avec les protéines ERCC1 (Li et coll., 1994 ; Park et Sancar, 1994), RPA (Matsuda et coll., 1995) et le complexe protéique TFIIH (Park et coll., 1995), qui interviennent dans la réparation par excision de nucléotides. Il a été montré que les cellules XPA⁻ sont plus sensibles au cisplatine que les cellules sauvages (Poll et coll., 1984 ; Dijt et coll., 1988) et que XPA reconnaît l'ADN modifié globalement par le cisplatine (Jones et Wood, 1993 ; Kuraoka et coll., 1996).

La protéine RPA a été détectée dans un complexe avec l'ADN modifié par le cisplatine (Clugston et coll., 1992). Elle reconnaît les adduits 1,3-d(GpTpG) avec une grande affinité ainsi que les adduits 1,2-d(GpG) (Patrick et Turchi, 1998). Ces adduits 1,3-d(GpTpG) sont mieux réparés par le système REN que les adduits 1,2-d(GpG). De plus, le complexe RPA/XPA se fixe mieux sur l'adduit 1,3-d(GpTpG) que RPA seule ou XPA seule (Schweizer et coll., 1999 ; Hey et coll., 2001). Cette protéine semble avoir un rôle majeur dans la reconnaissance des adduits du cisplatine réparés par le système REN. Mais le fait que RPA reconnaisse mieux un simple brin d'ADN non endommagé que l'ADN platiné (Patrick et Turchi, 1998) suggère que cette protéine protège le brin non modifié de l'excision et permet ainsi une discrimination du brin à réparer (Evans et coll., 1997 ; de Laat et coll., 1999).

Les cellules déficientes pour la protéine ERCC1 sont aussi sensibles au cisplatine (Lee et coll., 1993). De plus, l'expression des ARNm ERCC1 est plus élevée dans des cellules tumorales résistantes au cisplatine, suggérant que cette protéine a un rôle dans la réparation des adduits du cisplatine (Dabholkar et coll., 1992, 1994).

La protéine XPE (ou protéine UV-DDB) reconnaît les adduits du cisplatine mais pas ceux du transplatine (Payne et Chu, 1994). De plus, les cellules humaines XPE⁻ sont sensibles au cisplatine (Poll et coll., 1984) et la résistance de cellules humaines tumorales au cisplatine est corrélée à l'augmentation de l'expression de XPE induite après traitement au cisplatine (Chu et Chang, 1990 ; Vaisman et Chaney, 1995).

b) Reconnaissance de l'ADN platiné par une protéine du système REB

In vitro, la protéine 3-méthyle-adénine DNA glycosylase (AAG) reconnaît et initie l'excision de nombreuses bases modifiées dont la 1,N6-éthèneadénine (Wyatt et coll., 1999). Cette protéine reconnaît les adduits 1,2-d(ApG) > 1,2-d(GpG) > 1,3-d(GpTpG) avec des k_d apparents compris entre 71 et 144 nM mais ne déclenche pas leur excision (Kartalou et coll., 2000). De plus, la présence de l'un de ces trois adduits du cisplatine semble inhiber l'excision de la 1,N6-éthèneadénine. Ainsi, la présence d'un adduit du cisplatine modifie le comportement de la protéine AAG et semble la détourner de l'une de ses cibles naturelles (Kartalou et coll., 2000).

c) Les protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin

Les cellules DNA-PK⁻ sont sensibles au cisplatine (Muller et coll., 1998) tandis que le niveau d'expression de Ku est retrouvé plus élevé dans des cellules de leucémie murine résistantes au cisplatine (Frit et coll., 1999). La présence d'adduits du cisplatine sur l'ADN n'empêche pas la protéine Ku de se fixer à l'ADN mais diminue sa capacité à transloquer (Turchi et coll., 2000). En plus de cet effet négatif sur l'association de Ku avec DNA-PK_{CS}, les complexes DNA-PK formés sont inactifs (Turchi et coll., 1996, 1997 ; Frit et coll., 1999) par réduction de la constante catalytique (K_{cat}) induite par la présence des adduits du cisplatine (Turchi et coll., 2000).

d) Les protéines impliquées dans le système MMR

Le système de réparation mismatch repair (MMR) est impliqué dans la réparation des insertions/délétions de bases et des mésappariements présents sur l'ADN. De nombreuses études montrent que ce système intervient dans la cytotoxicité de différentes drogues telles que le cisplatine (Fram et coll., 1985 ; Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996), la doxorubicine (Drummond et coll., 1996), les agents alkylants (Kat et coll., 1993 ; Branch et coll., 1993) (voir chap. I VII). Le système MMR intervient aussi dans la reconnaissance des lésions composées des dimères de thymines (Mu et coll., 1997 ; Wang et coll., 1999^b), des 8-oxoguanines (Ni et coll., 1999 ; Mazurek et coll., 2002) et des O4-méthyle-guanines et O6-méthyle-guanines (Duckett et coll., 1996 ; Rasmussen et Samson, 1996).

Les résultats mettant en évidence l'implication du système de réparation MMR dans la cytotoxicité du cisplatine sont présentés dans le chapitre IV.

3- La protéine histone H1

Cette protéine histone, abondante et ubiquitaire, permet la compaction de l'ADN en scellant les nucléosomes. Elle reconnaît fortement l'ADN modifié globalement par le cisplatine, mais pas les adduits du transplatine (Yaneva et coll., 1997).

CHAPITRE IV : IMPLICATION DU SYSTEME MMR DANS LA CYTOTOXICITE DU CISPLATINE

Bien que largement utilisé en chimiothérapie humaine, l'efficacité clinique du cisplatine est fréquemment limitée par l'émergence de populations cellulaires résistantes à la drogue. Il est donc d'un grand intérêt de comprendre le mécanisme qui permet au cisplatine de tuer les cellules résistantes afin de trouver des dérivés du cisplatine.

I Mises en évidence de la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR

▫ Les expériences de Fram et coll. (1985) ont révélé pour la première fois chez *E. coli* que les doubles mutants $Dam^-/MutS^-$ et $Dam^-/MutL^-$ sont résistants au cisplatine alors que les cellules déficientes au niveau de la Dam méthylase (mutants Dam^-) sont hypersensibles. De plus, le taux d'excision des adduits du cisplatine est significativement réduit dans les cellules Dam^- par rapport aux cellules non mutées (Fram et coll., 1985).

▫ Les études *in vitro* et *in vivo* sur des cellules ovariennes humaines cancéreuses montrent que des mutations de certains gènes du système MMR contribuent à une résistance au cisplatine. Ces gènes sont *hMSH2* et *hMLH1* (Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996, 1997), *hPMS2* (Drummond et coll., 1996) et *hMSH6* (Vaisman et coll., 1998), ce qui suggère que les protéines hMutS α et/ou hMutL α sont impliquées dans la cytotoxicité du cisplatine (Fink et coll., 1997).

Pour renforcer cette hypothèse, Fink et coll. (1996) ont montré que les cellules déficientes en protéines hMSH2 et hMLH1 sont environ deux fois plus résistantes au cisplatine que les cellules sauvages. La complémentation par transfert d'un chromosome portant une copie fonctionnelle du gène touché (chromosome 2 pour le gène *hMSH2* et chromosome 3 pour le gène *hMLH1*) reverse la résistance de ces cellules au cisplatine.

Il semble qu'un faible niveau de résistance soit suffisant pour qu'une tumeur ne réponde plus *in vivo* au traitement par le cisplatine (Andrew et coll., 1990), en accord avec les facteurs de résistance mis en évidence par Aebi et coll. (1996) et Fink et coll. (1996).

II Les modèles proposés pour expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine

Le système MMR est quantitativement important dans la cytotoxicité de différentes drogues telles que le MNNG, le MNU, le cisplatine, la doxorubicine qui induisent des lésions à l'ADN (voir chap. I VII). Les études biochimiques et génétiques menées sur l'interaction des protéines du système MMR avec ces lésions et sur la sensibilité des cellules MMR⁻ exposées aux agents alkylants, drogues ou radiations ionisantes responsables de ces lésions ont permis l'élaboration de différents modèles (résumés fig. 25) proposés pour expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine (pour revues, Brown, 1999 ; Lage et Dietel, 1999 ; Karran, 2001 ; Bellacosa, 2001^a).

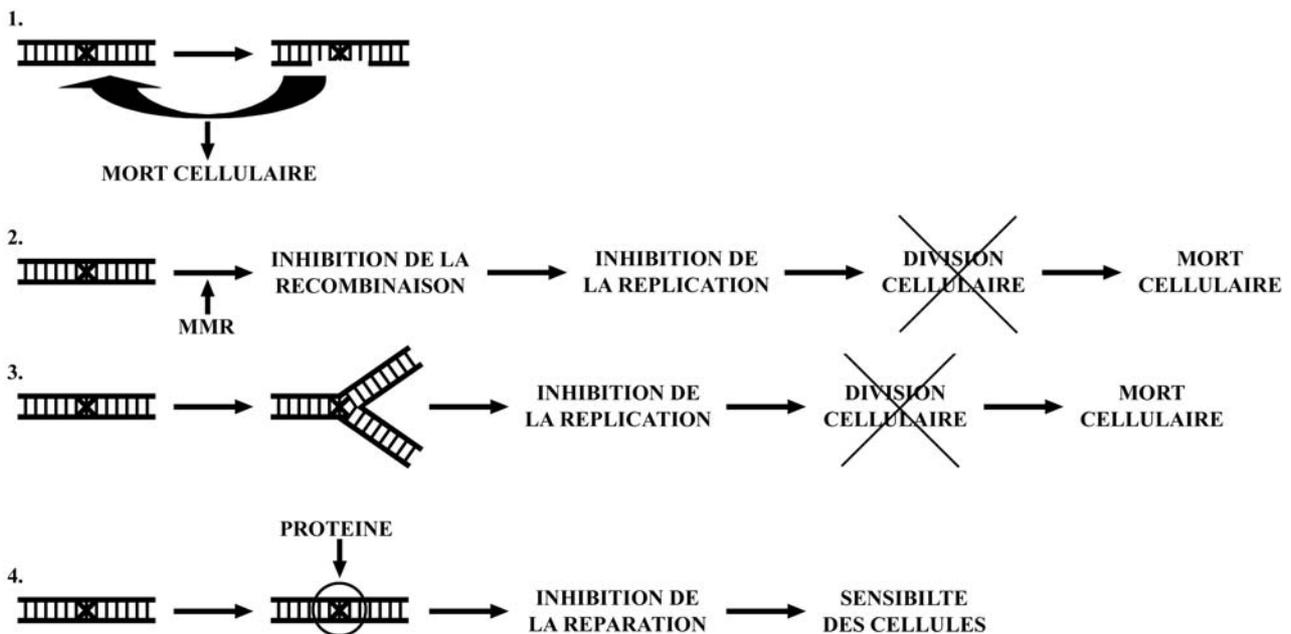


Fig. 25 : Résumé des modèles proposés pour expliquer la mort médiée par le système MMR des cellules exposées au cisplatine (adapté de Brown, 1999). 1- Déclenchement d'un cycle futile d'excision et de resynthèse du brin néosynthétisé après détections répétitives de l'adduit du cisplatine par la protéine MutS. 2- Inhibition de la réplication par recombinaison du fragment d'ADN contenant un adduit du cisplatine. 3- Inhibition de la réplication par blocage du complexe de réplication par les protéines du système MMR. 4- Inhibition de la réparation des adduits du cisplatine médiée par le système REN.

1- Le modèle du cycle futile

Ce modèle a été proposé au départ pour expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité d'agents alkylants (MNNG, MNU) conduisant à la formation de lésions du type

O6-MetG (Kat et coll., 1993 ; Branch et coll., 1993 ; Karran et Bignami, 1994). Les protéines du système MMR reconnaissent l'adduit du cisplatine présent sur le brin matrice et réparent la portion de brin néosynthétisé contenant la base non complémentaire en face de l'une des deux purines pontées par le cisplatine, incorporée lors de la réplication translésionnelle de l'adduit du cisplatine.

Tant que l'adduit persiste sur le brin matrice, l'insertion de nouvelles bases au hasard aboutit à la formation de composés de lésions (ou produits de lésions) du cisplatine. Le système MMR reconnaît le mésappariement et déclenche de façon répétée la réparation pour enlever la base mésappariée dans le brin néosynthétisé. Ce "cycle futile" d'excision/resynthèse (fig. 26) générerait des brèches et des cassures dans l'ADN (lésions secondaires) (Anthony et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996 ; Drummond et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996). Les systèmes de réparation de l'ADN comme les systèmes de réparation par recombinaison se trouvent saturés et dans l'incapacité de réparer la totalité des cassures dont l'accumulation pourrait être un signal induisant la mort de la cellule.

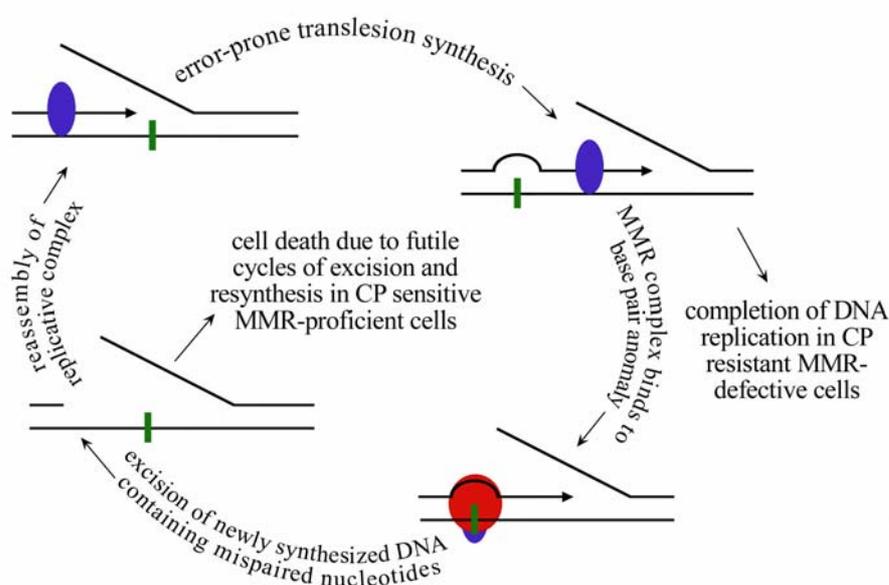


Fig. 26 : Cycle futile d'excision/resynthèse de l'ADN proposé pour expliquer la contribution du système de réparation MMR à la cytotoxicité du cisplatine (d'après Vaisman et coll., 1998).

Si le système MMR est défectueux, le cycle futile n'est pas déclenché. En effet, l'ADN contenant l'adduit du cisplatine sera répliqué, et la base mésappariée ne sera pas détectée et/ou enlevée par le système MMR. Il n'y a pas accumulation de lésions secondaires et les signaux induisant la mort cellulaire découlant du cycle futile ne sont pas générés. Les

cellules deviennent résistantes au cisplatine. Ce modèle est en accord avec la corrélation faite entre la perte du système MMR et l'augmentation de la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine (Vaisman et coll., 1998).

2- Intervention de la recombinaison contrôlée par le système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine

La recombinaison est une voie de réparation de l'ADN contrôlée par le système MMR (voir chap. I VI). De récentes études mettent en évidence l'implication de ce système de réparation dans la cytotoxicité du cisplatine (Durant et coll., 1999 ; Zdraveski et coll., 2000). En effet, les souches cellulaires de *S. cerevisiae* déficientes en protéine Rad52, impliquée dans la recombinaison mitotique et méiotique (Petes et coll., 1991), et les doubles mutants Rad52⁻/MSH2⁻, Rad52⁻/MLH1⁻ et Rad52⁻/MLH2⁻ présentent la même sensibilité au cisplatine (Durant et coll., 1999). Ces résultats suggèrent que la résistance au cisplatine médiée par le système MMR est dépendante de la protéine Rad52 et démontrent l'implication de processus dépendant de la recombinaison dans la tolérance des lésions induites par la drogue (Durant et coll., 1999). De même chez *E. coli*, l'inactivation des protéines RecA et RecBC, impliquées dans les mécanismes recombinationnels, est corrélée à la sensibilité des cellules au cisplatine (Zdraveski et coll., 2000, 2002).

L'équipe de R. Brown propose un modèle permettant d'expliquer la résistance des cellules exposées au cisplatine dépendant du système MMR et de la recombinaison. Différentes études menées sur les protéines eucaryotes et procaryotes suggèrent que le système MMR est responsable du contrôle de la recombinaison afin que celle-ci n'est pas lieu entre séquences divergentes ou n'introduise pas de mésappariements (de Wind et coll., 1995, Evans et coll., 2000, Worth et coll., 1994 ; Fabisiewicz and Worth, 2001). La perte du système MMR pourrait permettre la réplication de l'ADN malgré la présence d'adduits du cisplatine grâce à un mécanisme de réplication recombinationnelle. Ce modèle est aussi en accord avec les résultats de S.J. Chaney et son équipe mettant en évidence une corrélation entre la perte du système MMR et l'augmentation de la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine (Vaisman et coll., 1998).

3- Inhibition de la réplication par le système MMR

Une autre hypothèse propose que la présence des adduits du cisplatine provoque l'inhibition de la réplication dans un mécanisme dépendant du système MMR à l'origine de la mort cellulaire (Karran, 2001). hMutS α reconnaît l'adduit majoritaire du cisplatine (Duckett et coll., 1996 ; Mello et coll., 1996 ; Mu et coll., 1997) et des composés de lésions de cet adduit (Yamada et coll., 1997). La présence de cette protéine sur l'ADN pourrait bloquer la fourche de réplication, l'arrêt de la fourche générant des cassures double brin (CDB) (Seigneur et coll., 1998). Or le système MMR intervient dans le contrôle de la réparation par recombinaison des CDB. Il n'est donc pas impossible que l'implication du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine reflète la capacité de ce système à produire indirectement des lésions secondaires et à interdire leur réparation médiée par les différents systèmes de recombinaison (Karran, 2001).

Une autre hypothèse sur l'induction de la mort cellulaire induite par l'inhibition de la réplication médiée par le système MMR est que les protéines du système de réparation des mésappariements stabilisent le complexe de réplication au niveau de la lésion de l'ADN. Dans ce modèle, le système MMR est impliqué dans le déclenchement de l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G₂ (Hawn et coll., 1995, Carethers et coll., 1996). En effet, la croissance des cellules MMR⁺ exposées au MNNG ou ayant des lésions 6-thioG s'arrête en phase G₁ et en phase G₂ tandis que la croissance des cellules MMR⁻ ne s'arrête plus qu'en phase G₂ après exposition à ces deux drogues, au cisplatine et aux radiations ionisantes (Brown et coll., 1997 ; Davis et coll., 1998). Une corrélation a été faite entre la perte de l'apoptose des cellules MMR⁻ résistantes au cisplatine et un défaut de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂ (Fink et coll., 1996). L'arrêt en phase G₂ pourrait permettre aux cellules de réparer les lésions présentes sur l'ADN ou empêcher la réplication. Les protéines du système MMR fixées sur les adduits du cisplatine pourraient bloquer la machine de réplication et inhiber la division cellulaire, à l'origine de l'arrêt des cellules en phase G₂ dépendant du système MMR (pour revue, Brown, 1999 ; Lage et Dietel, 1999).

4- Inhibition de la réparation

La réparation des adduits du cisplatine par le système REN est un processus qui module la sensibilité des cellules traitées au cisplatine. Chez *E. coli*, les cellules déficientes au

niveau de l'une des protéines impliquées dans le système UvrABC (système de réparation par excision de nucléotides procaryote) sont hypersensibles aux effets toxiques du cisplatine (Beck et coll., 1985).

La fixation des protéines du système MMR sur les adduits du cisplatine pourraient protéger ces adduits de la réparation *via* le système REN (Mello et coll., 1996) permettant aux lésions du cisplatine de persister sur l'ADN. Une déficience du système MMR serait accompagnée d'une augmentation de la réparation, à l'origine de la tolérance des cellules MMR⁻ exposées au cisplatine (pour revue, Lage et Dietel, 1999).

III Induction directe de l'apoptose impliquant le système MMR

La reconnaissance d'une lésion de l'ADN par les protéines du système MMR pourrait induire un signal déclenchant l'apoptose (pour revue, Karran, 2001 ; Fishel, 2001). Deux voies de transduction du signal semblent impliquées dans ce mécanisme.

1- La voie de transduction du signal impliquant la protéine p53

En réponse aux dommages de l'ADN induits par les agents méthylants, le système MMR est impliqué dans la phosphorylation du produit du gène activateur de l'apoptose p53 (Duckett et coll., 1999). D'autres études permettent de relier indirectement p53 au système MMR. En effet, p53 interagit physiquement avec la protéine BRCA1, produit du gène de susceptibilité de cancer ovarien et du sein, BRCA1 agissant comme un coactivateur de p53 (Ouchi et coll., 1998 ; Zhang et coll., 1998). Or BRCA1 interagit aussi avec les protéines du système MMR dans un supercomplexe BASC dont le rôle est de surveiller l'ADN afin de détecter l'apparition de lésions (Wang et coll., 2000).

Aucune étude ne démontre l'implication de p53 dans le déclenchement de l'apoptose MMR-dépendante lorsque les cellules sont exposées au cisplatine. Cependant, dans différents types cellulaires, p53 apparaît avoir un rôle important dans l'apoptose induite par le cisplatine (Zamble et coll., 1998). De plus, une augmentation du niveau d'expression de p53 a été mise

en évidence dans plusieurs lignées cellulaires humaines issues de cancers ovariens résistantes au cisplatine (Brown et coll., 1993^b ; Fajac et coll., 1996).

2- La voie de transduction du signal impliquant la protéine p73

L'activation des kinases c-Abl et JNK (c-jun NH₂-terminal kinase) par le cisplatine requiert un système MMR fonctionnel (Nehmé et coll., 1997; Fink et coll., 1998). De plus, le déclenchement de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose provoqué par le cisplatine implique le suppresseur de tumeur p73 (Gong et coll., 1999). Le cisplatine induit une augmentation d'expression de p73 qui semble être dépendant du système MMR et de la tyrosine kinase c-Abl (Gong et coll., 1999). Ces résultats suggèrent que c-Abl et JNK appartiennent à une voie de transduction activée *via* le système MMR reconnaissant les adduits du cisplatine dans l'ADN (Fink et coll., 1998), cette voie dépendant de p73 (Gong et coll., 1999). De plus, les récents travaux de l'équipe de R.D. Kolodner mettent en évidence une interaction entre PMS2 et p73 stimulée par le cisplatine. Leurs résultats renforcent l'idée de l'implication des protéines du système MMR dans le déclenchement de l'apoptose p73-dépendante induite par le cisplatine (Shimodaira et coll., 2003).

En conclusion, le cisplatine induit l'apoptose *via* une voie p53-dépendante et une voie p53-indépendante activée par p73 et le système MMR. Cette seconde voie est importante en chimiothérapie car environ 50% des cellules cancéreuses sont déficientes dans la voie p53.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I Préparation des sondes utilisées

1- Préparation des oligonucléotides simples brins

a) Purification des oligonucléotides simples brins de 24 bases

Les oligonucléotides simples brins 24-mer (voir séquences fig.1 article JBC) (Amersham Pharmacia Biotech) sont purifiés par gel de polyacrylamide (1,5 mm d'épaisseur) en conditions dénaturantes (gel 24% 19:1 acrylamide:bisacrylamide; 7 M urée; 1 TBE (89 mM Tris-HCl pH 7.5; 89 mM borate; 2 mM EDTA pH 8)) et à température ambiante. 6 DO de chaque oligonucléotide en solution dans l'eau sont mis à sec par Speed Vac avant d'être repris dans 20 µl d'une solution aqueuse de 60% formamide. Après une préélectrophorèse de 15 minutes, les échantillons sont déposés sur le gel sans tension. La migration se fait sous une tension de 20W pendant 3 heures. Dans ces conditions, le marqueur de migration xylène cyanol (XC) doit migrer sur une distance minimale de 15 cm.

Les bandes correspondantes aux 24-mers sont visualisées par méthode d'ombrage (UV de Shadowing) puis découpées. L'ADN simple brin est élué une nuit à 4°C dans 500 µl de 0.5 TBE. Pour récupérer l'ADN sans sels, chaque échantillon est dessalé par précipitation à l'acétate de sodium (0.3 M). L'échantillon séché est repris dans 500 µl d'H₂O pure. Sa concentration est déterminée par spectrométrie d'absorption (UVIKON, Kontron Instruments). La rendement de purification est d'environ 50%.

Une fois l'ADN purifié et repris dans l'eau, nous vérifions sa pureté en le déposant sur un gel en conditions dénaturantes (24% 19:1 acrylamide:bisacrylamide; 7M Urée; 1 TBE; 0.45 mm d'épaisseur). Pour ce faire, 10 pmol de simple brin sont radiomarqués au γ^{32} -phosphate (voir § I 2 a). 0.5 µl de la solution est repris dans 7 µl d'une solution de 60% formamide, 0.02% de bleu de bromophénol (BBP) et 0.02% de xylène cyanol (XC) et 5 µl de cette solution sont déposés sur le gel sans tension. Après une migration à 20W et à température ambiante pendant 1h30, le gel non séché est mis sous cassette. La lecture par le phosphoImager Storm 860 et la quantification à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular

Dynamics) permettent de déterminer une pureté supérieure à 97% de la bande correspondant au 24-mer.

b) Platination des brins supérieurs de 24 bases

Les brins riches en pyrimidines possèdent un site unique et central de platination. La réaction de platination se fait avec 8 à 10 DO de brin purifié, en présence de 5 mM d'acétate de sodium (AcONa) pH 3.6, 10^{-3} M de perchlorate de sodium (NaClO_4) dans un rapport molaire cisplatine:oligonucléotide de 0.8 (volume réactionnel minimal de 500 μl). Après une incubation d'une nuit à 37°C, l'ADN est précipité en présence de 0.3 M d'AcONa pH 5.2, séché et repris dans 20 μl d'une solution aqueuse de 60% formamide pour être déposé sur un grand gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (gel 24% 19:1 acrylamide: bisacrylamide; 7M Urée; 1 TBE) afin de purifier le brin platiné du brin non platiné (rendement de platination de 50 à 60%). La migration à température ambiante a une durée minimale de 4h30 à 45W, le xylène cyanol devant migrer sur une distance minimale de 18 cm.

La bande de polyacrylamide contenant le brin platiné est récupérée, éluée et précipitée selon les procédures décrites précédemment afin d'être repris dans l'eau ultrapure. La concentration en ADN est déterminée par spectrométrie d'absorption en UV visible.

De même que pour les oligonucléotides non platinés, on vérifie la pureté des 24-mers platinés après marquage radioactif en les déposant sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (0.45 mm d'épaisseur) dans les conditions expérimentales décrites dans le paragraphe précédent.

2- Préparation des sondes radiomarquées

a) Marquage radioactif

La protéine kinase du phage T4 (T4PNK) possède une activité kinase en 5' qui permet le transfert du phosphate radioactif provenant du $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP sur l'extrémité 5' de l'oligonucléotide. Pour cela, 20 pmoles de simple brin sont incubés 30 minutes à 37°C en présence de 20 unités de T4PNK (Biolabs) et de 3 μl de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP dans un tampon commercial (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 0.1 M MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA pH 8; 50 mM DTT et 1 mM spermidine/HCl).

Afin de récupérer l'ADN radiomarqué purifié des nucléotides présents dans le milieu réactionnel, l'échantillon est déposé sur une colonne chromatographique de Sephadex G50 avant d'être centrifugé 5 minutes à 1100 rpm et à température ambiante. Le rendement de purification est estimé à 50% soit environ 10 pmoles.

b) Hybridation des duplexes

Le brin radiomarqué est hybridé avec son brin complémentaire. Pour cela, 7.5 pmoles de brin complémentaire sont rajoutés dans le tube contenant le brin radioactif, en présence de 60 mM NaCl et 5 mM Tris-HCl pH 7.5. L'hybridation se fait par gradient de température entre 75 et 4°C. Afin de déterminer la quantité de brin marqué hybridé, 2 nM de sonde sont repris dans 20 µl de tampon de réaction (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA pH 8; 80 µg/ml BSA acétylée et 1 mM DTT) et 6 µl de cette solution sont déposés sur gel de polyacrylamide (0,75 mm d'épaisseur, système Hoffer) en conditions natives (gel 10% 19:1 acrylamide: bisacrylamide; 0.5 TBE). Après une migration de 1h15 à 250V et à 4°C, le gel non séché est placé sous cassette pendant 1h afin d'être lu à l'aide du phosphoImager Storm 860. La quantification par ImageQuant permet de déterminer le % de duplexe formé. Connaissant la quantité de brin complémentaire mise au départ et le % de duplexe formé, nous pouvons déterminer la concentration en ADN double brin. Le complément de brin non marqué nécessaire pour avoir 100% de duplexe est rajouté et le mélange est réhybridé par gradient de température.

II Production et purification des protéines MutS d'*E. coli*

1- Transformation bactérienne

Des bactéries BL21(λDE3)pLys (Invitrogen), contenant le gène codant la T7 ARN polymérase, sont transformées par électroporation avec un plasmide contenant le gène *mutS* (plasmide pET15B avec insertion du gène au site *NdeI-BamHI* du polylinker). Pour la transformation, les bactéries sont rendues compétentes après plusieurs lavages successifs avec une solution de glycérol 10% stérile, puis aliquotées par fractions de 40 µl et conservées à -70°C.

2 ng de plasmide sont ajoutés par aliquote de 40 µl de bactéries et le mélange est incubé une minute dans la glace avant de procéder à l'électroporation par un pulse de 2,5 kV (MicroPulser, Biorad). 1 ml de milieu de culture Luria-Bertani (milieu LB) est ajouté rapidement, et le tout est incubé 45 minutes à 37°C sous agitation avant d'être étalé sur une boîte LB-agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 34 µg/ml de chloramphénicol.

2- Production de la protéine MutS

La production de protéine se fait à partir d'une culture bactérienne de 500 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 34 µg/ml de chloramphénicol. Lorsque la culture bactérienne incubée à 37°C atteint une absorbance de 0,6 ($\lambda = 595$ nm), la culture est placée à 25°C et le promoteur T7 ARN polymérase est induit par addition de 50 µM d'isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside (IPTG). Au bout de 4 heures, les bactéries sont centrifugées 10 minutes à 7000 rpm à 4°C (rotor GSA, Sorvall). Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 10 ml de milieu LB et les bactéries sont de nouveau centrifugées 10 minutes à 7000 rpm à 4°C (rotor SS34, Sorvall). Après avoir éliminé le surnageant, le culot est repris dans 10 ml de tampon de sonication (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycérol, 5 mM β -mercaptoéthanol) puis stocké à -70°C. Après ajout de 10 ml de tampon de sonication à la solution congelée, 10 µl d'inhibiteur de protéases (Proteases Inhibitor Cocktail, Sigma) et 100 µl de phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) 100 mM, les bactéries sont lysées par sonication. La solution obtenue est centrifugée 15 minutes à 14000 rpm à 4°C (rotor SS34, Sorvall) afin de récupérer le surnageant contenant les protéines bactériennes.

3- Purification de la protéine MutS

La purification des protéines MutS étiquetées par une queue de 6 histidines se fait par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne d'agarose comportant une fonctionnalité cyano-tri-acétate et des contre-ions de nickel (Ni-NTA Agarose, Qiagen). La résine de cette colonne est capable de fixer les protéines étiquetées par formation de liaisons de coordination entre les histidines et le nickel de la colonne. L'élution se fait par addition d'un gradient d'imidazole qui entre en compétition avec les histidines fixées sur la colonne.

Cette étape de purification est réalisée à 4°C. Le lysat bactérien contenant les protéines bactériennes et la protéine MutS surexprimée est déposé sur la colonne. Dans un premier temps, la colonne est lavée avec le tampon de charge (20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 % glycérol, 5 mM β -mercaptoéthanol) afin d'éluer les protéines non étiquetées. La concentration en imidazole est ensuite augmentée (50 puis 100 mM).

L'élution est faite en fractions de 500 μ l (débit de 1 ml/minute). La présence des protéines est détectée à vue en utilisant la réaction de Bradford (20 μ l de l'échantillon, 780 μ l d'eau et 200 μ l de réactif de Bradford, Pierce). Les fractions contenant la protéine étiquetée sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE 12% pour vérifier la pureté et la taille de la protéine étiquetée : la pureté de la protéine est estimée à 98%. Ces fractions sont ensuite rassemblées et la solution est dialysée toute la nuit à 4 °C contre le tampon de stockage (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 350 mM NaCl, 50% glycérol, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA). La concentration de la protéine MutS de 6,65 mg/l est déterminée par test de Bradford. La protéine est aliquotée par fractions de 30 μ l à une concentration de 0,95 mg/ml et stockée à -70°C.

La purification de la protéine MutS mutée F36A, où la phénylalanine 36 est substituée par une alanine, a également été réalisée selon la méthode décrite précédemment. Le plasmide *pET15B* contenant le gène *mutS* muté a été obtenu précédemment au laboratoire (résultat non publié). La concentration de la protéine MutS mutée est estimée par réaction de Bradford à 1,1 mg/ml.

4- Production de la protéine MutY

La préparation de la protéine de fusion glutathione S-transférase/MutY suit le protocole décrit par Zhang et coll. (1998). La souche hôte BL21(λ DE3) et le vecteur d'expression pGEX-MutY ont été donnés par le Dr S. Yonei. Après que la souche transformée incubée à 25°C ait atteint une absorbance de 0,6 ($\lambda = 595$ nm), l'expression de la protéine de fusion est induite par ajout de 50 μ M d'IPTG. La croissance de la culture se poursuit toute la nuit à 25°C.

Après centrifugation dans les mêmes conditions que celles de la protéine MutS décrites dans le paragraphe précédent (à 4000 rpm), le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon phosphate PBS (phosphate-buffered saline) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Proteases Inhibitor Cocktail, Sigma), congelé à -20°C et lysé par sonication. La solution

obtenue est centrifugée 30 minutes à 14000 rpm à 4°C (rotor SS34, Sorvall) afin de récupérer le surnageant contenant la protéine.

Le surnageant est déposé à 4°C sur une colonne d'affinité 4B Sepharose-Glutathione et la protéine retenue est éluée avec 15 mM de glutathione dans 50 mM de Tris-HCl pH 8. Après dialyse contre le tampon de stockage PBS, la protéine de fusion est clivée dans le tampon PBS par la thrombine (incubation à 4°C toute la nuit). La concentration en protéine est estimée à 0,5 mg/ml.

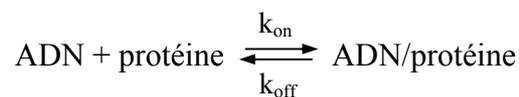
III Les études par gel de retardement électrophorétique

1- Estimation de l'affinité relative de la protéine MutS

a) Principe

Cette technique permet de séparer les complexes ADN/protéine de l'ADN libre du fait de la différence de mobilité électrophorétique entre les deux espèces (Garner et Revzin, 1981 ; Revzin, 1989). En effet, le complexe nucléoprotéique migre plus lentement que l'ADN seul, d'où le nom de retardement électrophorétique.

L'estimation de la valeur de la constante de dissociation (K_d) se fait à partir de gammes de concentration en protéine permettant de titrer les duplexes radiomarqués. Pour cela, des quantités croissantes de protéine sont incubées en présence du duplexe dans un tampon de complexation. L'analyse de la quantité d'ADN complexé et de l'ADN libre permet d'estimer la valeur des constantes d'association et de dissociation selon le principe suivant :



k_{on} = vitesse d'association

k_{off} = vitesse de dissociation

K_a = constante d'association = $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$

K_d = constante de dissociation = $k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = 1/K_a$

$$\text{Fraction d'ADN complexé} = \frac{\text{ADN complexé}}{\text{ADN libre} + \text{ADN complexé}}$$

On peut alors tracer les courbes représentant la fraction d'ADN complexé en fonction de la concentration en protéine. Une courbe théorique selon un modèle d'interaction ADN/protéine simple (Giraud-Panis et Lilley, 1996), appliquée à chaque courbe expérimentale, est tracée à partir de l'équation $y = (P_1 \cdot x)/(P_2 + x)$ (où P_1 est la valeur du plateau de saturation et P_2 est la valeur du K_d relatif de la protéine pour le duplexe) en utilisant le logiciel Origin 6.0 (Northampton, MA). La constante de dissociation, correspondant à la concentration en protéine nécessaire pour avoir 50% de l'ADN complexé, est déterminée à partir de cette courbe théorique.

b) Protocole expérimental

La sonde radiomarquée de 24 paires de bases (2 nM) est incubée dans un volume final de 20 μ l avec des quantités croissantes de protéine dans le tampon de complexation (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA pH 8; 80 μ g/ml BSA acétylée et 1 mM DTT) pendant 15 minutes à 4°C. Sous une tension de 80V, 6 μ l d'échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide en conditions natives (gel 6% 60:1 acrylamide:bisacrylamide; 5 mM MgCl₂; 0.5 TBE) après addition de 2 μ l de Ficoll 10%. Après 45 minutes de migration à 4°C et à 200V, le gel est séché 1h à 70°C et exposé une nuit dans une cassette qui sera scannée par le phosphoImager Storm 860. L'analyse quantitative par le logiciel ImageQuant permet de déterminer la fraction d'ADN complexé par la protéine. L'étude de l'interaction de la protéine MutS F36A (dont le résidu phénylalanine 36 est substitué par une alanine) avec les duplexes de 24 paires de bases est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales.

Lors des titrations réalisées en présence des nucléotides ADP, ATP et AMPPNP, la réaction de complexation se fait en présence de 100 nM de compétiteur froid non spécifique GG/CC (homoduplexe de 24 paires de bases) dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA pH 8; 80 μ g/ml BSA acétylée et 1 mM DTT pour les oligonucléotides de 24 paires de bases. Après 15 minutes d'incubation à 4°C, 2 mM de nucléotide sont rajoutés au milieu réactionnel. L'échantillon est incubé 10

minutes à 4°C avant d'être déposé sur le gel de polyacrylamide selon le protocole décrit ci-dessus.

Ce protocole est appliqué pour l'étude de l'interaction de MutS avec des oligonucléotides de 46 paires de bases dans un tampon de complexation contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 50 mM NaCl; 0.1 mM EDTA pH 8; 80 µg/ml BSA acétylée et 1 mM DTT. Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide (gel 6% 37.5:1 acrylamide:bisacrylamide; 5 mM MgCl₂; 0.5 TBE). L'électrophorèse est réalisée pendant 1h à 4°C sous une tension de 200V.

2- Expériences de compétition

Pour comparer avec précision les K_d relatif de MutS pour plusieurs duplexes platinés testés, nous comparons la capacité de chaque oligonucléotide à entrer en compétition contre la sonde radiomarquée GG/TC.

La réaction se fait dans le tampon de complexation (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA pH 8; 80 µg/ml BSA acétylée et 1 mM DTT) entre 2 nM de sonde GG/TC, 21 nM de protéine MutS et des concentrations croissantes du duplexe 24-mer compétiteur non radiomarqué testé. Après 15 minutes d'incubation à 4°C, 2 µl de Ficoll 10 % sont rajoutés dans chaque échantillon (6 µl) avant leur dépôt sur gel de polyacrylamide (0,75 mm d'épaisseur, système Hoffer). Les conditions de gel et de migration sont les mêmes que celles des expériences de titration. Le gel est séché, mis sous cassette toute la nuit, lu à l'aide du phosphoImager Storm 860 et analysé.

Pour chaque analyse, la fraction de complexe MutS/GG/TC obtenu sans compétiteur est divisée par la fraction de complexe obtenue en présence du compétiteur. Ce rapport est ensuite reporté en fonction de la concentration en compétiteur. Cette représentation permet de déterminer la concentration en compétiteur nécessaire pour faire chuter la quantité de complexe MutS/GG/TC d'un facteur 2.

3- Mesure des constantes de vitesse d'association et de dissociation des complexes nucléoprotéiques par technique de résonance plasmonique de surface (SPR)

a) Principe

La résonance plasmonique de surface (BIAcore) est une technique qui permet d'étudier en temps réel la formation et la dissociation d'un complexe ADN/protéine et de déterminer les paramètres cinétiques de ce complexe.

Pour cela, les duplexes étudiés, qui possèdent une biotine en 3' du brin complémentaire au brin contenant l'adduit 1,2-d(GG) du cisplatine, sont immobilisés sur une puce par une interaction Stréptavidine/Biotine. La protéine, diluée dans le tampon de complexation, est injectée en continu permettant l'interaction ADN/protéine. Le passage du tampon de complexation seul va permettre d'étudier la dissociation du complexe.

Les paramètres cinétiques sont déterminés en injectant des concentrations croissantes de protéine. Les kinétoigrammes issus de cette étude sont analysés par le logiciel BIAévaluation qui permet de tracer les courbes de régression pour chaque concentration en protéine en utilisant le modèle Langmuir. Les constantes de vitesse d'association et de dissociation sont déterminées par le logiciel à partir de ces régressions.

b) Protocole expérimental

Les duplexes biotinylés étudiés sont hybridés dans les mêmes conditions décrites précédemment (§ I 2 b) en mélangeant le brin riche en pyrimidine contenant le site de platination d(GG) et le brin complémentaire biotinylé (rapport molaire 3:1). L'excès de brin riche en pyrimidines sera éliminé lors de la fixation du duplexe sur la puce.

Afin de vérifier la stabilité de la fixation du cisplatine sur les deux guanines adjacentes dans un duplexe contenant une biotine, les duplexes biotinylés sont marqués sur le brin contenant l'adduit avant hybridation avec le brin complémentaire. Après hybridation, les duplexes radiomarqués sont incubés à 25°C pendant 24h dans une solution 100 mM NaCl; 5 mM Tris-HCl pH 7.5 et 0.5 mM EDTA pH 8 avant d'être chargés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (gel 24% 19:1 acrylamide:bisacrylamide; 7 M urée; 1 TBE). Après migration d'1h30 à 20W et à température ambiante, aucune bande correspondant au brin riche en pyrimidine non platiné n'est détecté, indiquant que le résidu platine n'est pas déplacé du fait de la présence de la biotine en 3' sur le brin riche en purine.

Ces mesures par technique SPR ont été réalisées sur un BIAcore 2000 (BIAcore Ab, Uppsala, Sweden) maintenu à 15°C. Les duplexes étudiés sont fixés sur la puce par injection

de 10 μ l d'une solution HiHBS (0.87 M de tampon HBS (10 mM Hepes-KOH pH 7.4; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA pH 8 et 0.005% surfactant P20) et 0.63 M NaCl) contenant $8,3 \cdot 10^{-10}$ M d'ADN. La protéine MutS est injectée avec un flux de 20 μ l/min dans un tampon contenant 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 0.1 EDTA pH 8; 0.0005% Tween 20 et 1 mM DTT. Chaque expérience est constituée d'une phase d'association de 200 secondes et d'une phase de dissociation de 150 secondes. Deux rinçages (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 2% glycérol; 100 mM NaCl; 0.1 EDTA pH 8; 0.0005% Tween 20 et 0.04% SDS) permettent d'éliminer la protéine complexée et de régénérer la puce avant chaque nouvelle injection. Six expériences sont réalisées pour chaque duplexe testé en injectant des concentrations croissantes de protéine (entre 0 et 1000 μ M).

Les paramètres cinétiques sont obtenus à l'aide du logiciel BIAeval 2.0 par régression des courbes expérimentales. Le modèle Langmuir utilisé s'applique à une interaction simple entre un analyte et un ligand immobilisé. Pour chaque duplexe étudié et à concentration saturante en protéine, MutS se fixe sur l'ADN avec un rapport molaire 1:1 calculé d'après la formule stœchiométrique :

$$\frac{\text{Réponse de MutS} \times \text{masse molaire de l'ADN}}{\text{Réponse de l'ADN} \times \text{masse molaire de MutS}}$$

où réponse de MutS = nombre de RU (Respon Units) au plateau obtenu pour des concentrations saturantes en protéine

réponse de l'ADN = nombre de RU obtenu après fixation du duplexe biotinylé sur la puce

4- Etude de l'activité glycosylase de la protéine MutY d'*E. coli*

a) Etude du clivage des duplexes

Les duplexes de 24 paires de bases GG/CC, GG/AC et G*G*/AC sont radiomarqués sur le brin riche en purines par le γ^{32} P-ATP et hybridés selon le protocole décrit précédemment (§ I 2 b). 40 fmol de duplexe radiomarqués sont incubés à température ambiante avec 130 ng de protéine MutY en présence de 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 μ g de BSA et 10 mM EDTA pH 8 dans un volume final de 10 μ l. Pour chaque duplexe testé, les temps d'incubation sont de 30 minutes, 1h, 3h et 6h. La réaction est arrêtée par addition de 2 μ l de NaOH 2.5 M et par chauffage (95°C pendant 5 minutes). 10 μ l d'une solution de 75%

formamide, 0.02% BBP et 0.02% XC sont rajoutés avant le dépôt de 3 µl d'échantillon sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (gel 24% 19:1 acrylamide:bisacrylamide; 7 M urée; 1 TBE). Après une migration à température ambiante de 30 minutes (20W), le gel non séché est exposé sous cassette, lu par le phosphoImager et quantifié pour déterminer la fraction d'ADN clivé par MutY.

b) Etude de la spécificité de la protéine MutY par compétition contre la sonde radiomarquée GG/AC

La réaction se fait dans les mêmes conditions expérimentales décrites dans le paragraphe précédent en présence de duplexe compétiteur GG/CC ou G*G*/AC de 24 paires de bases non marqué. Le rapport de concentration sonde/compétiteur varie entre 0 et 25. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'échantillon est préparé et déposé sur un gel de polyacrylamide selon le protocole décrit ci-dessus. La quantification du gel permet de déterminer la fraction d'hétéroduplexe GG/AC radiomarqué clivé en absence et en présence de compétiteur. Le rapport (fraction d'ADN clivé en absence de compétiteur/fraction d'ADN clivé en présence de compétiteur) est reporté en fonction de la concentration en compétiteur afin de comparer la spécificité de MutY pour les duplexes GG/CC et G*G*/AC.

RESULTATS

Le rôle principal de la protéine MutS chez les bactéries et de ses homologues eucaryotes MutS α (hétérodimère MSH2/MSH6) et MutS β (hétérodimère MSH2/MSH3) est de reconnaître les mésappariements et les insertions/délétions dans l'ADN (pour revue, Modrich et Lahue, 1996). La détection des adduits du cisplatine par le système MMR semble être une étape nécessaire pour déclencher la mort cellulaire (Nehmé et coll., 1997 ; Duckett et coll., 1999). Plusieurs études ont été menées sur l'interaction de hMutS α avec les adduits du cisplatine mais les résultats varient d'une étude à l'autre. Une étude récente montre que MutS d'*E. coli* reconnaît spécifiquement un ADN modifié globalement par le cisplatine (Zdraveski et coll., 2002). Duckett et coll. (1996) et Mu et coll. (1997) montrent que hMutS α reconnaît l'adduit intrabrin majoritaire 1,2-d(GpG) avec une spécificité faible mais cette reconnaissance serait suffisante pour avoir une signification biologique. hMSH2 seule présente aussi une faible affinité pour l'adduit 1,2-d(GpG) (Mello et coll., 1996). D'un autre côté, Yamada et coll. (1997) trouvent que hMutS α reconnaît fortement l'adduit 1,2-d(GpG) lorsqu'une thymine est incorporée en face de l'une des deux guanines de l'adduit.

Seules les interactions entre MutS ou MutS α et l'adduit 1,2-d(GpG) ont été étudiées *in vitro*. Aucune information n'est disponible sur l'affinité de ces protéines pour les adduits intrabrin 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpNpG) ainsi que pour l'adduit interbrin formé dans le site de pontage d(GpC/GpC). De plus, les adduits du cisplatine sont susceptibles de former *in vivo* des composés de lésions du cisplatine par réplication translésionnelle (Hoffmann et coll., 1996^a ; Vaisman et Chaney, 2000 ; Vaisman et coll., 2000). Ces composés de lésions (ou produits de lésions) du cisplatine ont pour origine l'incorporation d'une base non complémentaire en face de l'une des deux purines pontées par le cisplatine lors de la réplication. Puisque le système MMR est impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine, il est important de savoir quelles lésions simples et/ou composés de lésions du cisplatine sont susceptibles d'être reconnus spécifiquement par le système MMR.

Dans la première partie de mon travail, j'ai donc déterminé par une étude physico-chimique la nature des adduits et des composés de lésions du cisplatine reconnus spécifiquement par MutS d'*E. coli*. Après avoir déterminé par gel de retardement électrophorétique l'affinité relative de MutS pour les quatre adduits intrabrin 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpCpG), 1,3-d(GpTpG) ainsi que pour l'adduit interbrin formé dans le site de pontage d(GpC/GpC), j'ai déterminé dans les mêmes conditions expérimentales l'affinité relative de MutS pour tous les composés de lésions des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG).

Afin de pouvoir déterminer la nature de chacune des lésions spécifiquement étudiées, j'ai utilisé des duplexes d'ADN contenant un adduit unique.

Selon les modèles proposés par l'équipe de P. Modrich et par l'équipe de R. Fishel (voir chap. I V 2), la fixation d'ATP par la protéine MutS permet d'initier la réparation par le système MMR après l'étape de reconnaissance. L'ATP a pour effet, entre autre, de baisser fortement l'affinité de la protéine pour un hétéroduplexe (Allen et coll., 1997 ; Worth et coll., 1998 ; Blackwell et coll., 2001). D'autre part, selon ces modèles, la protéine reconnaît l'ADN sous forme libre ou ayant fixé de l'ADP. Mon hypothèse de travail, basée sur l'étude présentée en première partie, est que les produits de lésions du cisplatine seraient des lésions critiques reconnues par MutS à l'origine de l'action cytotoxique du cisplatine. Pour savoir si un composé de lésion du cisplatine peut moduler certaines propriétés biochimiques de MutS en présence des nucléotides, j'ai étudié par gel de retardement électrophorétique l'interaction de la protéine avec un duplexe d'ADN contenant un composé de lésion en présence des différents nucléotides.

Dans un troisième temps, je me suis intéressée à la reconnaissance du produit de lésion du DACH Pt (1,2-diamminecyclohexanedichloroplatine) contenant une thymine opposée à la guanine en 3' de l'adduit intrabrin majoritaire 1,2-d(GpG) (duplexe G*G/CT DACH Pt). Cette molécule fait partie de la nouvelle génération de dérivés du cisplatine utilisée en chimiothérapie. Le DACH Pt ne présente pas de résistance croisée avec le cisplatine dans les cellules déficientes en système MMR (Fink et coll., 1997), ce qui motive les études cliniques visant à l'utiliser pour soigner les patients ne répondant pas/plus au cisplatine. Cette molécule est actuellement en phase II d'essais cliniques (Albert et coll., 2003).

On sait que le passage translésionnel de l'ADN modifié par le DACH Pt a lieu *in vitro* et *in vivo* (Vaisman et Chaney, 2000 ; Mamenta et coll., 1994). Il a été montré *in vitro* que lors de la réplication translésionnelle, l'ADN polymérase β incorpore une thymine en face de la guanine platinée en 3' de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du DACH Pt (Vaisman et Chaney, 2000). Ce résultat suggère que des composés de lésions du DACH Pt se forment *in vivo*. Ils pourraient alors être reconnus par le système de réparation MMR. D'autre part, dans une étude utilisant de l'ADN naturel modifié par le cisplatine ou par le DACH Pt, MutS reconnaît deux fois plus efficacement les adduits du cisplatine que ceux du DACH Pt. Cette étude suggère que les adduits intrabrin majoritaires formés dans un contexte d'homoduplexe seraient impliqués dans les mécanismes moléculaires à la base des différences observées dans

les réponses cellulaires au cisplatine et au DACH Pt. Le but de mon étude est de savoir si MutS peut interagir avec des composés de lésions du DACH Pt et s'il existe des différences d'interactions entre la protéine et les composés de lésions du cisplatine et du DACH Pt qui pourraient expliquer les différences d'activité biologique mises en évidence entre les deux dérivés du platine.

CHAPITRE I : INTERACTION DE LA PROTEINE MutS AVEC DES LESIONS ET DES PRODUITS DE LESIONS DU CISPLATINE : ROLE POTENTIEL DANS LA DETECTION DES DOMMAGES DE L'ADN INDUITS PAR LE CISPLATINE

I Introduction

Il est admis que l'activité cytotoxique de l'agent anticancéreux cisplatine est relié à la formation d'adduits sur l'ADN. Les adduits majoritaires formés sont les adduits bifonctionnels intrabrinns 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) qui représentent 90% de la totalité des adduits du cisplatine. Les processus biochimiques déclenchés par la formation de ces lésions aboutissant à la mort cellulaire ne sont pas connus. Les adduits inhibent la réplication et/ou la transcription, mais ces perturbations ne suffisent pas à expliquer le déclenchement de l'apoptose.

Le système MMR est la voie de réparation principale des bases mésappariées produites pendant la réplication et/ou la recombinaison (pour revue, Modrich et Lahue, 1996). Ce système de réparation est aussi impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine. En effet, les cellules d'*Escherichia coli* Dam⁻/MutS⁻ et Dam⁻/MutL⁻ sont résistantes au cisplatine alors que les cellules déficientes au niveau de la Dam méthylase, protéine à l'origine de la discrimination du brin néosynthétisé, sont hypersensibles (Fram et coll., 1985). De même les cellules humaines déficientes en protéines hMSH2, hMSH6 (protéines homologues de MutS procaryote), hMLH1 ou hPMS2 (protéines homologues de MutL) deviennent résistantes au cisplatine, cette résistance étant réversée par introduction du chromosome portant une copie du gène défectueux (Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996, 1997). Ces résultats suggèrent que les premières étapes du système MMR, c'est-à-dire la reconnaissance d'une lésion critique de l'ADN et la signalisation de sa présence, contribuent à la cytotoxicité du cisplatine. De plus, une corrélation a été établie entre le système MMR, le cisplatine et un activateur de l'apoptose, la protéine p73 (Gong et coll., 1999). Ce résultat suggère que le système MMR pourrait déclencher un signal apoptotique *via* p73 qui contribuerait à la cytotoxicité du cisplatine.

Il semble que la présence de mésappariements associés à une lésion de l'ADN telles que les O6-MetG, les O4-MetT et les dimères de thymines soit importante dans la reconnaissance par les protéines MutS ou MutS α (Duckett et coll., 1996, Rasmussen et Samson, 1996 ; Wang et coll., 1999^b). Les adduits du cisplatine peuvent donner naissance à des produits de lésions (après incorporation d'une base non complémentaire en face de l'une des deux purines platinées), en accord avec les spectres de mutations du cisplatine déterminés chez les cellules procaryotes et eucaryotes (Burnouf et coll., 1990 ; Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1995 ; Bublely et coll., 1991 ; Vaisman et Chaney, 2000) (voir chap. III II 2). Nous nous sommes donc intéressés en particulier à l'interaction entre des produits de lésions du cisplatine et la protéine MutS chez *E. coli*. La formation des adduits du cisplatine induit une forte déformation de l'ADN (voir chap. III I 3), ce qui pourrait entraîner la non-reconnaissance du mésappariement par MutS ou MutS α . Or une étude démontre que l'adduit majoritaire 1,2-d(GpG) du cisplatine est fortement reconnu par hMutS α lorsqu'une thymine est opposée à l'une des deux guanines platinées (Yamada et coll., 1997) tandis que l'adduit 1,2-d(GpG) est faiblement reconnu par hMutS α (Mello et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996, Mu et coll., 1997). Aucune étude n'a été publiée sur l'interaction de MutS ou MutS α avec les différents produits de lésions du cisplatine. Selon l'hypothèse que ces composés de lésions sont à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR, j'ai étudié par des expériences de compétitions, au moyen de gels de retardement électrophorétique, l'interaction entre MutS et les adduits intrabrins 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpNpG) et de l'adduit interbrin formé dans le site de pontage d(GpC/GpC) ainsi que les produits de lésions des adduits intrabrins majoritaires du cisplatine.

L'utilisation de la technique de résonance plasmonique de surface nous a permis d'étudier en temps réel la formation et la dissociation d'un complexe ADN platiné/MutS et de déterminer les paramètres cinétiques. Cette étude montre que le duplexe contenant l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) est légèrement mieux reconnu par MutS que l'homoduplexe correspondant et que MutS possède une forte affinité pour les duplexes contenant un adduit 1,2-d(GpG) et une thymine mésappariée avec l'une des deux guanines platinées.

D'après nos études de compétition, les mésappariements G/A formés avec la guanine en 5' ou en 3' de l'adduit 1,2-d(GpG) ou en 5' de l'adduit 1,2-d(ApG) sont reconnus spécifiquement par MutS. Ces mésappariements sont formés majoritairement *in vivo* puisque des études ont montré que les adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) induisent essentiellement des

transversions G→T (Burnouf et coll., 1990 ; Bradley et coll., 1993, Yarema et coll., 1995). Or l'ADN glycosylase MutY, enzyme appartenant au système de réparation par excision de base (REB), possède une activité glycosylase qui permet d'enlever l'adénine mésappariée à une guanine. Nous avons donc vérifié que MutY n'interfère pas dans la reconnaissance par MutS des produits de lésions du cisplatine contenant une adénine en face de l'une des deux guanines impliquées dans l'adduit 1,2-d(GpG). Pour cela, nous avons testé la capacité de MutY à cliver les duplexes G*G*/CA et G*G*/AC. Cette réaction est étudiée par gel dénaturant selon les conditions expérimentales décrites par Porello et coll. (1996). Les résultats démontrent que MutY n'est pas impliquée dans la réparation des produits de lésions de l'adduit majoritaire du cisplatine.

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que les produits de lésions des adduits majoritaires intrabrins 1,2-d(GpG) et peut-être des adduits 1,2-d(ApG) du cisplatine pourraient être les lésions critiques à l'origine de la cytotoxicité de la drogue anticancéreuse médiée par le système MMR.

II Discussion

Le système MMR est impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine. Le spectre de mutation du cisplatine suggère la formation de produits de lésions du cisplatine. Ceux-ci sont caractérisés par la présence d'un adduit du cisplatine sur un brin et d'une base non complémentaire incorporée lors de la réplication ou de la recombinaison en face de l'une des deux purines pontées par le cisplatine. La protéine MutS et son homologue eucaryote MutS α reconnaissent les mésappariements de l'ADN et les courtes insertions et délétions de bases. La reconnaissance des lésions critiques du cisplatine par ces protéines est une étape clé pour comprendre les relations entre la drogue et le système MMR. Dans cette étude, nous avons déterminé l'affinité de la protéine MutS pour les différents adduits du cisplatine et pour des composés de lésions formés lorsqu'une base non complémentaire est incorporée en face de l'une des deux purines platinées des adduits intrabrins majoritaires du cisplatine. Les adduits intrabrins 1,2-d(ApG) et 1,3-d(GpNpG) et interbrins formés dans le site de pontage d(GpC/GpC) ne sont pas reconnus spécifiquement par MutS. Seul l'adduit intrabrin

majoritaire 1,2-d(GpG) est légèrement mieux reconnu que l'ADN non spécifique. Le fait que les adduits 1,2-d(ApG) et 1,3-d(GpNpG) ne soient pas reconnus spécifiquement par MutS suggère que MutS distingue les différentes déformations de l'ADN. En effet, la seule différence structurale observée entre les adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) provient d'une déformation de l'ADN plus prononcée en 5' de l'adduit 1,2-d(ApG) qu'en 5' de l'adduit 1,2-d(GpG) (Marrot et Leng, 1989 ; Herman et coll., 1990).

Notre étude montre que les six produits de lésions de l'adduit 1,2-d(GpG) et quatre des six produits de lésions de l'adduit 1,2-d(ApG) sont reconnus spécifiquement par MutS. De plus, les mésappariements formés avec la guanine platinée en 3' de l'adduit 1,2-d(GpG) (G/T, G/G et G/A) sont mieux reconnus par MutS que ces mêmes mésappariements formés avec la guanine platinée de l'adduit 1,2-d(ApG). La présence de l'adduit 1,2-d(GpG) améliore dans cinq cas sur six la reconnaissance du mésappariement (les facteurs d'augmentation variant entre 4 et 1.3). Seul le duplexe G*G*/TC, où le mésappariement G/T est présent en 5' de l'adduit, est moins bien reconnu par MutS que l'hétéroduplexe non platiné correspondant GG/TC. Dans le cas de l'adduit 1,2-d(ApG), seuls les mésappariements G/T et G/A sont légèrement mieux reconnus par MutS en présence de l'adduit. Les duplexes G*CG*/CGT et G*TG*/CAT ne sont pas reconnus spécifiquement par MutS alors que les hétéroduplexes non platinés correspondants sont reconnus. La présence de l'adduit 1,3-d(GpNpG) inhibe donc la reconnaissance spécifique de MutS pour un mésappariement G/T présent en 3' de ces adduits (résultats non présentés).

Les adduits 1,2-d(GpG) représentent 65% de la totalité des adduits du cisplatine. C'est le seul adduit reconnu spécifiquement par la protéine MutS. Tous les produits de lésions pouvant être formés avec cet adduit sont eux aussi reconnus spécifiquement par MutS avec des affinités variant selon la nature et la position de la base mésappariée. Une corrélation a été établie entre l'affinité de MutS pour un mésappariement et l'efficacité du système MMR à réparer ce mésappariement (Su et coll., 1988). Un nombre important de composés de lésions formés avec les adduits intrabrin majoritaires 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) étant reconnus spécifiquement par MutS, nous suggérons que ces lésions pourraient être à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR.

Il est possible que les produits de lésions du cisplatine soient reconnus et pris en charge par d'autres systèmes de réparation. Ainsi l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) est mieux réparé par excision *in vitro* lorsqu'une thymine est présente en face de l'une des deux guanines pontées par le cisplatine (Mu et coll., 1997 ; Moggs et coll., 1997). La présence de

hMutS α ne semble pas influencer cette réparation. Cependant la difficulté de cette étude réside dans la mise en place des conditions expérimentales adaptées à la réparation par excision (système REN) des adduits et au fonctionnement du système MMR. Or le système REN nécessite la présence d'ATP dans le milieu réactionnel alors que la présence d'ATP empêche la fixation de hMutS α sur l'ADN. La conclusion de ces deux études nécessiterait la mise au point de conditions permettant le fonctionnement du système MMR. Si une compétition entre le système MMR et le système REN est possible, il semble pourtant que le système MMR soit le mieux placé pour repérer rapidement la présence d'une lésion composée du cisplatine. En effet, la mise en évidence d'une interaction entre MutS et la sous-unité β de l'ADN polymérase III (Lopez de Saro et O'Donnell, 2001) et entre MutS α et PCNA (Flores-Rozas et coll., 2000 ; Clark et coll., 2000 ; Lau et Kolodner, 2003) renforce l'idée d'une liaison directe entre le système MMR et la machine de réplication. Vu que les produits de lésions du cisplatine ont pour origine la réplication de l'adduit, il est probable que MutS et MutS α soient les premières protéines à accéder à la lésion. Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'aucune interaction entre le facteur PCNA et les protéines appartenant au système REN n'a été démontrée à notre connaissance.

L'interaction de la protéine MutS avec les duplexes G*G*/CC, G*G*/CT et G*G*/TC et leurs duplexes non platinés correspondants (GG/CC, GG/CT et GG/TC) a été étudiée par résonance plasmonique de surface. Cette technique nous a permis de déterminer les constantes de vitesse d'association et de dissociation de la protéine pour les différents duplexes testés. Ces trois duplexes ont été choisis d'après nos résultats de compétition afin de comprendre le mécanisme à l'origine de la reconnaissance de l'adduit 1,2-d(GpG) (association ou dissociation) et à l'origine de la modulation de la reconnaissance du mésappariement G/T en présence de l'adduit et en fonction de la position de la thymine mésappariée (avec la guanine platinée en 3' ou en 5' de l'adduit). Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec nos résultats de compétition. L'affinité de MutS pour le duplexe G*G*/CC est meilleure que pour l'homoduplexe GG/CC non platiné du fait que le complexe MutS/G*G*/CC se dissocie deux fois moins vite que le complexe MutS/GG/CC. Le duplexe GG/CT est reconnu spécifiquement par la protéine, et cette affinité est augmentée en présence de l'adduit du cisplatine. Les constantes de vitesse de dissociation des complexes MutS/G*G*/CT et MutS/GG/CT sont similaires. Bien que la constante de vitesse d'association du complexe MutS/G*G*/CT n'a pu être déterminée selon un modèle d'interaction ADN/protéine simple, les résultats indiquent que l'augmentation de l'affinité de MutS pour le duplexe G*G*/CT par

rapport au duplexe GG/CT provient essentiellement de la phase d'association. Par contre, lorsque la thymine est incorporée en face de la guanine platinée en 5' de l'adduit, la présence de l'adduit provoque une dissociation du complexe MutS/G*G*/TC presque cinq fois plus importante que la dissociation du complexe MutS/GG/TC. Les constantes de vitesse d'association déterminées pour GG/CC, G*G*/CC, GG/CT, GG/TC et G*G*/TC sont de l'ordre de $3.10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. MutS reconnaît ces duplexes de façon similaire, ce qui suggère que la nature des lésions module la dissociation de la protéine du duplexe et que l'affinité de MutS dépend essentiellement de la phase de dissociation.

Notre étude par compétition démontre que MutS reconnaît spécifiquement les composés de lésions du cisplatine contenant une adénine en face de l'une ou l'autre des deux guanines platinées. Cette lésion est probablement formée *in vivo* lors de la réplication translésionnelle des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) ainsi que le suggère les études de mutagenèse du cisplatine (Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1995). Or l'ADN glycosylase MutY reconnaît et déclenche la réparation par excision de bases (REB) des lésions de l'ADN 8-oxoG et 8-oxoG/A et rentre en compétition *in vivo* avec le système MMR dans la réparation des mésappariements G/A (Au et coll., 1989 ; Michaels et coll., 1992 ; Zhang et coll., 1998). Nous avons donc vérifié que MutY ne reconnaît pas spécifiquement les produits de lésions G*G*/CA et G*G*/AC et n'interfère pas ainsi sur la reconnaissance par MutS de ces lésions composées. Nous montrons qu'un duplexe contenant un mésappariement G/A n'est pas clivé lorsque la guanine est pontée par le cisplatine, que cette guanine soit en 5' ou en 3' de l'adduit 1,2-d(GpG). Deux possibilités peuvent être à l'origine de la perte de la capacité de MutY à cliver G/A. MutY ne peut pas reconnaître le mésappariement ou l'enzyme a perdu son activité glycosylase du fait de la présence de l'adduit. Nos expériences de compétition montrent que les duplexes GG/CC, G*G*/CA et G*G*/AC sont reconnus par MutY de façon similaire et inhibent faiblement le clivage de la sonde radiomarquée GG/AC. Ces résultats suggèrent que la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine empêche la reconnaissance par MutY du mésappariement G/A qui ne pourra pas être réparé par la voie de réparation REB. Il a été montré que les adduits du cisplatine pouvaient détourner certaines protéines cellulaires de leur substrat naturel en séquestrant la protéine, ce qui l'empêche d'accomplir sa fonction et perturbe ainsi le fonctionnement cellulaire. C'est le cas du facteur de transcription hUBF (Treiber et coll., 1994) et de l'ADN glycosylase AAG (Kartalou et coll., 2000). Le fait que MutY ne se fixe pas sur les duplexes G*G*/AC et G*G*/CA élimine

la possibilité que la protéine soit détournée de ses substrats naturels que sont les mésappariements G/A et les lésions 8-oxoG/C et 8-oxoG/A.

La corrélation entre la perte du système MMR et la résistance des cellules au cisplatine montre que le système MMR intervient dans la cytotoxicité du cisplatine. Notre étude montre que MutS reconnaît préférentiellement des composés de lésions des adduits majoritaires intrabrin du cisplatine. Ces lésions pourraient donc être à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine *via* le système MMR. Ceci est d'autant plus probable du fait que la reconnaissance des adduits majoritaires intrabrin du cisplatine par d'autres protéines cellulaires abondantes, telles que les protéines impliquées dans le système REN (Visse et coll., 1991 ; Clugston et coll., 1992 ; Jones et Wood, 1993 ; Payne et Chu, 1994) ou les protéines HMG-1, H1 et HU modulant la structure de la chromatine (Pil et Lippard, 1992 ; Yaneva et coll., 1997 ; B. Castaing, non publiés) (fig. 27) se fait avec une affinité et une spécificité fortes.

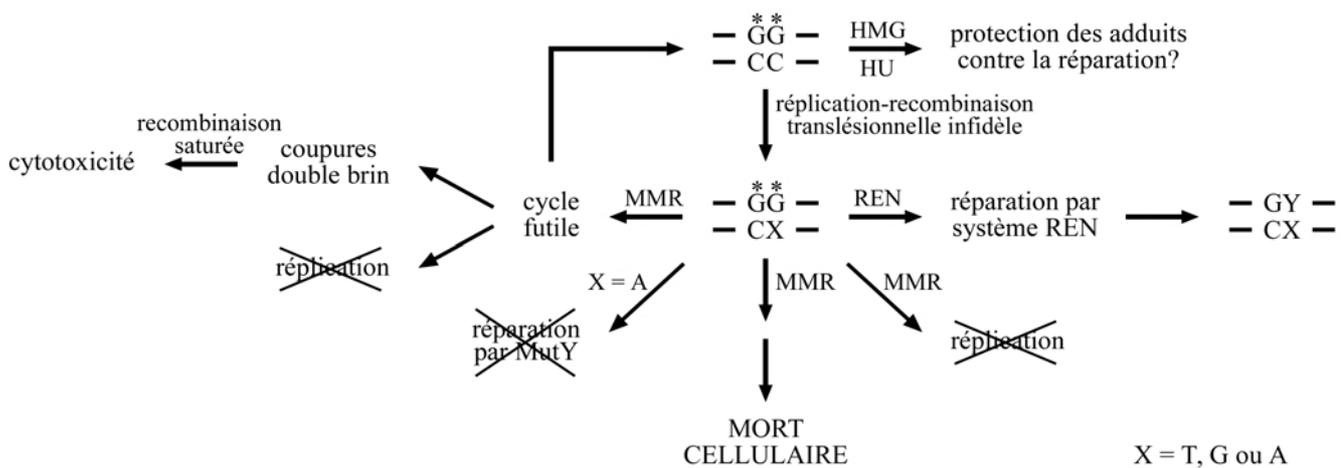


Fig. 27 : Résumé des principales interactions de l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine et des produits de lésion de l'adduit 1,2-d(GpX) et des hypothèses sur le rôle du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine abordées dans cette étude.

Trois modèles ont été proposés pour expliquer le processus de réparation des mésappariements par le système MMR après reconnaissance du mésappariement par MutS ou MutS α (Allen et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1997, 1999 ; Schofield et coll., 2001^b). Ce système est régulé par la fixation des nucléotides ADP et ATP sur MutS ou son homologue eucaryote MutS α ainsi que par l'hydrolyse de l'ATP par ces protéines. D'après notre hypothèse de travail, les produits de lésion sont importants dans la cytotoxicité du cisplatine *via* le système MMR. Nous avons étudié dans un deuxième temps l'effet des nucléotides sur

l'interaction de MutS avec ces lésions afin de mettre en évidence des perturbations au niveau des propriétés biochimiques de MutS du fait de la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine surimposé à un mésappariement G/T.

Binding Discrimination of MutS to a Set of Lesions and Compound Lesions (Base Damage and Mismatch) Reveals Its Potential Role as a Cisplatin-damaged DNA Sensing Protein*

Received for publication, February 7, 2003, and in revised form, March 20, 2003
Published, JBC Papers in Press, March 24, 2003, DOI 10.1074/jbc.M301390200

Laurence Fourier‡, Peter Brooks§¶, and Jean-Marc Malinge||

From the Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France and
§Génoscope-Centre National de Séquençage, 2, rue Gaston Crémieux CP 5706, 91057 Evry Cedex, France

The DNA mismatch repair (MMR) system plays a critical role in sensitizing both prokaryotic and eukaryotic cells to the clinically potent anticancer drug cisplatin. It is thought to mediate cytotoxicity through recognition of cisplatin DNA lesions. This drug generates a range of lesions that may also give rise to compound lesions resulting from the misincorporation of a base during translesion synthesis. Using gel mobility shift competition assays and surface plasmon resonance, we have analyzed the interaction of *Escherichia coli* MutS protein with site-specifically modified DNA oligonucleotides containing each of the four cisplatin cross-links or a set of compound lesions. The major 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link was recognized with only a 1.5-fold specificity, whereas a 47-fold specificity was found with a natural G/T containing DNA substrate. The rate of association, k_{on} , for binding to the 1,2-d(GpG) adduct was $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and the specificity of binding was essentially dependent on k_{off} . DNA duplexes containing a single 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpCpG) adduct, and an interstrand cross-link of cisplatin were not preferentially recognized. Among 12 DNA substrates, each containing a different cisplatin compound lesion derived from replicative misincorporation of one base opposite either of the 1,2-intrastrand adducts, 10 were specifically recognized including those that are more likely formed *in vivo* based on cisplatin mutation spectra. Moreover, among these lesions, two compound lesions formed when an adenine was misincorporated opposite a 1,2-d(GpG) adduct were not substrates for the MutY-dependent mismatch repair pathway. The ability of MutS to sense differentially various platinated DNA substrates suggests that cisplatin compound lesions formed during misincorporation of a base opposite either adducted base of both 1,2-intrastrand cross-links are more plausible critical lesions for MMR-mediated cisplatin cytotoxicity.

cis-Diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin)¹ is among the most widely used anticancer chemotherapeutic agents in the treatment of many human tumors, particularly testicular and ovarian tumors (1). In the reaction between DNA and cisplatin, different types of bifunctional adducts are formed that are thought to be the key toxic lesions (2–4). Although these adducts are responsible for a variety of cellular responses including replication and/or transcription inhibition, there is not yet a clear understanding of the molecular mechanisms linking the formation of adducts and cisplatin-induced apoptosis (5, 6). Cisplatin reacts preferentially with the N-7 atoms of purine residues in DNA. The major adducts (90%) are 1,2-intrastrand cross-links at d(GpG) and d(ApG) sites and the minor adducts correspond to 1,3-intrastrand cross-links at d(GpNpG) (N being a nucleotide residue) and interstrand cross-links formed at d(GpC/GpC) sites (7–10). Once formed, cisplatin lesions such as the major 1,2-intrastrand cross-links can undergo replication bypass in cells treated with cisplatin (11, 12). Because these lesions are often miscoding, they give rise to another form of lesion that is called a compound lesion (13), namely a lesion in one strand and a mismatch in the other. In both prokaryotes and eukaryotes, the pattern of cisplatin mutagenesis suggests that the major 1,2-intrastrand cross-links give rise to an array of compound lesions of which the majority are those produced when an adenine is misincorporated opposite the adducts (14–17). *In vitro*, DNA polymerases have been shown to bypass the major cisplatin adduct in an error-prone manner. For instance, misincorporation of a guanine by yeast polymerase ζ and misinsertion of a thymine by human polymerases η and β can occur opposite the 3' adducted guanine (18, 19); human polymerase η can also misincorporate an adenine opposite the 5'-platinated guanine (20).

Recently, studies showed that the DNA mismatch repair (MMR) pathway contributes to the cytotoxicity elicited by cisplatin. In eukaryotes, MMR has been involved as an upstream component of a cisplatin-induced apoptotic pathway mediated by the tumor suppressor p73 or by the retinoblastoma tumor suppressor (21, 22). Importantly, a relationship between the loss of a functional MMR pathway and cellular resistance to cisplatin cytotoxicity has been established *in vitro* and *in vivo* (23–26). As cisplatin resistance is a major reason for treatment failure, it is therefore of great interest to understand how MMR-dependent molecular mechanisms participate in the modulation of cellular sensitivity to the drug. Several models have been proposed to explain the possible biochemical link between the MMR pathway and cisplatin cytotoxicity (re-

* This work was supported in part by the Ligue contre le Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer, and COST Chemistry Actions D20. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Supported by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

¶ On leave at Genoscope from the Centre National de la Recherche Scientifique. Present address: IntegraGen, 4, rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-2-38-25-55-44; Fax: 33-2-38-63-15-17; E-mail: malinge@cnrs-orleans.fr.

¹ The abbreviations used are: cisplatin, *cis*-diamminedichloroplatinum(II); MMR, DNA mismatch repair; RU, response unit; SPR, surface plasmon resonance; HMG, high mobility group.

viewed in Refs. 26–29) but no precise mechanism has yet been defined. An important molecular determinant of such mechanisms was the identification of MMR proteins implicated in cisplatin cytotoxicity. Early experiments in *Escherichia coli* have shown that loss of MMR activity because of mutations in *mutS* or *mutL* was correlated with cisplatin resistance (30). In eukaryotes, mismatch repair defects because of loss of either human MSH2 or MSH6 subunits of hMutS α or the human MLH1 or PMS2 subunits of the hMutL α complex result in cisplatin resistance (23, 24, 26). Thus MutS or MutL and their respective eukaryotic counterparts hMutS α or hMutL α are MMR proteins implicated in cisplatin cytotoxicity.

Because the primary role of MutS and hMutS α appears to be recognition of mispaired bases and small base insertion mismatches (31–33) and as recognition of cisplatin-damage DNA is a necessary step in all proposed models, the first mechanistically important question concerns both the capability of MMR proteins to sense cisplatin-damaged DNA and the identification of the cisplatin lesions specifically recognized. A quantitative study reported that hMutS α displayed weak affinity for 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-links (34) but in contrast a qualitative study reported that this protein exhibits a strong preference for cisplatin compound lesions formed when a thymine is misincorporated opposite the major cisplatin adduct (35). This protein was also found to have a reduced affinity for a G/T mismatch in the context of a 1,2-d(GpG) adduct (13) suggesting that compound lesions were not involved in MMR activity (36). hMSH2 alone also displayed weak affinity for the major intrastrand cross-link (37). *E. coli* MutS was shown to recognize DNA globally modified by cisplatin (38) but the precise nature of the bound adducts is not yet known. Therefore, a sensitive assay is needed to gain insight into the nature of the suspected cytotoxic lesions recognized by MMR binding activities. In particular, no extensive interaction study has been carried out with cisplatin compound lesions, defined here as a cisplatin lesion in one strand and a mismatch in the other.

In the present study, we investigated the binding properties of *E. coli* MutS protein with various platinated DNA substrates containing a single centrally located cisplatin adduct to define the precise nature of the bound adducts. Experimental conditions were used in which sensitivity was high because of the absence of carrier DNA and to low nonspecific background binding. Within the sequence context studied here, the 1,2-d(GpG) adduct is the only bifunctional cisplatin lesion that is recognized albeit with a very low relative affinity. In contrast, MutS recognized with higher specificity an extended array of cisplatin compound lesions that are likely to be formed *in vivo* based on cisplatin mutation spectra. Surface plasmon resonance was employed for the first time to study MutS binding kinetics to several platinated DNA substrates; the weak binding of MutS to the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link is essentially dependent on a fast rate of dissociation. Taken together, our interaction data with MutS and different platinated DNA substrates suggest that cisplatin compound lesions formed during misincorporation of a base opposite either adducted base of both 1,2-intrastrand cross-links are the most probable critical lesions for MMR-mediated cisplatin cytotoxicity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Single-stranded 24-mer oligonucleotides, biotinylated oligonucleotides, and [γ - 32 P]ATP were purchased from Amersham Biosciences. T4 polynucleotide kinase was from New England Biolabs. Untagged MutS was obtained from IntegraGen (Evry, France). Solutions of 40% acrylamide and 2% bisacrylamide were from Bio-Rad. Cisplatin was from Sigma. Surfactant P20 and streptavidin-coated SA sensor chips were purchased from BIAcore AB (Uppsala, Sweden).

Protein Purification—Hexameric histidine-tagged MutS protein was prepared as previously described (39). The host strain was BL21 (ADE3)

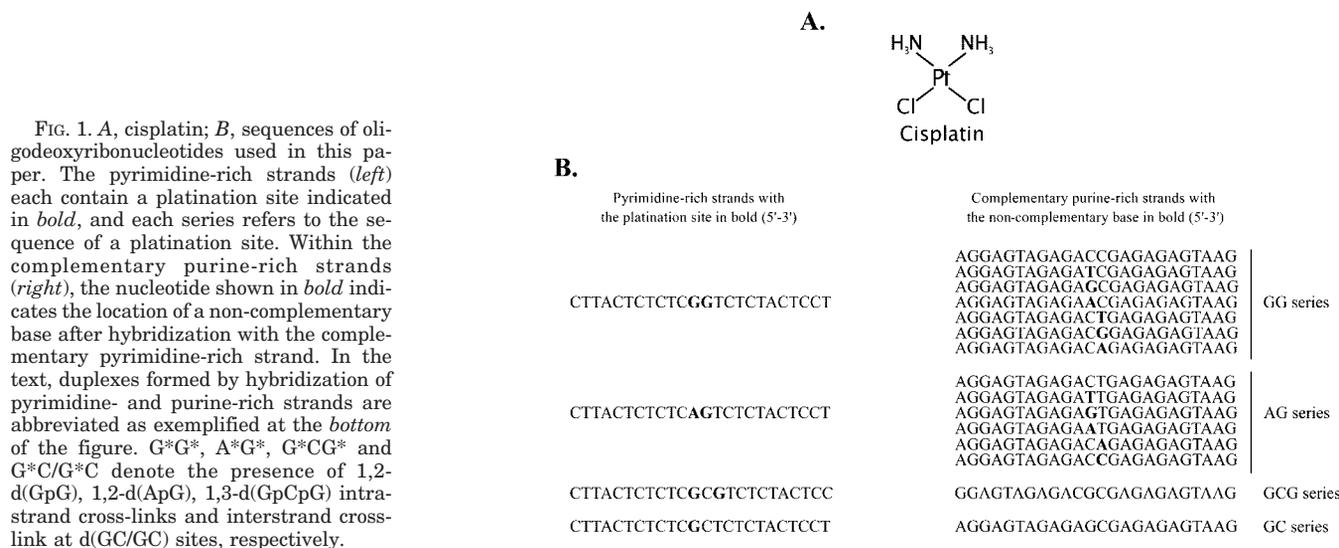
(Novagen) and the expression vector pMQ382 was kindly provided by Dr. M. G. Marinus. The strain transformed with pMQ382 was grown at 37 °C with shaking to an A_{600} of 0.6. The culture was then shifted to 25 °C and induced with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside at a final concentration of 50 μ M for 3 h. After centrifugation, the cells were resuspended in a sonication buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 5 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol) supplemented with protease inhibitor mixture (Sigma), frozen at –20 °C, and then sonicated. All purification steps were performed at 4 °C. The lysate obtained after centrifugation of the extract was mixed with a nickel affinity resin (Qiagen) and MutS was batch-eluted with elution buffer containing 100 mM imidazole. After overnight dialysis MutS was stored at –80 °C in a buffer containing 350 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 50% glycerol. The concentration of MutS protein was determined using the Bradford reagent (Pierce) with bovine serum albumin as standard and the purity was estimated as >95% using Coomassie staining of a sodium dodecyl sulfate-acrylamide gel. The concentration was 1.5–2 mg/ml.

Preparation of the glutathione *S*-transferase-MutY fusion protein was carried out as previously described (41). The host strain was BL21 (ADE3) and the expression vector pGEX-MutY was kindly provided by Dr. S. Yonei. The strain transformed with pGEX-MutY was grown at 25 °C with shaking to an A_{600} of 0.6. Expression of the glutathione *S*-transferase-MutY fusion protein was induced by the addition of 50 μ M isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside, and growth was continued overnight at 25 °C. After centrifugation, the cells were resuspended in phosphate-buffered saline supplemented with protease inhibitor mixture, frozen at –20 °C, and then sonicated. After centrifugation the supernatant was applied to a glutathione-Sepharose 4B column (Amersham Biosciences) at 4 °C. The bound protein was eluted with 15 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 8. After dialysis, the glutathione *S*-transferase-MutY fusion protein was cleaved in phosphate-buffered saline by thrombin protease by overnight incubation at 4 °C and the final concentration was 0.5 mg/ml.

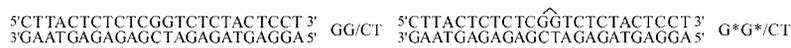
Platination and DNA Purification—The sequences of the oligonucleotides are shown in Fig. 1. Single-stranded oligonucleotides including those with a 3'-biotin label were purified on a 24% denaturing polyacrylamide gel. The preparation and purification of oligonucleotides containing single 1,2-d(GpG), d(ApG), or d(GpCpG) cisplatin intrastrand cross-links and the synthesis of the cisplatin interstrand cross-link was as described (42). The single-stranded purine-rich oligonucleotide 5'-AGGAGTAGAGATCGAGAGAGTAAG-3' was 5'-end labeled with T4 polynucleotide kinase and [γ - 32 P]ATP. Radiolabeled heteroduplexes GG/CT and G*G*/CT were prepared by mixing the 32 P-labeled oligonucleotide with a 1.5 molar excess of complementary purine-rich oligonucleotide containing a GG platination site without or with a cisplatin residue in annealing buffer (60 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA), heating at 75 °C for 5 min and slowly cooling at 4 °C. Radiolabeled duplexes GG/CT and G*G*/CT were then purified on non-denaturing 10% polyacrylamide gels. Unlabeled duplexes for competition experiments were annealed by combining equimolar amounts of the two complementary strands at concentrations of 1–3.5 μ M in annealing buffer at 75 °C followed by cooling to 4 °C.

Electrophoretic Mobility Shift Competition Assays—MutS (21 nM) was incubated in binding buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl $_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 80 μ g/ml acetylated bovine serum albumin, and 2% glycerol) with mixtures of 32 P-labeled duplex GG/CT (2 nM) and particular unlabeled duplex competitors at varying concentrations as indicated in 20 μ l. Reactions were allowed to reach equilibrium by incubation at 4 °C for 20 min. Gel loading buffer was added, and the reaction mixture was loaded on a 6% native polyacrylamide gel (37.5:1, acrylamide:bisacrylamide (w/w); 45 mM Tris borate, 0.5 mM EDTA, pH 8.3). Gels were electrophoresed for 1 h at 4 °C at 13 V/cm, dried, and exposed to an Amersham Biosciences PhosphorImager screen overnight. The fraction bound (radioactivity of the bound complex/total radioactivity) was determined by ImageQuant 5.1 software (Amersham Biosciences). Data analysis were carried out as described (43). We determined the concentration of various competitors necessary to decrease by 2-fold the amount of DNA shifted in the absence of competitor by linear regression of plots of the fraction of DNA bound in the absence of competitor divided by the fraction of DNA bound in the presence of competitor as a function of the competitor concentration.

Direct Binding Experiments—Varying concentrations of MutS (0 to 100 nM) were used to titrate 32 P-labeled duplex GG/CT or G*G*/CT (2 nM) in binding conditions as described above with the exception that no competitor DNA was present. The subsequent steps were the same as described under "Electrophoretic Mobility Shift Competition Assay."



Example of unplatinated and platinated DNA duplexes used in this study with their abbreviations



The fraction bound was calculated and plotted as a function of the protein concentration. Data were least-squares fitted to an equation for a simple two-state binding process (44) using Origin 6.0 software (Microcal, Northampton, MA).

Surface Plasmon Resonance (SPR) Measurements—SPR measurements were performed on a BIAcore 2000 at 15 °C using a streptavidin-coated chip and duplex DNA containing a 3'-biotin on the nonadducted purine-rich strand. 24-Mer oligonucleotides used for SPR were the same as those presented in Fig. 1 with the exception that the purine-rich strand oligonucleotides have a 3'-biotin. Various biotinylated duplexes were prepared by mixing biotinylated purine-rich strand with a 3-fold molar excess of pyrimidine-rich strand in annealing buffer at 75 °C followed by cooling to 4 °C. Platinated and unplatinated biotinylated DNA duplexes were bound to the streptavidin-coated SA sensor chip by injecting 10 μ l of 750 mM NaCl, 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, and 1.7 μ M biotinylated duplexes GG/CC, G*G*/CC, GG/CT, G*G*/CT, GG/TC, or G*G*/TC. MutS protein was injected at a flow rate of 20 μ l/min in running buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.0005% Tween 20, and 2% glycerol). Two washes of 10 μ l of running buffer containing 0.04% SDS were used to regenerate the surface after each injection of MutS. Binding to each duplex was assayed at five different concentrations of MutS (0–1000 μ M). To obtain kinetic parameters, late association phases and early dissociation phases of the resulting sensorgrams were fit to the Langmuir binding model using BIAevaluation software (version 2.0). The ratio of bound MutS per duplex DNA substrate was deduced from the stoichiometry formula ($\text{MutS response} \times \text{DNA } M_p$)/(DNA response \times MutS M_p), where MutS response is the maximal response (in RU) obtained at the plateau level, DNA response (in RU) corresponds to the plateau value for a DNA substrate, and DNA and MutS M_p are molecular weights of the DNA substrate and MutS, respectively.

To check the chemical stability of bound platinum residue within biotinylated duplexes, the platinated pyrimidine-rich strand was 5'-³²P-end labeled followed by hybridization with matched or mismatched complementary biotinylated strand. Labeled duplexes were then incubated in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mM EDTA at 25 °C for 24 h and loaded on a 24% denaturing polyacrylamide gel. After migration no product corresponding to unplatinated pyrimidine-rich strand was detected indicating that the platinum residue was not displaced from the strand.

MutY Adenine Glycosylase Assay—Radiolabeled double-stranded 24-mer oligonucleotides GG/CC, GG/AC, and G*G*/AC were prepared and purified as described above (with the purine-rich strand 5'-³²P-end-labeled). Reactions were as previously described with minor modifications (41). Briefly, duplexes (40 fmol) were incubated with MutY (130 ng) at room temperature in 10 μ l of reaction buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 μ g/ml bovine serum albumin, and 10 mM EDTA followed by the addition of 2 μ l of 2.5 M NaOH and heating at 95 °C for

5 min at the times indicated. The denaturated samples were electrophoresed on a 24% denaturing polyacrylamide gel followed by quantification by phosphorimaging.

RESULTS

Relative Binding Affinities of MutS for Cisplatin Bifunctional Adducts within the Context of Homoduplex DNA—We were first interested in determining whether bifunctional adducts of cisplatin could be recognized by the bacterial MutS within the context of homoduplex DNA. For this purpose we designed 24-mer oligonucleotide duplexes (Fig. 1) containing each of the four cisplatin bifunctional adducts considered as critical lesions for drug cytotoxicity: the 1,2-intrastrand d(GpG) and d(ApG) cross-links, the 1,3-d(GpCpG) intrastrand cross-link, and the interstrand cross-link formed at a d(GC/GC) site. To determine the relative affinities of purified *E. coli* MutS for the different platinated duplexes, we performed competition experiments using an electrophoretic mobility shift assay. We compared the abilities of the various platinated unlabeled 24-mer duplexes to compete with ³²P-labeled G/T containing duplex GG/CT. In agreement with previous data (45), the dissociation constant (K_d) for MutS with the duplex GG/CT was found to be 19 ± 3 nM as determined by direct titration experiments (data not shown). We confirmed that tagged MutS protein yielded the same results as untagged protein for all the binding experiments presented in this study. Fig. 2A shows typical competition experiments for which the ³²P-labeled duplex GG/CT was mixed with different amounts of the unlabeled duplex competitors GG/CT, GG/CC, and G*G*/CC that contained the major 1,2-intrastrand cisplatin cross-link. As expected, addition of unlabeled duplex GG/CT competes away the binding of MutS to the probe as judged by the decrease of the bound DNA (migrating with reduced electrophoretic mobility). Duplexes GG/CC and G*G*/CC inhibit weakly the binding of MutS to the probe, with the platinated duplex showing slightly greater inhibition. Data from competition experiments were plotted as the fractional binding of labeled duplex GG/CT in the absence of competitor relative to binding at various competitor concentrations as a function of competitor DNA concentrations as previously reported (43) (Fig. 2B). The concentration of competitor duplexes necessary to reduce GG/CT binding by 50% was used to determine the specificity for various compet-

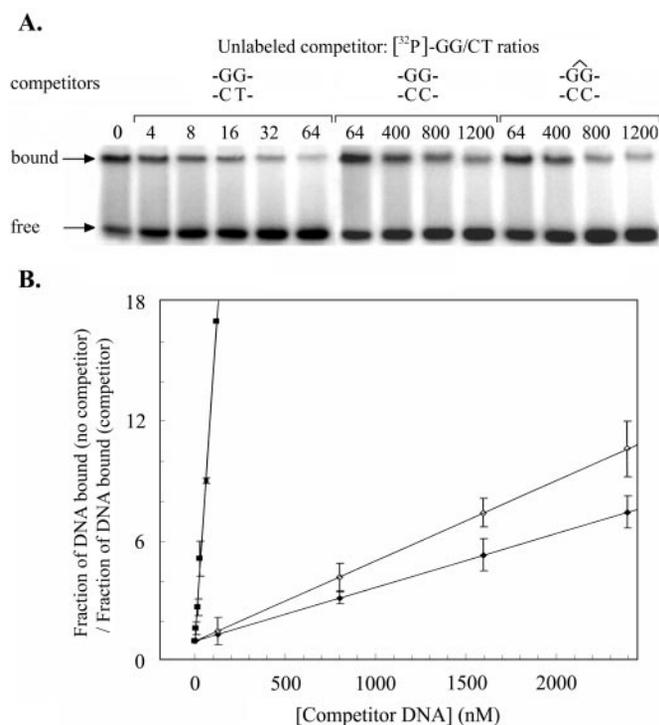


FIG. 2. Specificity of MutS binding to the 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link. A, a typical titration experiment with incubation of MutS (21 nM) with mixtures of ³²P-labeled heteroduplex GG/CT (2 nM) and varying concentrations of unlabeled competitor DNAs as indicated. B, data from A are plotted as the fraction of bound radiolabeled G/T probe in the absence of unlabeled competitor divided by the fraction bound at the indicated concentrations of unlabeled competitor as a function of the concentration of unlabeled competitor DNAs: heteroduplex GG/CT (solid squares), homoduplex GG/CC (solid diamonds), homoduplex G*G*/CC containing a 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link (open diamonds). Data points are means of triplicate measurements with error bars showing standard deviations.

TABLE I

Relative affinities of MutS binding to cisplatin-modified matched DNA substrates with respect to homoduplex DNA

Specificity of MutS for platinated homoduplex DNA substrates containing a site specifically placed cisplatin bifunctional adduct was deduced from experiments carried out by competition binding assays as shown in Fig. 2. Unlabeled competitor concentrations corresponding to 50% reduction in binding (ordinate of 2.0 in Fig. 2B) were used to determine the affinities relative to homoduplex DNA substrates (reciprocals of ratios of concentrations showing 50% reduction relative to the concentrations of homoduplex DNA substrates for each series GG, AG, GCG, and GC).

Platinated Homoduplex DNAs	$\widehat{-GG-}$ $-CC-$	$\widehat{-AG-}$ $-TC-$	$\widehat{-GCG-}$ $-CGC-$	$\widehat{-GC-}$ $-CG-$
Relative Affinity	1.5	0.9	0.5	0.3

itors relative to homoduplex DNA substrates. MutS was found to recognize specifically the homoduplex G*G*/CC containing a cisplatin 1,2-d(GpG) adduct. However, the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link is recognized with only a 1.5-fold specificity (Table I), whereas the duplex GG/CT containing a natural G/T mismatch is bound by MutS with a 47-fold higher preference (Table II). The adduct recognition appears to be sequence-independent as MutS binding was the same when the nature of the base pairs flanking the platination site was changed (CGGC or TGGT as central sequence for the purine-rich strand) or when the entire sequence was changed by using oligonucleotides previously studied in binding experiments with hMutS α

TABLE II

Relative affinities of MutS binding to cisplatin-modified mismatched DNA substrates with respect to homoduplex DNA

Specificity of MutS for various platinated and unplatinated heteroduplex DNAs was determined from titration experiments carried out by competition binding assays shown in Figs. 2 and 4. The affinities relative to homoduplex DNA substrates were determined as described in Table I. The DNA substrates belonging to both GG and AG series are ordered according to the specificity of MutS for platinated DNA substrates.

Relative Affinity							
GG series			AG series				
-GG- -CT-	47.4	$\widehat{-GG-}$ $-CT-$	129	-AG- -TT-	24.3	$\widehat{-AG-}$ $-TT-$	27.1
-GG- -CG-	2.6	$\widehat{-GG-}$ $-CG-$	10.3	-AG- -TG-	6.6	$\widehat{-AG-}$ $-TG-$	5.8
-GG- -TC-	24.1	$\widehat{-GG-}$ $-TC-$	5.9	-AG- -TA-	2.5	$\widehat{-AG-}$ $-TA-$	2.9
-GG- -GC-	2.6	$\widehat{-GG-}$ $-GC-$	5.5	-AG- -AC-	2.7	$\widehat{-AG-}$ $-AC-$	1.8
-GG- -AC-	1.8	$\widehat{-GG-}$ $-AC-$	5.5	-AG- -CC-	4.6	$\widehat{-AG-}$ $-CC-$	0.8
-GG- -CA-	1.6	$\widehat{-GG-}$ $-CA-$	2.0	-AG- -GC-	1.5	$\widehat{-AG-}$ $-GC-$	0.3

(34, 35) (data not shown). These data for MutS and those of Duckett *et al.* (34) for hMutS α show weak binding to the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link with 30- and 10-fold, respectively, weaker efficiencies as compared with a single G/T mismatch.

Following the same procedure, recognition of DNA substrates containing other cisplatin bifunctional adducts were tested. Competitors containing either a 1,2-d(ApG) intrastrand cross-link, a 1,3-d(GpCpG) intrastrand cross-link, or an interstrand cross-link formed at a d(GC/GC) site compete less efficiently with the labeled G/T heteroduplex than the corresponding unplatinated competitors as deduced from the values of specificity reported in Table I. This implies that the 1,2-d(GpG) intrastrand adduct is the unique cisplatin bifunctional adduct recognized specifically by MutS. This suggests that 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link is the lesion recognized *in vitro* by MutS in globally cisplatin-modified DNA (38).

MutS Recognition of Cisplatin Intrastrand Cross-links When a Mismatched Thymine Is Opposite One Platinated Guanine—hMutS α was found to recognize more efficiently a d(GpG) adduct when it is part of two compound lesions formed after misincorporation of a thymine opposite either 3'- or 5'-platinated guanine (35). Because these substrates have not been studied for binding with MutS, we first investigated the recognition by MutS of the duplex G*G*/CT containing a 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link with a thymine opposite the 3'-modified guanine. As shown in Fig. 3, MutS binds strongly to the mismatched G*G*/CT substrate. The determined K_d value of 7 ± 1 nM shows that the presence of the adduct stimulates the binding activity of the protein by about 3 times as compared with the unplatinated G/T substrate ($K_d = 19 \pm 3$ nM, above). As shown in Fig. 4 and Table II, this difference in binding was also confirmed in competition experiments. Next, we tested recognition of another compound lesion in which a thymine residue is now located opposite the 5'-platinated guanine of the 1,2-d(GpG) adduct. The duplex G*G*/TC competes less efficiently than GG/TC (Fig. 4); the presence of the adduct decreases the affinity of the protein with a factor of 4-fold (Table II). These data indicate that according to the position of the

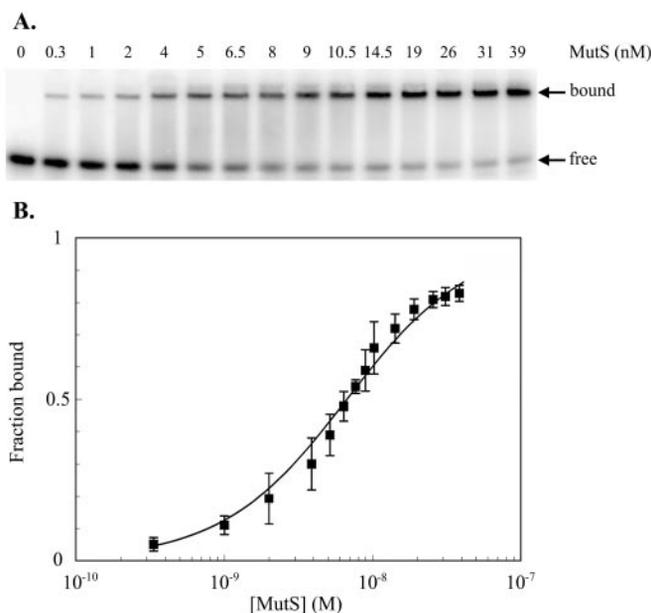


FIG. 3. Interaction of MutS with DNA substrates with cisplatin compound lesions, containing a 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in one strand and a mispaired thymine opposite the 3'-platinated guanine in the other. A, MutS was incubated with ^{32}P -labeled duplex $\text{G}^*\text{G}^*/\text{CT}$ (2 nM) and binding was assayed as described under "Direct Binding Experiments." The concentration of MutS was varied as indicated. B, plot of the data from panel A; data were fitted to an equation for a simple two-state binding process.

mismatched thymine, the cisplatin adduct can stimulate or can impair MutS recognition. Interestingly, this effect has also been observed with hMutS α (35) suggesting that both bacterial and human proteins exhibit similar binding properties with cisplatin compound lesions.

In contrast to the stimulation by the adduct to binding of MutS with the duplex $\text{G}^*\text{G}^*/\text{CT}$, a DNA substrate containing a cisplatin 1,2-d(ApG) intrastrand cross-link with a T opposite the platinated guanine competes with the same order of magnitude as the corresponding unplatinated heteroduplex (Fig. 4, Table II). Thus, the 1,2-d(ApG) intrastrand cross-link can be recognized because of the presence of the misincorporated thymine opposite the adducted guanine.

MutS Recognizes an Extensive Set of Cisplatin 1,2-Intrastrand Cross-link/Base Mismatches—Results on cisplatin mutagenicity in both prokaryotic and eukaryotic cells indicate that several different compound lesions can be produced and that adenine or guanine rather than thymine are preferentially mispaired opposite 1,2-intrastrand adducts (14–17). To identify the compound lesions specifically bound by a MMR binding activity, we analyzed interaction of MutS with platinated duplexes containing all other possible mispaired bases opposite the 5'- or the 3'-platinated base of the 1,2-d(GpG) or -d(ApG) cross-links. Again, the abilities of various mismatched DNA substrates with or without a 1,2-intrastrand cross-link to compete with radiolabeled duplex GG/CT were compared by competition experiments; the relative binding affinities for MutS are reported in Table II. The trend in affinity for mismatches is $\text{G/T} > \text{G/G} > \text{G/A}$ for unplatinated duplexes in the GG series and $\text{G/T} > \text{G/G} > \text{A/C} > \text{A/A} > \text{G/A}$ for unplatinated duplexes in the AG series. This order of affinity qualitatively agrees with that reported previously, and the specific recognition of these mismatches by MutS is consistent with their repair both *in vitro* and *in vivo* (46, 47). Among nine platinated duplexes of the GG and AG series with G/G, G/A, A/A, and A/C mismatches, seven are specifically bound by MutS (Table II). This result illustrates the capacity of MutS to bind DNA containing a large

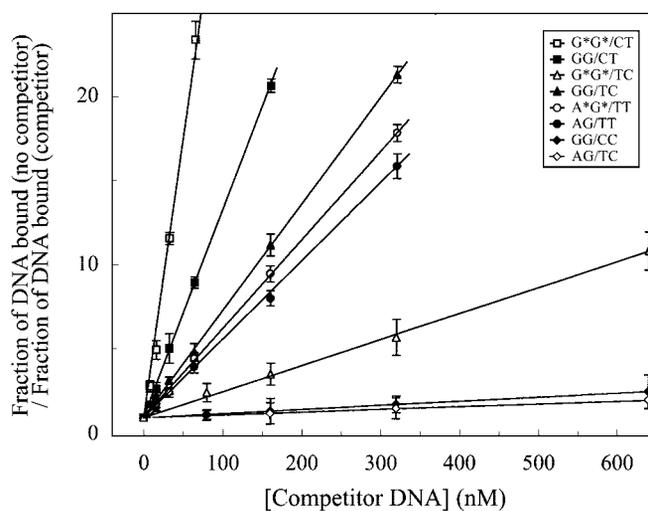


FIG. 4. Competition for MutS binding by DNA substrates containing cisplatin compound lesions. Data from competition binding experiments are plotted as described in the legend to Fig. 2B. Competition binding experiments were similar to those shown in Fig. 2A with labeled duplex GG/CT (2 nM), MutS (21 nM), and unlabeled DNA duplex competitors (20 to 620 nM). Data points are means of triplicate measurements with error bars showing standard deviations.

variety of cisplatin compound lesions. Mutagenesis studies have shown that d(GpG) and d(ApG) adducts primarily induced, respectively, G to T and A to T transversions and less frequently G to C and A to C transversions, with a preponderance located at the 5'-modified base in prokaryotes (14). Our finding that MutS recognizes specifically the 1,2-d(GpG) adduct when the complementary strand contains an adenine or a guanine opposite the 5'-platinated guanine and the d(ApG) adduct with a mispaired adenine opposite the 5'-platinated adenine strengthens the likelihood of a role of such compound lesions in mechanisms linking cisplatin cytotoxicity and MMR.

Among the seven platinated duplexes with mispaired bases opposite either modified base that we have found to act as specific competitors, five are more effective than the corresponding unadducted heteroduplexes. The increase in affinity occurs with the major cisplatin adduct for all G/A and G/G mispairs tested and is independent of the mispair location (opposite 3'- or 5'-platinated guanine). As compared with the mismatched duplexes, the presence of 1,2-d(GpG) adduct increased the specificity of MutS by 5-, 3-, and 2-fold for the duplexes $\text{G}^*\text{G}^*/\text{CG}$, $\text{G}^*\text{G}^*/\text{AC}$, and $\text{G}^*\text{G}^*/\text{GC}$, respectively. This effect also occurs with 1,2-d(ApG) adduct in the case of the duplex $\text{A}^*\text{G}^*/\text{TA}$. Inversely, the presence of this adduct can decrease the relative ability of a mismatched substrate to compete, as observed with the competitor $\text{A}^*\text{G}^*/\text{TG}$. An even more dramatic effect was observed with the duplexes $\text{A}^*\text{G}^*/\text{CC}$ and $\text{A}^*\text{G}^*/\text{GC}$ as the presence of the adduct abolishes MutS recognition of A/C and A/G mismatches, respectively. These results indicate that the nature of the 1,2-intrastrand adduct can play a differential role in mismatch recognition of cisplatin compound lesions.

SPR Analysis of MutS Binding to Platinated DNA Substrates—We used SPR to examine the kinetics of binding of MutS to oligonucleotide duplexes containing either a 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link or a 1,2-d(GpG) adduct with a mismatched thymine opposite either the 5'- or 3'-platinated guanine.

For binding of platinated and unplatinated 24-base pair duplexes to the Biacore streptavidin chip, a biotin residue was added to the 3' end of the unadducted purine-rich strand. Because platinum has affinity for sulfur donors (48), we

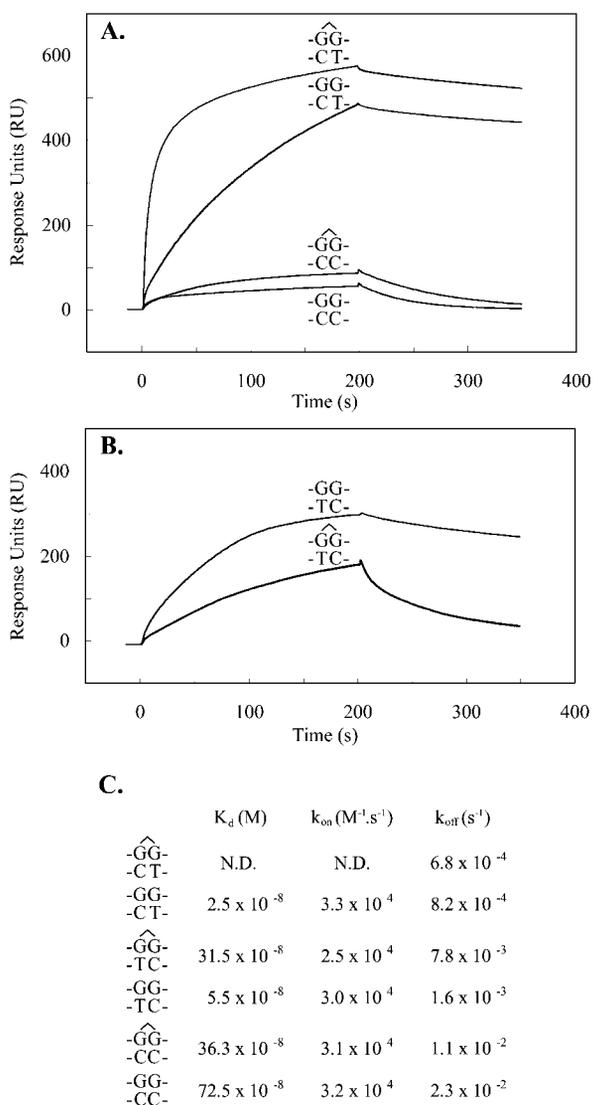


FIG. 5. BIAcore analysis of MutS binding to matched and mismatched DNA substrates containing a 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link. A, kineticgrams of binding and dissociation phases of MutS (100 nM) interacting with the following immobilized duplexes: GG/CC (30 RU), G*G*/CC (26 RU), GG/CT (55 RU) G*G*/CT (50 RU). B, as for A but with 120 nM MutS and with GG/TC (29 RU) and G*G*/TC (33 RU). C, kinetic and thermodynamic parameters were obtained by monitoring kineticgrams at different MutS concentrations for each DNA substrate used in A and B. The resulting kineticgrams were fit to a 1:1 Langmuir binding model using BIAevaluation software. K_d values are “apparent K_d ” and are determined only to enable comparison between the different substrates. ND, not determined.

showed that the stability of the 1,2-d(GpG) adduct within a duplex was unaffected by the presence of a sulfur-containing biotin residue (see “Experimental Procedures”). After immobilizing the appropriate biotinylated duplexes to separate flow cells, MutS was injected over the surfaces. As shown in Fig. 5A, the maximum level of binding of MutS to the heteroduplex GG/CT is much higher as compared with that of the perfectly paired duplex, as expected for a mismatch binding protein. As deduced at saturation binding obtained at a higher protein concentration ($RU_{max} = 650$, data not shown), MutS as a dimer was found to bind to the heteroduplex in a 1:1 manner, in agreement with previous studies (40, 49). Adding a cisplatin 1,2-intrastrand adduct to the GG/CC homoduplex results in an increase of the plateau level. A similar increase occurred when the mismatched thymine was opposite the 3'-platinated guanine. Examination of the association and dissociation phases

shows that the kinetic parameters responsible for the affinity increase are different for homoduplex and heteroduplex: with the homoduplex, this increase relates to variations of the dissociation rate, whereas for the heteroduplex it is the association step that is changed. In contrast, when the mismatched thymine is opposite the 5'-modified guanine, the plateau level of the platinated heteroduplex is lower (Fig. 5B). In this case, MutS dissociation is more rapid as compared with the corresponding unplatinated mismatched duplex GG/TC. The SPR data are in qualitative agreement with results obtained from competition experiments.

The association and dissociation rate constants and the relative affinities of MutS for the different DNA substrates were determined by injecting increasing concentrations of MutS through the cells (data not shown). Most of the kineticgrams were fitted with a 1:1 Langmuir model. The association rate for the MutS-G*G*/CT complex was not determined because of a complex biphasic type of interaction; a fit of the dissociation phase using a single exponential decay model provided the dissociation rate constant for this platinated substrate. Summary of data are reported in Fig. 5C. Our thermodynamic parameters compare well with those previously obtained with G/T-containing DNA substrates (50). The dissociation rate of MutS from the platinated homoduplex is 2-fold lower as compared with the corresponding unplatinated duplex and the affinity decrease for duplex G*G*/TC is related to a 4.8-fold increase in MutS dissociation as compared with duplex GG/TC. Thus, these data confirmed that the variations in the dissociation phase can explain the differences in MutS affinity for duplexes G*G*/CC and G*G*/TC as compared with their corresponding unplatinated duplexes.

Compound Lesions with Adenine Opposite Either Platinated Guanine of the Major Cisplatin Intrastrand Cross-link Are Not Substrates for the Bacterial DNA Glycosylase MutY—Although MutS recognizes specifically a 1,2-d(GpG) cisplatin cross-link when an adenine is opposite either platinated guanine, it is possible that *in vivo*, these lesions are primarily substrates for MutY, a DNA glycosylase responsible for the first step of base excision repair of adenine misincorporated opposite guanine or opposite the damaged guanine, 8-oxoguanine (51). Due to its glycosylase activity, it is difficult to study the binding of MutY with DNA substrates containing a G/A mismatch. Therefore, we compared the glycosylase activity of MutY with the same 24-mer duplexes as above containing a mispaired adenine opposite unplatinated or platinated guanine in a 1,2-d(GpG) cross-link. In the experimental conditions used here,apurinic sites generated by the removal of mispaired adenines by MutY were chemically converted to strand breaks. The resulting fragmented products were then analyzed on a denaturing gel. As shown in Fig. 6A, the 24-mer double-stranded oligonucleotide GG/AC bearing a mismatched adenine yields a product comigrating with a 12-mer oligonucleotide thus showing the glycosylase activity of MutY. No cleavage was detected with the corresponding matched duplex GG/CC. Incubation of MutY with a DNA substrate containing a mispaired adenine opposite the 5'-platinated guanine of 1,2-d(GpG) cross-link did not result in cleavage. The same result was obtained with duplex G*G*/CA (data not shown). This loss of activity could result from either a lack of duplex recognition by MutY or an inhibition of the glycosylase activity by cisplatin. To test the former hypothesis, we compared the efficiency of competitor duplexes GG/CC or G*G*/AC in inhibiting the cleavage reaction of the G/A mispair-containing duplex (Fig. 6B). We found that duplexes G*G*/AC inhibited the cleavage reaction but with the same efficiency as the matched duplex GG/CC. The same result was obtained with duplexes G*G*/CA (data not shown). Thus

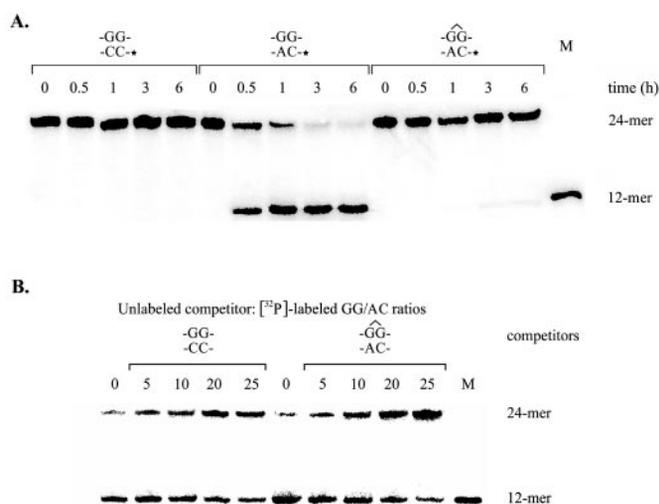


FIG. 6. Interaction of the base excision repair protein MutY with a cisplatin compound lesion formed when a misincorporated adenine is opposite the 5' guanine of 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link. A, a cleavage assay with mismatched adenine-containing unplatinated and platinated duplexes was carried out with MutY. The strand of duplexes containing the mispaired adenine on the corresponding strand for the homoduplex GG/CC were 5'-end radiolabeled. Each radiolabeled duplex was incubated with MutY, aliquots were withdrawn at the times indicated and the reaction was quenched by heating in NaOH, which also served to induce strand cleavage at the abasic site. The amount of cleavage at the apurinic site was monitored by denaturing PAGE. The removal of adenine by MutY activity is shown by the appearance of a reaction product comigrating with a 12-mer oligonucleotide (lane M). B, comparative inhibition of MutY glycosylase activity with duplexes GG/CC and G^{*}G^{*}/AC. Radioactive mispaired adenine-containing duplex GG/AC (4 nM) and MutY (130 ng) were incubated with various concentrations of unlabeled competitor. Lanes 1 and 6, no competitor DNA; lanes 2–5, homoduplex GG/CC; lanes 7–10, heteroduplex G^{*}G^{*}/AC containing a misincorporated adenine opposite the 5'-adducted guanine of a 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link; lane M, standard 12-mer oligonucleotide. *, ³²P-labeled strand at the 5' terminus.

the major cisplatin intrastrand cross-link abolishes the specific recognition of a G/A mismatch by MutY. Although competition between MutS and MutY does occur for the repair of G/A mismatches, our data show that it no longer occurs in the presence of a 1,2-d(GpG) cisplatin cross-link.

DISCUSSION

Recognition of cisplatin-DNA adducts by MutS or its human homolog MutS α is thought to be a necessary event in the biochemical processes linking the MMR system with drug cytotoxicity. In this study, we have examined the ability of MutS to specifically recognize cisplatin-modified matched or mismatched DNA substrates.

Cisplatin generates a range of bifunctional DNA lesions but our study showed that MutS-specific recognition is limited to the most abundant 1,2-d(GpG) adduct (Table I). The fact that MutS does not recognize specifically a d(ApG) adduct is unexpected because the DNA structure induced by both adducts is considered to be very similar. Indeed these adducts induced a bending and an unwinding of the DNA helix to the same extent (2), but distortions are more pronounced for the 5'-adducted base pair of the 1,2-d(ApG) adduct as compared with the 1,2-d(GpG) cross-link indicating structural differences at the nucleotide level (52). On the other hand, because mismatch recognition by MutS was previously shown to be affected by the nature of the flanking base pairs (46, 53), it is possible that the different chemical nature of the 5' base pair of the cross-linked d(GpG) and d(ApG) sites may also play a role. In contrast to the 1,2-d(ApG) adduct, the structures of 1,3-intrastrand and inter-strand cross-links differ significantly from that of the major

cisplatin lesion (2, 10) and these adducts were not preferentially recognized by MutS (Table I). These data demonstrate the ability of MutS to distinguish between 1,2-d(GpG) intrastrand cross-links and other bifunctional cisplatin lesions and hence illustrate its potential role as a cisplatin DNA damage sensor.

In our assay conditions enabling high affinity and specificity, competition binding analysis revealed that the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link is poorly recognized by MutS with a 1.5-fold specificity as compared with an equivalent unadducted DNA substrate (Fig. 2B). Despite this relatively weak affinity, this binding might be sufficient for MMR-dependent processing of the 1,2-d(GpG) cross-link as a G/A mismatch, which shows that similar binding is known to be repaired by MMR *in vitro* and *in vivo* (46, 53). On the other hand, this adduct can also interact with a variety of cellular proteins as demonstrated in eukaryotes (for reviews see Refs. 54 and 55), and as a consequence MMR binding activity to this adduct might be less favored. In this case, SPR kinetic data can be helpful to predict the result of the competition between different cisplatin DNA damage-binding proteins. Indeed, the competition of two proteins for a platinated DNA substrate has recently been correlated to their rates of association. Box B of the high mobility group box protein 1 (HMGB1) whose k_{on} is close to the diffusion limit ($\approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (56) selectively binds to a 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in the presence of human replication protein A (57), a DNA damage recognition protein in the nucleotide excision repair pathway that associates with this lesion at a rate that is about 2 orders of magnitude lower (58). In the present study our SPR assay demonstrated a k_{on} of $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for MutS binding to the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in agreement with values published for MutS and eukaryotic MutS α interacting with various DNA substrates (50, 59, 60). Thus the kinetic data obtained with MutS reveal a significantly slower rate of association as compared with box B of HMGB1 and replication protein A, and so suggest that these proteins occupy the major cisplatin intrastrand cross-link before the MMR system can trigger downstream events. In support for this view, the nucleotide excision repair activity of human cellular extracts with a DNA substrate containing the major 1,2-intrastrand cross-link was shown to be unaffected by the presence of hMutS α (13) and a number of cellular proteins including HMGB, replication protein A, TATA-binding protein, human upstream binding factor, and Ku autoantigen have been identified in human cell extracts as cisplatin DNA damage-binding proteins but not mismatch binding proteins (35, 55).

Several observations both *in vitro* and *in vivo* are consistent with the existence of a variety of cisplatin compound lesions that are formed during replicative bypass of 1,2-intrastrand cross-links with misincorporation of a base opposite one of the adducted purines. In the course of this work, all three possible mispaired bases opposite the adducted purines (T, G, A and G, A, C opposite the adducted guanines and adenine, respectively) were tested for binding with MutS. We found that all the compound lesions with 1,2-d(GpG) cross-link and four of six with the 1,2-d(ApG) intrastrand adduct were specifically recognized by MutS (Table II). Duplexes containing the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link were recognized more efficiently when a mispaired base was opposite either platinated guanine; the ability of the protein to bind DNA substrates with the 1,2-d(ApG) intrastrand adduct was dependent on a mismatched base opposite the adduct except in two cases. These results are similar to other reports that have shown that a substrate with O(6)-methylguanine opposite a thymine is preferentially bound by MutS (61) and hMutS α (62); ultraviolet light photoproducts when opposite mismatched bases are also

preferentially bound by hMutS α (43). However, an unexpected effect reported here is that the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link results in an increase of MutS mismatch binding activity. Such an effect occurs when all possible mispaired bases are placed opposite either platinated guanine except when a mispaired thymine is opposite the 5'-platinated guanine (Fig. 4, Table II). Compound lesions with a 1,2-d(ApG) adduct are less well recognized and the stimulation of binding they cause is quantitatively less important than that observed with the 1,2-d(GpG) cross-link. On the other hand, it is noteworthy that the nature of the mispaired base is also an important parameter for binding to compound lesions. Indeed, with respect to MutS binding efficiency, compound lesions follow the same order as the corresponding unplatinated mismatches. These results are consistent with a mutual influence of both the cisplatin adduct and the mispair on the recognition of cisplatin compound lesions by MutS. Taken together, our data clearly show that a large spectrum of cisplatin compound lesions with both 1,2-intrastrand cross-links are good substrates for MutS recognition including those that are principally formed *in vivo*, namely, compound lesions with an adenine opposite the 5' purine of either 1,2-intrastrand cross-link. We have yet to determine whether a cisplatin lesion could activate MutS to engage MMR activity or other downstream events following the recognition step of a compound lesion. However, it is conceivable that the significant binding activity of MutS for a majority of compound lesions and even more for the preference shown for these compound lesions over mismatched bases could have a bearing on MMR activity, especially as MutS binding affinity does correspond to the efficiency of mismatch correction (46).

We cannot exclude the *in vivo* recognition of compound lesions by binding proteins other than MutS. In particular, a subset of compound lesions could be substrates for other mismatch processing pathways. To address this question, we showed that significant cisplatin compound lesions containing G/A mispairs are not recognized by the MutY-dependent mismatch repair pathway indicating that recognition of such lesions could be restricted to MutS. Similarly, in eukaryotes, binding activity of human cell extracts with two cisplatin compound lesions (a mismatched thymine opposite either adducted guanine in a 1,2-d(GpG) adduct) seemed strictly dependent on hMutS α (35). However, repair of these lesions in human cell extracts seems to argue that proteins of the nucleotide excision repair pathway may interact with compound lesions (63). Further studies will be needed to determine whether proteins from nucleotide excision repair and MMR compete for binding to cisplatin compound lesions.

Models have been proposed to explain the connection between the MMR pathway and cytotoxicity of cisplatin (26–29). Some of them include molecular mechanisms initially proposed for recognition of cisplatin DNA damage by protein such as HMG box proteins. In these models, a first obligatory step is a relatively tight binding of a protein to a cisplatin lesion but not to compound lesions. As a consequence, the resulting nucleoprotein complex could block replication past an adduct leading to either a cytotoxic response and/or inhibition of the nucleotide excision repair by shielding the lesion, therefore allowing its persistence in the genome. As shown in the present study, the fact that MutS recognized poorly the major cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link reduces considerably the likelihood of such models. Our interaction study is more consistent with other models whereby compound lesions are the critical lesions. A well known model already proposed for cisplatin and other DNA damaging agents is called the futile repair model (29). It was proposed that MMR could be capable of repeatedly initiating repair of the mispaired base opposite a cisplatin

adduct within the newly replicated strand leading to the accumulation of secondary cytotoxic lesions (DNA strand breaks) (24, 26). Another attractive model involves an antirecombinogenic activity of MMR. Such a possibility has been recently proposed in *Saccharomyces cerevisiae* and is thought to involve a RAD52-dependent recombinational bypass during replication (27). In bacterial cells, recombination has recently been implicated in the replicative bypass of cisplatin lesions (64). One possibility is that MutS binds to cisplatin compound lesions that could be formed during recombination bypass, leading to inhibition of survival mediated by recombination-dependent bypass. In this context, the fact that MutS binds less efficiently to the 1,2-d(ApG) intrastrand adduct than to the 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link when they are part of a compound lesion could contribute to a higher proportion of error-prone bypass of 1,2-d(ApG) adducts that could explain in part the higher mutagenic effect of this adduct in MMR proficient bacterial cells (14, 15). It would be of interest to investigate cisplatin mutagenesis in mismatch repair deficient cells to ascertain such a relationship. As an alternative to the models presented above, a more direct signaling pathway has been proposed (28); in such a model, the assembly of the eukaryotic hMutS α and hMutL α proteins at a specific lesion would then directly trigger apoptotic processes by yet unknown biochemical events that depend on the presence of a lesion (62). It would be of interest to test such a model with various cisplatin compound lesions.

The results presented here have identified critical primary DNA lesions of cisplatin, which recognition is a prerequisite step in the chain of events leading to cisplatin cytotoxicity mediated by MMR. Correlation have been established between loss of MMR in cancer cells and resistance or tolerance to cisplatin. Continued investigations into the molecular mechanisms by which MMR pathways can modulate the cellular response to cisplatin may be helpful to improve the therapeutic use of this drug and in the design of new platinum-based drugs.

Acknowledgments—We thank F. Culard and M.-J. Giraud-Panis for critical reading of the manuscript, M. Marinus and S. Yonei for the MutS and MutY expression vectors, respectively, C. Marcaillou for expert technical assistance, and J. Weissenbach for helpful encouragement.

REFERENCES

1. Einhorn, E. H. (1997) *Clin. Cancer Res.* **3**, 2630–2632
2. Jamieson, E. R., and Lippard, S. J. (1999) *Chem. Rev.* **99**, 2467–2498
3. Kartalou, M., and Essigmann, J. M. (2001) *Mutat. Res.* **478**, 23–43
4. Brabec, V. (2002) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **71**, 1–68
5. Henkels, K. M., and Turchi, J. J. (1997) *Cancer Res.* **57**, 4488–4492
6. Eastman, A. (1999) in *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (Lippert, B., ed) pp. 111–134, V. H. C. A., Wiley-VCH, Zurich
7. Eastman, A. (1987) *Pharmacol. Ther.* **34**, 155–166
8. Lepre, C. A., and Lippard, S. J., (1990) in *Nucleic Acids and Molecular Biology* (Eckstein, F., Lilley, D. M. J., eds) pp. 9–38, Springer-Verlag, Berlin
9. Reedijk, J. (1999) *Chem. Rev.* **99**, 2499–2510
10. Malinge, J.-M., Giraud-Panis, M.-J., and Leng, M. (1999) *J. Inorg. Biochem.* **77**, 23–29
11. Gibbons, G., Kaufman, W. and Chaney, S. (1991) *Carcinogenesis* **12**, 2253–2257
12. Mamenta, E. L., Poma, E. E., Kaufman, W., Delmastro, D. A., Grady, H. L., and Chaney, S. G. (1994) *Cancer Res.* **54**, 3500–3505
13. Mu, D., Tursun, M., Duckett, D. R., Drummond, J. T., Modrich, P., and Sancar, A. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 760–769
14. Yarema, K. J., Wilson, J. M., Lippard, S. J., and Essigmann, J. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **236**, 1034–1048
15. Yarema, K. J., Lippard, S. J., and Essigmann, J. M. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4066–4072
16. Pillaire, M. J., Margot, A., Villani, G., Sarasin, A., Defais, M., and Gentil, A. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 2519–2524
17. Munoz, E. F., Diwan, B. A., Calvert, R. J., Weghorst, C. M., Anderson, J., Rice, J. M., and Buzard, G. S. (1996) *Carcinogenesis* **17**, 2741–2745
18. Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. (2000) *Biochemistry* **39**, 4575–4580
19. Vaisman, A., and Chaney, S. G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13017–13025
20. Masutani, C., Kusumoto, R., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2000) *EMBO J.* **19**, 3100–3109

21. Gong, J. G., Costanzo, A., Yang H.-Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M., and Wang, J. Y. J. (1999) *Nature* **399**, 806–809
22. Lan, Z., Sever-Chroneos, Z., Strobeck, M. W., Park, C. H., Baskaran, R., Edelmann, W., Leone, G., and Knudsen, E. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8372–8381
23. Drummond, J. T., Anthoney, A., Brown, R., and Modrich, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19645–19648
24. Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barette, J. C., Hamilton, T. C., and Chaney, S. G. (1998) *Cancer Res.* **58**, 3579–3585
25. Brown, R., Hirst, G. L., Gallagher, W. M., McHwrath, Margison, G. P., van der Zee, A. G. J., and Anthoney, A. (1997) *Oncogene* **15**, 45–52
26. Fink, D., Aebi, S., and Howell, S. (1998) *Clin. Cancer Res.* **4**, 1–6
27. Brown, R. (2000) in *Platinum-based Drugs in Cancer Therapy* (Kelland, L. R., and Farrell, N., eds) pp. 115–148, Humana Press Inc., Totowa, NJ
28. Fishel, R. (2001) *Cancer Res.* **15**, 7369–7374
29. Karran, P. (2001) *Carcinogenesis* **22**, 1931–1937
30. Fram, R. J., Cusick, P. S., Wilson, J. M., and Marinus, M. G. (1985) *Mol. Pharmacol.* **28**, 51–55
31. Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J., and Modrich, P. (1995) *Science* **268**, 1909–1912
32. Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M., Guerette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., and Fishel, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13629–13634
33. Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T., and Jiricny, J. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1181–1184
34. Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I. H., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. J., and Modrich, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 6443–6447
35. Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R., and Karran, P. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 491–495
36. Marra, G., and Schär, P. (1999) *Biochem. J.* **338**, 1–13
37. Mello, J. A., Acharya, S., Fishel, R., and Essigmann, J. M. (1996) *Chem. Biol.* **3**, 579–589
38. Zdraveski, Z. Z., Mello, J. A., Farinelli, C. K., Essigmann, J. M., and Marinus, M. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1255–1260
39. Drotschmann, K., Aronshtam, A., Fritz, H.-J., and Marinus, M. G. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 948–953
40. Galio, L., Bouquet, C., and Brooks, P. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 2325–2331
41. Zhang, Q.-M., Ishikawa N., Nakahara, T., and Yonei, S. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 4669–4675
42. Malinge, J.-M., Schwartz, A., and Leng, M. (2000) in *DNA-Protein Interactions* (Travers, A., and Buckle M., eds) pp. 25–35, Oxford University Press Inc., New York
43. Wang, H., Lawrence, C. W., Li, G. M., and Hays, J. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16894–16900
44. Giraud-Panis, M.-J., and Lilley, D. M. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33148–33155
45. Blackwell, L. J., Bjornson, K. P., Dwayne, J. A., and Modrich, P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 34339–34347
46. Su, S.-S., Lahue, R. S., Au, K. G., and Modrich, P. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6829–6835
47. Jones, M., Wagner, R., and Radman, M. (1987) *Genetics* **115**, 605–610
48. Cotton, F. A., and Wilkinson, G. (1980) *Advanced Inorganic Chemistry*, 4th Ed., Wiley, New York
49. Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P., and Griffith, J. D. (1997) *EMBO J.* **16**, 4467–4476
50. Johnson, K. A., Mierzwa, M. L., Fink, S. P., and Marnett, L. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 27112–27118
51. House, P. G., Volk, D. E., Thiviyanathan, V., Manuel, R. C., Luxon, B. A., Gorenstein, D. G., and Lloyd, R. S. (2001) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **68**, 349–363
52. Schwartz, A., Marrot, L., and Leng, M. (1989) *Biochemistry* **28**, 7975–7979
53. Jiricny, J., Su, S.-S., Wood, S. G., and Modrich, P. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 7843–7854
54. Cohen, S. M., and Lippard, S. J. (2001) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **67**, 93–130
55. Kartalou, M., and Essigmann, J. M. (2001) *Mutat. Res.* **478**, 1–21
56. Jamieson, E. R., Jacobson, M. P., Barnes, C. M., Chow, C. S., and Lippard, S. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12346–12354
57. Patrick, S. M., and Turchi, J. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 8808–8815
58. Patrick, S. M., and Turchi, J. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16096–16101
59. Marsischky, G. T., and Kolodner, R. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26668–26682
60. Mazurek, A., Berardini, M., and Fishel, R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8260–8266
61. Babic, I., Andrew, S. E., and Jirik, F. R. (1996) *Mutat. Res.* **372**, 87–96
62. Berardini, M., Mazurek, A., and Fishel, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27851–27857
63. Moggs, J. G., Szymkowski, D. E., Yamada, M., Karran, P., and Wood, R. D. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 480–490
64. Zdraveski, Z. Z., Mello, J. A., Marinus, M. G., and Essigmann, J. M. (2000) *Chem. Biol.* **7**, 39–50

CHAPITRE II : PROPRIETES BIOCHIMIQUES DE LA PROTEINE MutS EN PRESENCE DE L'ADDUIT 1,2-d(GpG) SURIMPOSE À UN MESAPPARIEMENT G/T

I Introduction

Dans la première partie de mon travail, nous montrons que six composés de lésions contenant l'adduit intrabrin majoritaire 1,2-d(GpG) et quatre composés de lésions contenant l'adduit intrabrin 1,2-d(ApG) sont reconnus spécifiquement par la protéine MutS. Nous pensons que ce type de lésions, en particulier celles contenant l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) reconnues plus efficacement par MutS, pourraient être des lésions critiques dans les mécanismes biochimiques reliant le système MMR à la cytotoxicité du cisplatine.

On sait que les étapes suivant la reconnaissance d'un mésappariement par le système MMR sont régulées par la fixation d'ATP sur la protéine MutS. D'autre part, dans les deux mécanismes proposés pour expliquer le rôle des nucléotides dans le fonctionnement du système MMR (voir chap. I V 2 a et b), la première étape correspond à la fixation de l'ATP par la protéine, ce qui entraîne une baisse d'affinité pour l'ADN contenant un mésappariement (ADN mésapparié) après un changement de conformation de la protéine (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000). Cette nouvelle conformation permettrait à la protéine de quitter le mésappariement et de transloquer le long de l'ADN pour signaler la présence du mésappariement et recruter les protéines nécessaires au déclenchement de la réparation. Suivant les modèles, cette translocation nécessite l'hydrolyse de l'ATP (Allen et coll., 1997) ou se fait par diffusion passive ("sliding clamp", Fishel, 1998). Les analogues de l'ATP non hydrolysables (ATP γ S ou AMPPNP) induisent aussi le départ de MutS du mésappariement (Joshi et coll., 2000 ; Blackwell et coll., 2001), ce qui suggère que la fixation de l'ATP suffit à déclencher cette étape.

Nous avons étudié l'effet des nucléotides ADP et ATP et de l'AMPPNP, un analogue de l'ATP non hydrolysable en présence de Mg²⁺, sur l'interaction de MutS avec un composé de lésion du cisplatine contenant une thymine mésappariée avec la guanine en 3' de l'adduit

1,2-d(GpG) (duplexe de 24 paires de bases G*G*/CT) afin de savoir si la présence d'un composé de lésion du cisplatine peut modifier les propriétés biochimiques de la protéine. Dans un premier temps, nous avons comparé l'effet des nucléotides sur MutS en présence du duplexe G*G*/CT et de l'hétéroduplexe non platiné correspondant GG/CT. Nous nous sommes ensuite intéressés à la fixation de l'ATP par MutS en interaction avec le duplexe G*G*/CT. L'utilisation de l'analogue non hydrolysable nous a permis de déterminer l'affinité relative de la protéine pour cet analogue en présence des hétéroduplexes platiné ou non platiné.

Nous montrons dans cette étude que les propriétés de reconnaissance par la protéine MutS de l'ADN mésapparié sont modifiées du fait de la présence de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine. En particulier, un résultat est que la baisse d'affinité de MutS pour l'ADN mésapparié en présence d'ATP ou d'AMPPNP est abolie par la présence de l'adduit. Nous proposons que ce résultat est dû à la baisse d'affinité de l'adénosine triphosphate pour la protéine MutS et à une affinité de la protéine en présence de ce nucléotide plus grande pour l'ADN contenant un composé de lésion du cisplatine que pour l'ADN mésapparié. La structure de l'ADN platiné mésapparié est vraisemblablement à l'origine de ces différences, suggérant que l'ADN joue un rôle de cofacteur dans les propriétés biochimiques de MutS en présence des nucléotides.

II Résultats

1- Modulation de l'affinité relative de MutS par un composé de lésion du cisplatine en présence d'adénine nucléotides

La fixation de nucléotides (ADP ou ATP) et d'un analogue non hydrolysable de l'ATP (AMPPNP) module la conformation de la protéine et son affinité pour l'ADN contenant un mésappariement. L'addition d'ADP à la protéine complexée à l'ADN mésapparié peut stimuler sa fixation (Blackwell et coll., 2001), alors que l'ATP et l'AMPPNP entraînent une baisse d'affinité importante. Pour étudier les effets des nucléotides sur l'interaction de MutS avec un composé de lésion du cisplatine, l'ADP, l'ATP ou l'AMPPNP a été ajouté après la

formation du complexe entre la protéine et le duplexe G*G*/CT. Cette étude est réalisée en comparaison avec l'hétéroduplexe non platiné GG/CT.

La figure 28 montre l'interaction de la protéine MutS à une concentration fixe avec les duplexes GG/CT ou G*G*/CT en présence des nucléotides ADP, ATP ou AMPPNP.

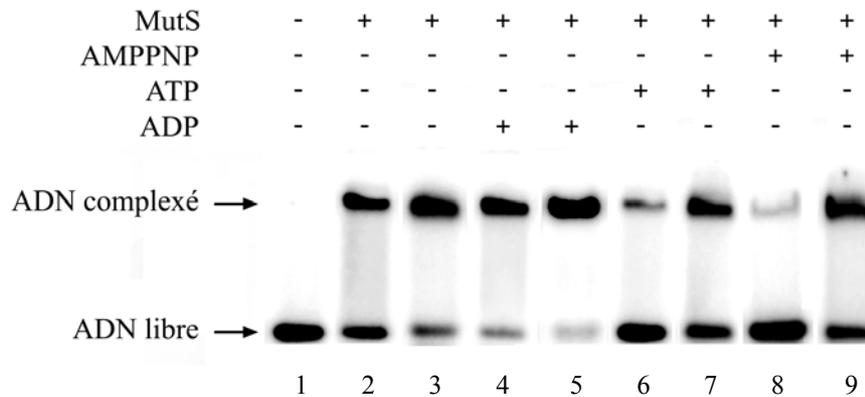


Fig. 28 : Effet de l'ADP, ATP et AMPPNP sur l'affinité de la protéine MutS pour les duplexes GG/CT et G*G*/CT. Les complexes MutS/GG/CT (pistes 2, 4, 6 et 8) et MutS/G*G*/CT (pistes 3, 5, 7 et 9) sont formés à 4°C en incubant pendant 15 minutes MutS (30 nM) avec la sonde radiomarquée indiquée (2 nM) en présence de 100 nM de compétiteur non spécifique (homoduplexe GG/CC 24-mer). 2 mM ADP, ATP ou AMPPNP sont ajoutés 10 minutes avant le dépôt des échantillons sur le gel de polyacrylamide. La piste 1 correspond à la sonde radiomarquée GG/CT non complexée.

Comme attendu, en absence de nucléotide, MutS forme un complexe spécifique avec le duplexe GG/CT et la présence de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) stimule la fixation (pistes 2 et 3). En présence d'ADP, la protéine reconnaît plus efficacement les deux duplexes (pistes 4 et 5) tandis qu'en présence d'ATP ou d'AMPPNP, la reconnaissance du duplexe GG/CT est complètement abolie (pistes 6 et 8) alors qu'une fixation spécifique significative subsiste avec le duplexe G*G*/CT (pistes 7 et 9).

Des expériences de titrations (non montrées) ont été réalisées dans chaque condition expérimentale (en absence ou en présence de nucléotide) en faisant varier la concentration de protéine MutS (entre 0 et 460 nM pour la sonde GG/CT et 0 et 200 nM pour G*G*/CT). Ces expériences permettent de tracer les courbes représentant la fraction d'ADN complexé en fonction de la concentration en protéine. Les courbes de titration obtenues avec la sonde GG/CT (A) et la sonde G*G*/CT (B) en présence ou en absence des différents nucléotides sont présentées figure 29.

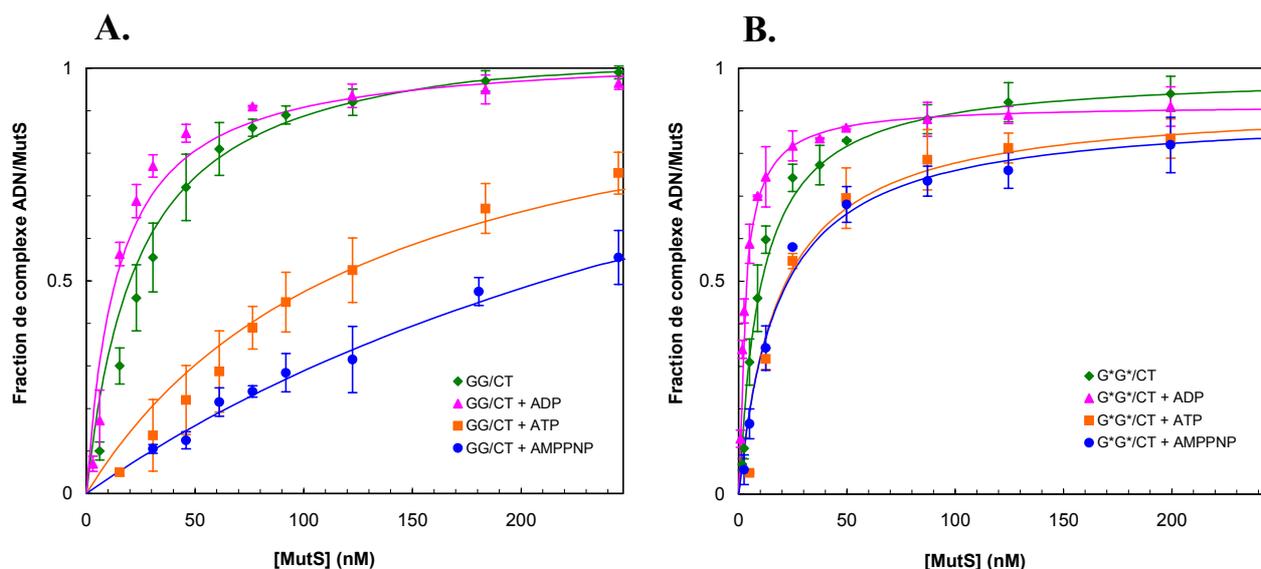


Fig. 29 : Estimation des K_d relatifs de la protéine MutS pour les duplexes GG/CT (A) et G*G*/CT (B) en absence de nucléotide (◆), ou en présence d'ADP (▲), d'ATP (■) ou d'AMPPNP (●). La moyenne et les écart-types sont déterminés à partir de trois expériences. Les courbes sont obtenues par régression d'après l'équation $y = (P_1 \cdot x) / (P_2 + x)$ où P_1 est la valeur du plateau de saturation et P_2 est la valeur du K_d relatif de la protéine pour le duplexe.

Les valeurs des constantes de dissociation déterminées à partir de ces courbes (voir matériel et méthodes) sont résumées dans la table III.

Table III : Affinité relative (en nM) de la protéine MutS pour les hétéroduplexes GG/CT et G*G*/CT en absence ou en présence de 2 mM ADP, ATP et AMPPNP.

	sans nucléotide	+ ADP	+ ATP	+ AMPPNP
GG/CT	24,1 ± 4,7	14,5 ± 2,2	132 ± 18,5	241,3 ± 16,1
G*G*/CT	10,5 ± 2,2	3 ± 0,3	18,7 ± 4,1	18,3 ± 3,4

La présence de 100 nM de compétiteur froid non spécifique (24-mer GG/CC) déplace légèrement l'affinité de la protéine MutS pour les duplexes GG/CT et G*G*/CT, ce qui confirme la forte spécificité de MutS dans nos conditions expérimentales. Dans ces conditions (5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 100 nM compétiteur non spécifique GG/CC, 2 mM nucléotide), MutS a une affinité 2,3 fois plus faible pour le duplexe GG/CT que pour le duplexe G*G*/CT, ce qui est en accord avec nos résultats précédents (Fourrier et coll., 2003).

Pour étudier l'effet des nucléotides sur l'interaction de MutS avec les deux sondes, les nucléotides sont ajoutés après la formation des complexes protéine/ADN. L'ajout d'ADP

provoque une augmentation de l'affinité de MutS pour le duplexe GG/CT d'un facteur 1,6, ce qui est en accord avec les résultats de la littérature (Blackwell et coll., 2001). Dans le cas du duplexe G*G*/CT, la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) semble potentialiser l'effet de l'ADP car l'affinité de la protéine pour ce duplexe est 3,5 fois plus importante.

La présence d'ATP dans le milieu réactionnel provoque une diminution de la quantité de complexe MutS/GG/CT d'un facteur 5,5, lui aussi en accord avec la littérature (Worth et coll., 1998 ; Blackwell et coll., 2001 ; Joshi et Rao, 2002). Ce facteur est presque deux fois plus important lorsqu'on rajoute l'AMPPNP, l'analogue non hydrolysable de l'ATP. Ces résultats suggèrent que la fixation de l'adénosine triphosphate est suffisante pour induire la réduction de l'affinité de MutS pour l'oligonucléotide hétéroduplexe et que l'activité ATPasique n'est pas nécessaire pour induire une diminution de l'affinité de la protéine MutS pour le mésappariement.

Un résultat inattendu est observé lorsque MutS interagit avec le duplexe G*G*/CT en présence d'ATP ou d'AMPPNP. En effet, l'ajout de ces deux nucléotides fait chuter l'affinité de la protéine seulement d'un facteur 1,8 (fig. 30). La protéine a alors une affinité plus grande pour le duplexe G*G*/CT en présence de l'adénosine triphosphate que pour le duplexe GG/CT sans nucléotide.

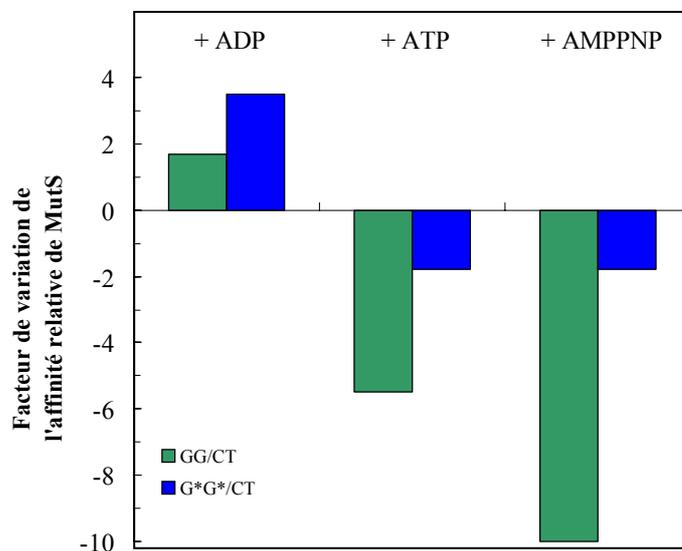


Fig. 30 : Variation de l'affinité relative de la protéine MutS pour les duplexes GG/CT (en vert) et G*G*/CT (en bleu) en fonction des nucléotides ADP, ATP et AMPPNP. Pour chaque duplexe, l'augmentation ou la diminution d'affinité est déterminée par rapport à une valeur arbitraire de 1 attribuée à l'affinité de MutS pour chaque duplexe en absence de nucléotide. La valeur positive du facteur traduit une augmentation de l'affinité relative de MutS pour le duplexe, tandis qu'une valeur négative traduit une diminution de cette affinité.

Dans nos conditions expérimentales, l'affinité de MutS en présence d'ATP et d'AMPPNP est respectivement 7 fois et 13,2 fois plus importante pour le duplexe G*G*/CT que pour le duplexe GG/CT tandis qu'en présence d'ADP, la différence d'affinité de MutS est d'un facteur 4,8 en faveur du duplexe G*G*/CT. La présence du cisplatine semble donc inhiber l'effet de l'ATP et de l'AMPPNP sur l'affinité de la protéine pour un duplexe contenant un mésappariement G/T. A notre connaissance, c'est la première fois que cet effet est montré.

2- Effet de l'AMPPNP sur l'affinité de la protéine MutS pour les hétéroduplexes GG/CT et G*G*/CT de 46 paires de bases

Dans les modèles de translocation et de switch moléculaire proposés respectivement par Modrich et Fishel (Allen et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1997, 1999), la fixation de l'ATP sur MutS provoque le départ de la protéine du mésappariement dans un mouvement le long de la double hélice. Du fait que l'empreinte de MutS sur l'ADN couvre environ 20 paires de bases (Su et Modrich, 1986 ; Joshi et Rao, 2002), le processus de translocation ne peut pas avoir lieu avec des duplexes de 24 paires de bases alors qu'elle semble avoir lieu avec des oligonucléotides de 41 paires de bases (Blackwell et coll., 2001). Nous avons étudié l'influence de la présence d'AMPPNP sur l'affinité de MutS pour des duplexes de 46 paires de bases contenant un mésappariement G/T (GG/CT_{46m}) ou un composé de lésion de l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine (duplexe G*G*/CT_{46m} contenant une thymine en face de la guanine platinée en 3' de l'adduit) (fig. 31).

Hétéroduplexe GG/CT_{46m}

CCATGTGGACTCGTACCTCTCT**GG**CTCTTACCTCTGTGAATCTGCT
GGTACACCTAGGCATGAGAGAGCTAGAGATGAGGACACTTAAGCAG

Hétéroduplexe G*G*/CT_{46m}

CCATGTGGACTCGTACCTCTCT^{* *}**GG**CTCTTACCTCTGTGAATCTGCT
GGTACACCTAGGCATGAGAGAGCTAGAGATGAGGACACTTAAGCAG

Fig. 31 : Séquences des hétéroduplexes de 46 paires de bases contenant un site unique et central de platination GG (en gras) et un mésappariement G/T (en gras). Les astérisques indiquent la chélation des guanines par un résidu du platine pour former l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine.

Les fractions de complexes MutS/GG/CT_{46m} et MutS/G*G*/CT_{46m} obtenues en absence ou en présence d'AMPPNP pour des concentrations en protéine comprises respectivement entre 25 et 100 nM et 25 et 50 nM sont représentées figure 32.

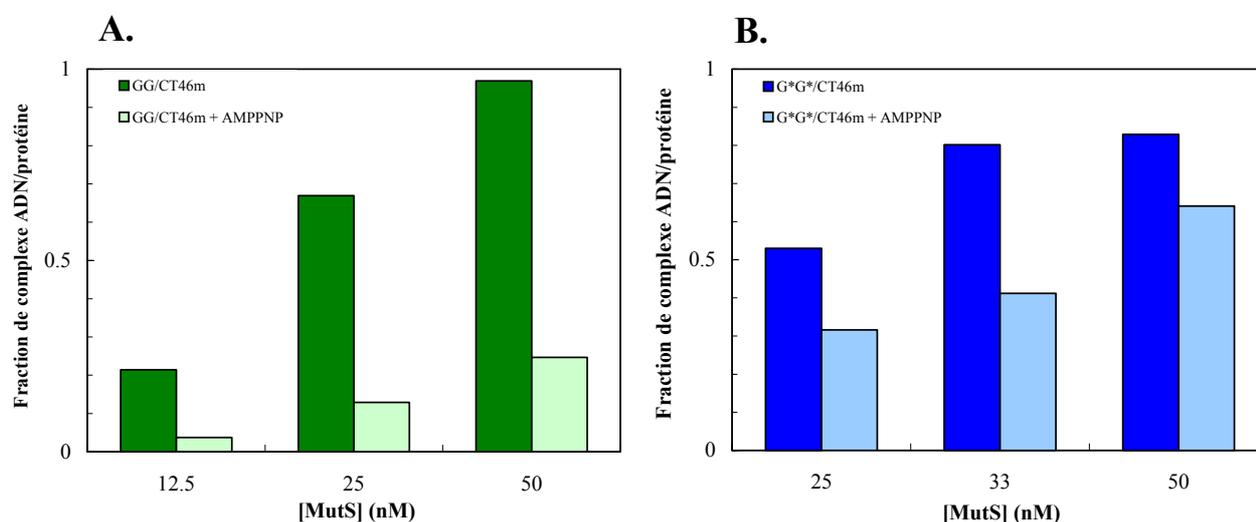


Fig. 32 : Effet de l'AMPPNP sur la fraction de complexes MutS/GG/CT_{46m} (A) et MutS/G*G*/CT_{46m} (B). Les complexes MutS/GG/CT_{46m} et MutS/G*G*/CT_{46m} sont formés en incubant pendant 15 minutes à 4°C des quantités croissantes de protéine (entre 25 et 100 nM (A) et 25 et 50 nM (B)) avec la sonde radiomarquée indiquée (2 nM). 2 mM AMPPNP sont ajoutés 15 minutes avant le dépôt des échantillons sur le gel de polyacrylamide.

Comme lors de l'étude précédente avec les duplexes de 24 paires de bases, la présence d'AMPPNP provoque une baisse d'affinité de MutS plus importante dans le cas de l'interaction de la protéine avec le duplexe GG/CT_{46m} (A) que dans le cas de l'interaction avec le duplexe G*G*/CT_{46m} (B). Cependant l'AMPPNP provoque une diminution de la quantité de complexe MutS/GG/CT_{46m} d'un facteur 5 en moyenne sur les trois concentrations testées alors que nous trouvons un facteur 10 dans le cadre de l'étude avec le duplexe de 24 paires de bases GG/CT. Pour comprendre l'effet du nucléotide non hydrolysable observé dans cette étude et déterminer l'effet de l'hydrolyse de l'ATP sur le départ de la protéine de l'hétéroduplexe, il faudrait regarder l'effet de l'ATP sur cette interaction dans les mêmes conditions expérimentales (c'est-à-dire en présence de Mg²⁺ pour permettre l'hydrolyse de l'ATP) ainsi que l'effet de l'ATP et l'AMPPNP sur l'interaction de MutS avec des oligonucléotides suffisamment longs pour permettre la translocation de MutS et fermés à leurs extrémités pour retenir la protéine sur le duplexe, cette dernière condition permettant de vérifier que l'adénosine triphosphate n'induit pas un départ direct de la protéine de l'oligonucléotide.

Lorsqu'un adduit du cisplatine est présent sur l'hétéroduplexe, l'AMPPNP n'a quasiment plus d'influence sur l'affinité de MutS pour le duplexe mésapparié. En effet, nous retrouvons un facteur de diminution de l'affinité compris entre 1,3 et 1,9 en fonction de la concentration en protéine.

3- Effet de la concentration en AMPPNP sur les complexes MutS/GG/CT et MutS/G*G*/CT

Quelle est la raison de l'affinité anormalement élevée de MutS pour le duplexe G*G*/CT en présence d'ATP ou d'AMPPNP ? Dans les modèles proposés pour expliquer le rôle de l'ATP dans le processus d'initiation de la réparation des mésappariements (voir chap. I V 2), il est admis que MutS en interaction avec un mésappariement doit fixer l'ATP afin de déclencher, après un changement conformationnel, la translocation de la protéine (Allen et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1999 ; Schofield et coll., 2001^b). Pour étudier seulement la fixation de l'adénosine triphosphate par MutS en présence d'ADN, sans hydrolyse, nous avons utilisé l'AMPPNP.

Nous avons étudié l'affinité de MutS pour l'AMPPNP en présence du duplexe GG/CT de 24 paires de bases, et comparé cette affinité avec celle déterminée en présence du duplexe G*G*/CT, afin de voir l'influence de la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine sur la fixation de l'AMPPNP. Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude précédente, c'est-à-dire en présence de 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl et 100 nM ADN compétiteur froid non spécifique. Nous avons déterminé par gel de retardement électrophorétique la fraction de complexes MutS/G*G*/CT et MutS/GG/CT à l'équilibre en fonction de la concentration en AMPPNP (fig. 33). La bande retardée correspond aux complexes MutS/GG/CT (fig. 33A) et MutS/ G*G*/CT (fig. 33B).

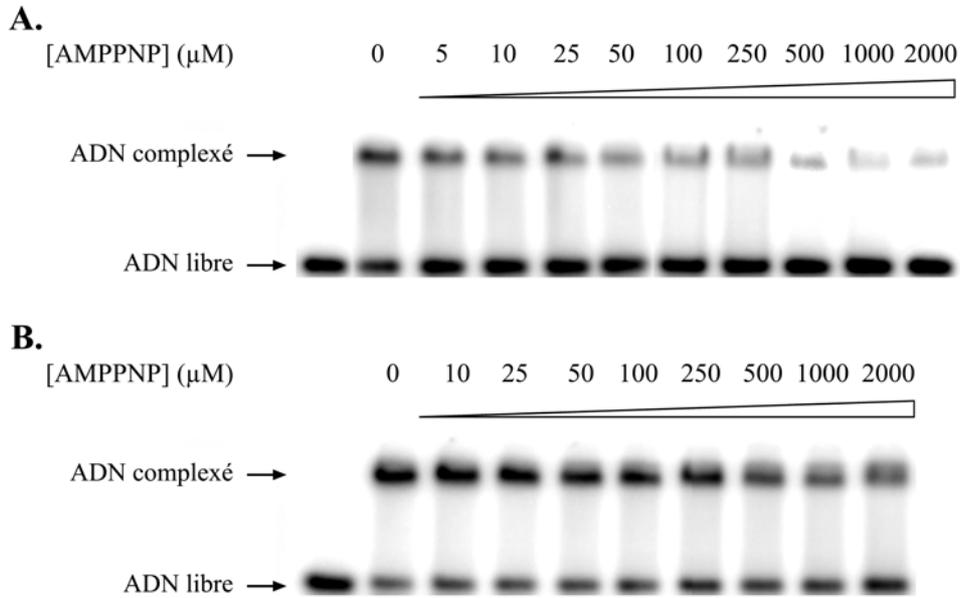


Fig. 33 : Effet de l'augmentation de la concentration en AMPPNP sur la fraction de complexes MutS/GG/CT (A) et MutS/G*G*/CT (B). Le duplexe radiomarqué GG/CT ou G*G*/CT (2 nM) est incubé 15 minutes à 4°C dans le tampon de complexation (voir matériel et méthodes) en présence de 30 nM de protéine MutS et de 100 nM de compétiteur froid non spécifique GG/CC. Après ajout de quantités croissantes d'AMPPNP (entre 5 et 2000 μM (A) et 10 et 2000 μM (B)) et 10 min d'incubation à 4°C, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide.

Dans chaque cas, la fraction de complexe à l'équilibre pour une concentration en protéine de 30 nM obtenue en absence du nucléotide a été normalisée à 100%. Les fractions de complexes MutS/GG/CT et MutS/G*G*/CT sont reportées en fonction de la concentration en AMPPNP (fig. 34).

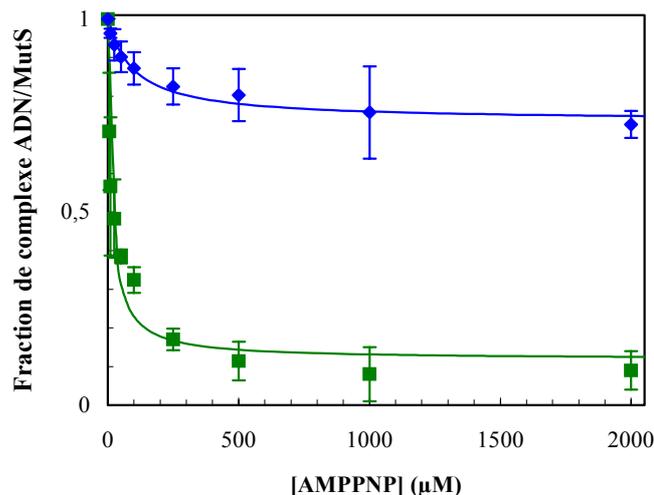


Fig. 34 : Effet de la concentration de l'AMPPNP sur les complexes MutS/GG/CT (■) et MutS/G*G*/CT(◆). La fraction de complexes MutS/GG/CT et MutS/G*G*/CT déterminée par gel de retardement électrophorétique est reportée en fonction de la concentration en AMPPNP. La moyenne et les écart-types sont déterminés à partir de deux expériences. Les courbes sont obtenues par régression d'après l'équation $y = 1 - \frac{(P_1 \cdot x)}{(P_2 + x)}$ où P_1 est la valeur du plateau de saturation et P_2 est la valeur du K_d relatif de la protéine pour l'AMPPNP.

Nous remarquons que la diminution de la fraction de complexes MutS/GG/CT et MutS/G*G*/CT en fonction de l'augmentation de la concentration en AMPPNP est saturable et hyperbolique. Les K_d sont obtenus en déterminant la concentration en nucléotide nécessaire pour dissocier 50% des complexes MutS/ADN. Les valeurs de ces constantes de dissociation (en μM) sont résumées dans la table IV.

Table IV : Affinité relative (en μM) de la protéine MutS pour l'AMPPNP. Ces valeurs sont déterminées à partir des courbes théoriques suivant l'équation hyperbolique $y = 1 - (P_1 \cdot x) / (P_2 + x)$.

	GG/CT	G*G*/CT
K_d (μM)	$14,45 \pm 3,4$	$100,2 \pm 18,6$

Dans nos conditions expérimentales, les concentrations croissantes en AMPPNP provoquent une forte diminution de la fraction du complexe MutS/GG/CT. L'affinité relative de la protéine pour le nucléotide est de $14,4 \mu\text{M}$.

La présence de l'adduit 1,2-d(GpG) réduit la fixation du nucléotide d'un facteur 7. Le K_d relatif de MutS pour l'AMPPNP est de $100,2 \mu\text{M}$. Ce résultat suggère que l'affinité forte de MutS pour l'ADN contenant un composé de lésion de l'adduit intrabrin majoritaire en présence d'AMPPNP est due en partie à une diminution de l'affinité de la protéine pour le nucléotide. Cependant, les résultats de la figure 34 indiquent que lorsque l'effet de l'AMPPNP arrive à saturation, la fraction de complexe fixé est plus grande dans la cas de hétéroduplexe platiné G*G*/CT. Cette saturation est obtenue pour une concentration en AMPPNP d'environ $500 \mu\text{M}$ dans les deux cas. Donc dans les expériences d'interaction réalisées avec une concentration en AMPPNP de 2 mM , l'affinité marquée de MutS pour le duplexe G*G*/CT ne semble pas être liée à une différence d'affinité de la protéine pour le nucléotide. Cela suggère que lorsque la protéine a fixé l'AMPPNP, son affinité pour l'ADN n'est sensiblement pas modifiée. Deux raisons peuvent être à l'origine de cet effet. Soit la fixation de l'AMPPNP n'entraîne plus le changement de conformation de la protéine induisant une baisse d'affinité pour le duplexe G*G*/CT, soit ce changement conformationnel a lieu mais l'interaction de MutS avec l'ADN subsiste du fait des déformations engendrées par le cisplatine sur l'ADN mésapparié.

4- Effet de la mutation de la phénylalanine 36 en alanine sur l'affinité de la protéine MutS avec les duplexes de 24 paires de bases GG/CT et G*G*/CT

L'obtention de la structure cristalline de MutS d'*E. coli* complexée à un duplexe contenant un mésappariement G/T a permis de confirmer le rôle primordial de la phénylalanine 36 (Phe 36), présente dans le domaine de reconnaissance du mésappariement (I) (voir chap. I III 1), dans l'interaction spécifique de la protéine avec un hétéroduplexe (Lamers et coll., 2000). En effet, la substitution Phe→Ala (F36A) abolit la reconnaissance spécifique d'un mésappariement par la protéine (Yamamoto et coll., 2000).

Les résultats de notre étude suggèrent que la protéine MutS interagit différemment avec un composé de lésion du cisplatine qu'avec un mésappariement. Nous avons voulu savoir si le mécanisme de reconnaissance spécifique est le même lorsque MutS interagit avec un composé de lésion que celui intervenant dans l'interaction spécifique de la protéine avec un mésappariement. Sachant que cette interaction spécifique nécessite la Phe 36, nous avons utilisé la protéine mutée F36A. Nous avons comparé par gel de retardement électrophorétique l'interaction de la protéine MutS mutée F36A avec les duplexes de 24 paires de bases GG/CT et G*G*/CT (fig. 35).

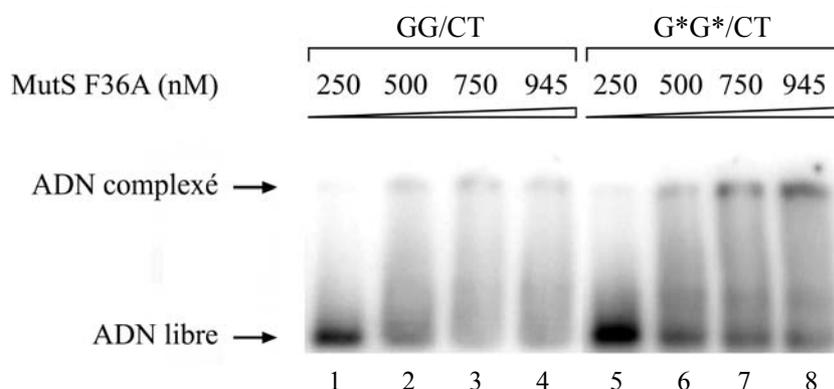


Fig. 35 : Interaction entre la protéine MutS mutée au niveau du résidu acide aminé phénylalanine 36 (protéine F36A) et les duplexes de 24 paires de bases GG/CT et G*G*/CT. Les duplexes radiomarqués GG/CT (pistes 1 à 4) et G*G*/CT (pistes 5 à 8) (2 nM) sont incubés 15 minutes à 4°C dans le tampon de complexation (voir matériel et méthodes) en présence de concentrations croissantes en protéine MutS F36A avant le dépôt des échantillons sur gel de polyacrylamide.

En accord avec la littérature, la mutation du résidu phénylalanine par une alanine conduit à une perte de reconnaissance spécifique de l'ADN contenant un mésappariement

(pistes 1 à 4) puisque nous n'observons plus la bande retardée caractéristique du complexe spécifique obtenu avec la protéine MutS sauvage.

La présence de l'adduit 1,2-d(GpG) permet la stabilisation d'un complexe ADN/protéine mais l'affinité de MutS F36A pour le duplexe G*G*/CT a fortement chuté (pistes 5 à 8), puisque si on ne tient pas compte de la dissociation des complexes dans le gel, le K_d est d'environ 1000 nM. Ce résultat montre que l'affinité de MutS pour le composé de lésion dépend en grande partie de la phénylalanine 36 de la protéine et suggère que l'intercalation du noyau aromatique de ce résidu a lieu malgré la présence de l'adduit 1,2-d(GpG). Il est intéressant de noter que l'interaction de la protéine mutante est plus forte avec l'ADN contenant un composé de lésion du cisplatine qu'avec le duplexe mésapparié non platiné. Ce résultat suggère que les déformations de l'ADN mésapparié platiné sont impliquées dans un/des mécanisme(s) de reconnaissance indépendant(s) de celui de l'acide aminé Phe 36.

Ce résultat pourrait aussi expliquer l'augmentation d'affinité de la protéine pour le duplexe platiné contenant une thymine non complémentaire en face de la guanine en 3' de l'adduit 1,2-d(GpG).

III Discussion

D'après notre étude physico-chimique sur l'interaction entre la protéine MutS et des duplexes contenant les différents adduits du cisplatine, nous pensons que les composés de lésions des adduits intrabrinés majoritaires 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) du cisplatine (contenant l'adduit du cisplatine et une base mésappariée en face de l'une des deux purines platinées) sont potentiellement des lésions à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR.

La reconnaissance d'un mésappariement par MutS et le rôle de la protéine dans le déclenchement de la réparation semblent contrôlés par un cycle de fixation des nucléotides ADP et ATP et d'hydrolyse de l'ATP. En présence de ces nucléotides, des changements des propriétés biochimiques de MutS induits par la présence d'un adduit du cisplatine surimposé au mésappariement pourraient être à l'origine d'un signal pouvant expliquer la cytotoxicité du cisplatine médiée par le système MMR. Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre

les distinctions biochimiques caractérisant l'interaction de la protéine MutS avec les composés de lésions du cisplatine par comparaison avec l'interaction entre MutS et le mésappariement seul. Pour cela, nous avons commencé par étudier l'effet des nucléotides sur l'affinité de la protéine MutS pour le duplexe G*G*/CT contenant un composé de lésion du cisplatine et pour l'hétéroduplexe correspondant non platiné GG/CT.

La présence d'ADP dans le milieu réactionnel provoque une légère augmentation de l'affinité de MutS pour GG/CT, à l'opposé des nucléotides triphosphates ATP et AMPPNP qui induisent une forte diminution de cette affinité (respectivement d'un facteur 5,5 et 10). Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature (Worth et coll., 1998 ; Blackwell et coll., 2001 ; Joshi et Rao, 2002).

Les résultats sur l'affinité de MutS pour le duplexe G*G*/CT en présence d'ADP, d'ATP ou d'AMPPNP sont surprenants. En effet, nous montrons que l'ADP provoque une augmentation de l'affinité de MutS d'un facteur 3,5 et que la protéine interagit spécifiquement avec l'ADN mésapparié platiné malgré la présence des adénosines triphosphate ATP et AMPPNP. L'effet négatif de ces deux nucléotides sur l'interaction de MutS avec un hétéroduplexe est donc inhibé par la présence de l'adduit intrabrin majoritaire du cisplatine. De plus, l'inhibition de l'effet de la présence de l'AMPPNP sur la fraction de complexe MutS/ADN ne semble pas dépendre de la longueur du duplexe puisque nous retrouvons ce résultat avec l'oligonucléotide de 46 paires de bases contenant le même composé de lésion du cisplatine que l'oligonucléotide de 24 paires de bases.

Ces résultats nous semblent importants car ils révèlent pour la première fois que l'adduit 1,2-d(GpG) peut modifier une étape précoce des mécanismes moléculaires intervenant dans le déclenchement de la réparation par le système MMR.

D'après la structure cristalline du complexe MutS/ADN contenant un mésappariement G/T, MutS bactérienne interagit spécifiquement avec l'ADN mésapparié en insérant dans le petit sillon de l'ADN le noyau aromatique du résidu phénylalanine 36 (Phe 36), présente dans le domaine I de reconnaissance du mésappariement (voir chap. I III 1), entre la thymine mésappariée et une base adjacente (Lamers et coll., 2000). Nous montrons pour la première fois que l'interaction spécifique de MutS avec un ADN contenant un mésappariement G/T et l'adduit intrabrin majoritaire 1,2-d(GpG) du cisplatine est dépendante de ce résidu Phe 36. De plus, l'interaction entre la protéine mutée et le mésappariement est plus forte en présence de l'adduit du cisplatine, ce qui suggère l'implication d'autres résidus aminés dans cette

interaction. Ces interactions pourraient participer à l'augmentation de l'affinité de MutS pour un composé de lésion du cisplatine.

Selon les deux principaux modèles proposés pour expliquer le processus de réparation des mésappariements par le système MMR, la protéine MutS est essentielle au déclenchement des étapes précoces de réparation par le système MMR.

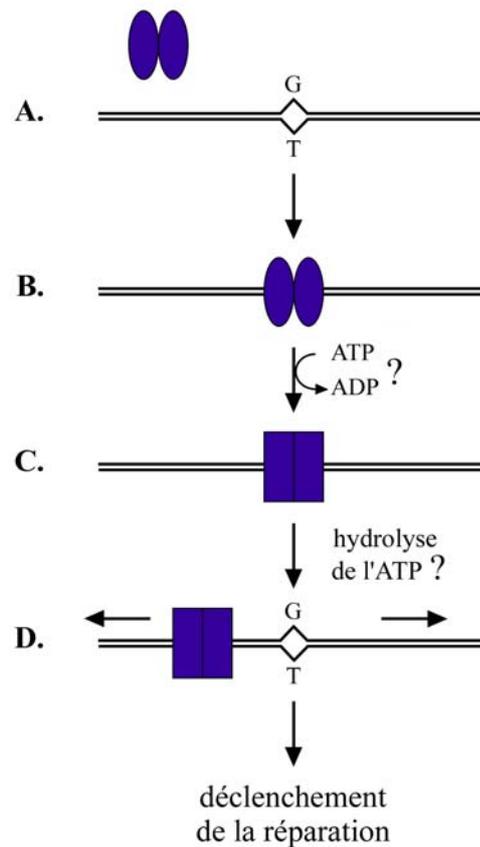


Fig. 36 : Présentation des étapes précoces à l'origine du déclenchement de la réparation des mésappariements par le système MMR. La protéine MutS (en bleu) reconnaît le mésappariement, qu'elle peut quitter dans un mouvement le long de l'ADN après fixation d'ATP induisant un changement de conformation.

MutS détecte (A) et se fixe sur le mésappariement (B), ce qui provoque la fixation d'ATP qui prendrait la place de l'ADP (C) (fig. 36). La fixation d'ATP induirait un changement de conformation de la protéine qui peut alors quitter le mésappariement dans un mouvement le long de l'ADN dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (modèle de Modrich) ou non (modèle du "switch" moléculaire).

Nos résultats suggèrent que :

- la présence de l'adduit ne change sensiblement pas la nature de l'interaction entre MutS et un mésappariement G/T en absence de nucléotide. L'interaction spécifique de la protéine en présence d'ADP est probablement du même type que celle en absence de nucléotide, comme l'indiquent les données structurales obtenues avec un mésappariement G/T (Lamers et coll., 2000). Cependant, le fait que l'ADP ne produise pas le même effet positif sur la reconnaissance d'un mésappariement G/T en absence ou présence de l'adduit suggère que des modifications d'interactions existent. Aucune donnée structurale n'est disponible à l'heure actuelle pour un complexe MutS/ADN contenant un composé de lésion du cisplatine en présence d'ADP.
- la présence de l'adduit du cisplatine empêche ou modifie le changement de conformation de la protéine qui permet normalement la baisse de l'affinité de l'ATP pour l'ADN.
- la présence de l'adduit du cisplatine surimposé au mésappariement diminue l'affinité de l'ATP pour son site de fixation. Dans ce cas là, nous pouvons envisager que le site de fixation de l'ADP, qui doit changer de conformation lors de la fixation de la protéine à l'ADN mésapparié pour permettre l'échange avec l'ATP (modèle de Fishel), reste bloquée dans une conformation peu affine pour l'ATP en présence de l'adduit. Le déclenchement d'un signal pourrait donc avoir pour origine le maintien de la protéine MutS dans une conformation particulière sur le composé de lésion.

Pour expliquer nos résultats en présence d'ATP et d'AMPPNP, nous proposons que la phénylalanine 36 reste intercalée au niveau du mésappariement G/T du fait de la structure de l'ADN platiné alors qu'avec un hétéroduplexe non platiné contenant un mésappariement G/T, le changement de conformation de la protéine pourrait induire le départ du résidu aminé après fixation de l'ATP, entraînant la perte d'affinité de la protéine. La structure cristalline de MutS complexée à un hétéroduplexe contenant un mésappariement G/T montre une courbure de l'ADN de 60° vers le grand sillon au niveau du mésappariement (Lamers et coll., 2000). Or l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) provoque une courbure de l'ADN d'environ 32 à 78° (Bellon et Lippard, 1990 ; Takahara et coll., 1995 ; Yang et coll., 1995 ; Gelasco et Lippard, 1998 ; Elizondo-Riojas et Kozelka, 2001). En présence d'ATP, lorsque MutS perd son affinité pour un mésappariement, l'ADN pourrait reprendre une conformation proche de celle qu'il avait avant la fixation de la protéine. La présence de l'adduit du cisplatine ne permettrait plus ou modifierait ce changement structural de l'ADN. Cela aurait pour conséquence d'empêcher la phénylalanine 36 de quitter le duplexe mésapparié platiné ou de

rester en interaction forte avec l'ADN, bloquant du même coup la protéine dans une conformation affine.

En conclusion, la présence de l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine surimposé à un mésappariement G/T modifie certaines propriétés biochimiques de MutS dès la détection du composé de lésion en présence des nucléotides ADP et ATP. L'adduit du cisplatine potentialise l'effet positif de l'ADP sur l'affinité de la protéine pour le mésappariement G/T, diminue l'affinité de la protéine pour l'AMPPNP et probablement pour l'ATP et pourrait bloquer le changement de conformation nécessaire pour que MutS puisse quitter la lésion.

Ces propriétés particulières pourraient avoir pour conséquence une interaction forte entre la protéine MutS et le composé de lésion du cisplatine en présence d'ATP, ce qui n'est pas en faveur du modèle du cycle futile dans lequel le déclenchement de cycles répétés d'excision/resynthèse est à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine. Il est nécessaire de vérifier cette hypothèse en utilisant un système de réparation *in vitro* avec les protéines MutS, MutL et MutH afin de contrôler que la réparation du mésappariement par le système MMR est bien bloquée par le composé de lésion du cisplatine. Cette étude permettrait aussi de savoir si le complexe ADN/MutS/MutL peut être stabilisé par la présence de l'adduit du cisplatine sur l'ADN mésapparié puisqu'il a été montré qu'en présence d'un mésappariement, ce complexe est dynamique (Galio et coll., 1999) et ne peut pas être détecté par technique de gel de retardement électrophorétique.

Si le système MMR est bloqué dans les premières étapes de son fonctionnement, il est possible qu'un composé de lésion comme celui que nous avons étudié constitue une lésion critique pouvant déclencher un signal direct. Ce signal direct pourrait être induit par le recrutement de protéines impliquées dans la transduction des voies à l'origine de l'activation de l'apoptose.

CHAPITRE III : RECONNAISSANCE D'UN COMPOSE DE LESION CONTENANT L'ADDUIT MAJORITAIRE DU DACH Pt PAR MutS

I Introduction

Les effets secondaires du cisplatine et les problèmes de chimiorésistance rencontrés lors du traitement par le cisplatine sont à l'origine de la recherche de nouvelles molécules dérivées du platine. Les dérivés contenant un composé 1,2-diamminocyclohexane (DACH) ont été sélectionnés d'après leur activité cytotoxique sur les lignées cellulaires issues de leucémie murine résistantes au cisplatine (Burcheval et coll., 1979, 1980). Deux dérivés du DACH sont largement étudiés : le 1,2-diamminocyclohexanedichloroplatine (DACH Pt) et la *trans*-R,R-DACH-oxalatoplatine (oxaliplatine) (fig. 37) qui forment les mêmes adduits sur l'ADN contenant un ligand *trans*-R,R-1,2-diamminocyclohexane. L'oxaliplatine est actuellement utilisé en chimiothérapie anticancéreuse chez l'homme.

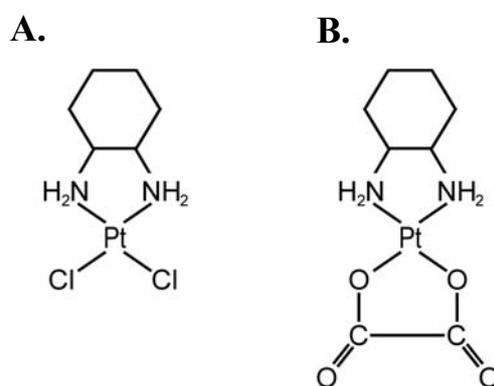


Fig. 37 : Formules du 1,2-diamminocyclohexane dichloroplatinum (II) (DACH Pt) (A) et du *trans*-R,R-1,2-diamminocyclohexaneoxalatoplatinum II (oxaliplatine) (B).

Ces molécules interagissent avec l'ADN et forment les mêmes adduits que le cisplatine (Jennerwein et coll., 1989). Les adduits intrabins 1,2-d(GG) et 1,2-d(AG) sont les adduits majoritaires formés *in vitro* (Saris et coll., 1996) et dans des cellules en culture (Woynarowski et coll., 1998). Cependant, les adduits de l'oxaliplatine se forment moins vite

que les adduits du cisplatine du fait d'une conversion plus lente des adduits monofonctionnels en adduits bifonctionnels (Boudny et coll., 1992). A doses équitoxiques, les dérivés DACH forment moins d'adduits que le cisplatine, ce qui suggère que les lésions provoquées par ces deux dérivés sont plus toxiques que celles du cisplatine (Saris et coll., 1996 ; Woynarowski et coll., 2000).

La modélisation et l'étude de la structure cristalline d'un adduit 1,2-d(GG) de l'oxaliplatine révèlent que cet adduit provoque des déformations de l'ADN similaires à celles engendrées par l'adduit 1,2-d(GG) du cisplatine (Scheeff et coll., 1999 ; Spingler et coll., 2001). Les différences observées proviennent de la protubérance du noyau cyclohexane dans le grand sillon de l'ADN et de la formation d'une liaison hydrogène entre un groupement NH₂ du groupement cyclohexane et l'oxygène 6 de la guanine présente en 3' de l'adduit (Scheeff et coll., 1999 ; Spingler et coll., 2001).

Dans les cellules résistantes au cisplatine, la réplication translésionnelle (ou "bypass") des adduits du cisplatine est plus importante que celle des adduits des dérivés DACH (Gibbons et coll., 1991 ; Mamenta et coll., 1994) et les études *in vivo* montrent que les dérivés DACH sont mutagènes, quoique moins mutagènes que le cisplatine (Léopold et coll., 1981). De plus, une augmentation de la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine a été observée dans les cellules déficientes en système MMR et résistantes au cisplatine alors qu'aucune différence n'est mise en évidence pour les adduits du dérivé DACH (Vaisman et coll., 1998 ; Chaney et Vaisman, 1999). Or *in vitro*, le bypass des adduits intrabris majoritaires 1,2-d(GpG) des dérivés DACH est plus efficace que celui des adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine (Chaney et Vaisman, 1999 ; Vaisman et Chaney, 2000) et mettent en évidence l'incorporation d'une thymine en face de la guanine en 3' de l'adduit (Vaisman et Chaney, 2000).

Bien que les dérivés DACH forment le même type d'adduits que le cisplatine qui induisent des déformations similaires de l'ADN, les cellules déficientes en système MMR résistantes au cisplatine ne sont pas résistantes aux dérivés DACH (Fink et coll., 1996 ; Vaisman et coll., 1998). De plus l'étude physico-chimique des interactions entre la protéine MutS d'*E. coli* et l'ADN modifié globalement par le cisplatine ou le dérivé DACH montre que MutS a une affinité deux fois plus grande pour l'ADN modifié par le cisplatine que pour l'ADN modifié par le DACH Pt (Zdraveski et coll., 2002). La présence d'ADP augmente la fraction de complexe MutS/ADN seulement lorsque l'ADN est modifié par le cisplatine, à l'opposé de l'ATP (en présence de MgCl₂) qui induit une diminution de la fraction de complexe MutS/ADN dans les deux cas étudiés (Zdraveski et coll., 2002). Ces résultats

suggèrent que le système MMR, et en particulier la protéine MutS, distingue les deux types de lésions de l'ADN et que cette détection ne semble pas déclencher les mêmes mécanismes moléculaires à l'origine de la différence de sensibilité des cellules médiée par le système MMR.

Le fait que les dérivés DACH sont mutagènes et que les adduits des dérivés DACH peuvent être répliqués, ce qui entraîne *in vitro* l'incorporation d'une thymine en face de la guanine en 3' de l'adduit, permet de penser que les composés de lésions des dérivés DACH peuvent se former *in vivo*. Nos résultats précédents suggèrent que les composés de lésions du cisplatine sont les lésions critiques à l'origine de la cytotoxicité de la drogue médiée par le système MMR. Nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la protéine MutS et un composé de lésion du DACH Pt. Le but de cette étude est de savoir i) si ce composé de lésion est reconnu par MutS et ii) si les perturbations de la régulation de MutS par les nucléotides ADP et ATP par le composé de lésion du cisplatine mises en évidence dans notre étude précédente sont déclenchées par la présence d'un composé de lésion du DACH Pt.

Comme précédemment, nous avons utilisé un duplexe de 24 paires de bases contenant l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du DACH Pt et une thymine mésappariée à la guanine en 3' de l'adduit (duplexe G*G*/CT DACH Pt). Nous avons déterminé l'affinité de MutS pour ce composé de lésion en absence de nucléotide. Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que l'étude précédente afin de comparer les résultats obtenus avec ceux du duplexe G*G*/CT modifié par le cisplatine. Puis nous avons étudié l'effet de la présence d'ADP, d'ATP et d'AMPPNP sur cette affinité.

Nos résultats montrent que l'adduit intrabrin du DACH Pt est moins bien reconnu que celui du cisplatine lorsqu'il est surimposé à un mésappariement G/T. En présence d'ADP et d'ATP, la reconnaissance du duplexe G*G*/CT DACH Pt reste inférieure à celle du duplexe G*G*/CT. Par contre, la chute d'affinité de MutS pour ces duplexes en présence d'ATP est la même dans les deux cas.

II Résultats

1- Reconnaissance d'un composé de lésion du DACH Pt par MutS

Comme dans l'étude précédente, nous avons déterminé le K_d relatif de la protéine MutS pour le duplexe G*G*/CT DACH Pt par technique de gel de retardement électrophorétique. Les expériences de titration sont d'abord réalisées en absence de nucléotide. Les résultats obtenus pour une concentration de 30 nM de protéine incubée à 4°C en présence des sondes radiomarquées G*G*/CT et G*G*/CT DACH Pt et 100 nM de duplexe froid GG/CC sont représentés figure 38 (pistes 2 et 3).

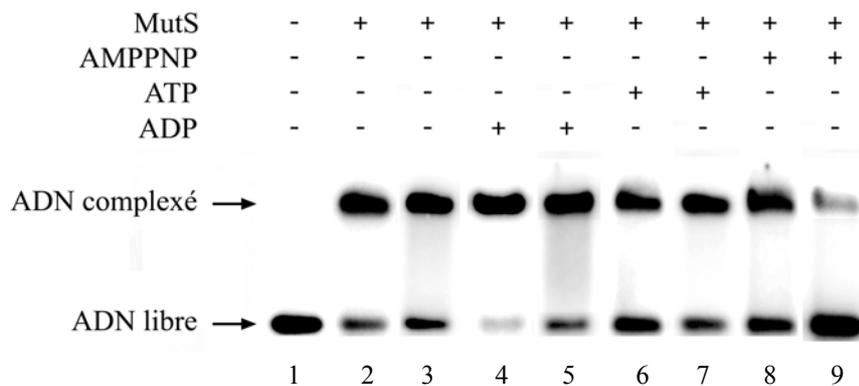


Fig. 38 : Effet de l'ADP, ATP et AMPPNP sur l'affinité de la protéine MutS pour les duplexes G*G*/CT et G*G*/CT DACH Pt. Les complexes MutS/G*G*/CT (pistes 2, 4, 6 et 8) et MutS/G*G*/CT DACH Pt (pistes 3, 5, 7 et 9) sont formés à 4°C en incubant pendant 15 minutes la protéine MutS (30 nM) avec la sonde radiomarquée indiquée (2 nM) en présence de 100 nM de compétiteur non spécifique (homoduplexe GG/CC 24-mer). 2 mM d'ADP, d'ATP ou d'AMPPNP sont ajoutés 10 minutes avant le dépôt des échantillons sur le gel de polyacrylamide.

Des expériences de titrations (non montrées) ont été réalisées en absence de nucléotide en faisant varier la concentration de protéine MutS (entre 0 et 250 nM). Ces expériences permettent de tracer les courbes représentant la fraction d'ADN complexé en fonction de la concentration en protéine. Les courbes de titration obtenues avec la sonde G*G*/CT (A) et la sonde G*G*/CT DACH Pt (B) sont présentées figure 39.

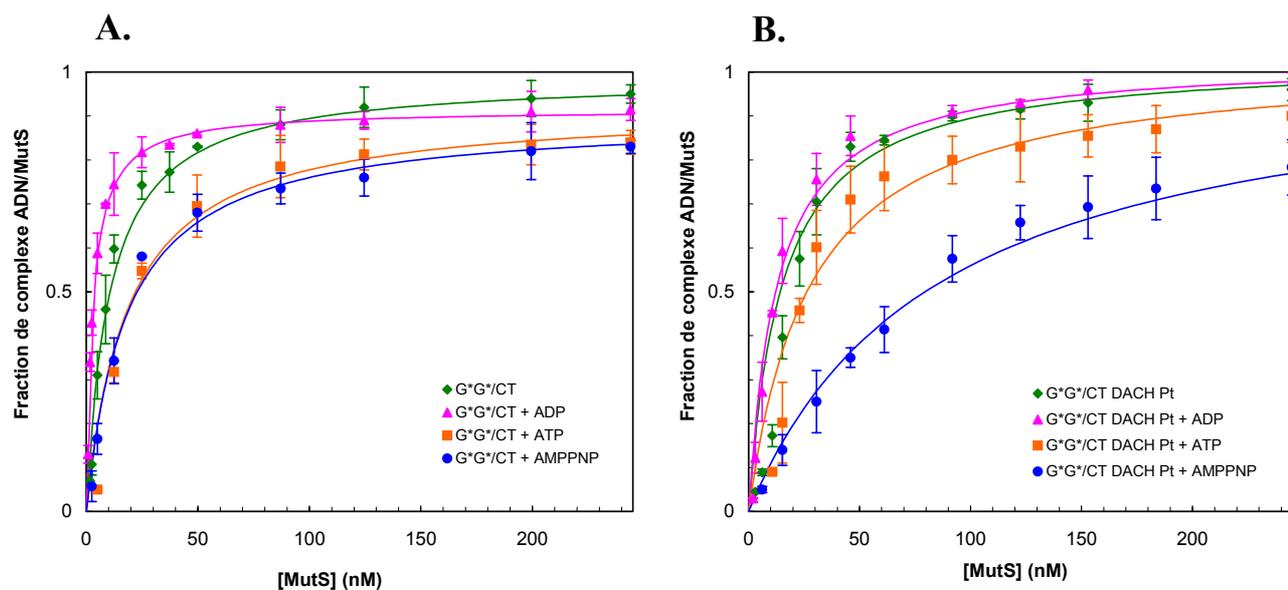


Fig. 39 : Estimation des K_d relatifs de la protéine MutS pour les duplexes G*G*/CT (A) et G*G*/CT DACH Pt (B) en absence de nucléotide (◆), ou en présence d'ADP (▲), d'ATP (■) ou d'AMPPNP (●). La moyenne et les écart-types sont déterminés à partir de trois expériences. Les courbes sont obtenues par régression d'après l'équation $y = (P_1 \cdot x)/(P_2 + x)$ où P_1 est la valeur du plateau de saturation et P_2 est la valeur du K_d relatif de la protéine pour le duplexe.

Les valeurs du K_d relatif de MutS pour les duplexes G*G*/CT et G*G*/CT DACH Pt déterminées à partir de ces courbes sont résumées dans le tableau V.

Tableau V : Affinité relative (en nM) de la protéine MutS pour les duplexes de 24 paires de bases G*G*/CT et G*G*/CT DACH Pt en absence ou en présence de 2 mM d'ADP, d'ATP ou d'AMPPNP.

	sans nucléotide	+ ADP	+ ATP	+ AMPPNP
G*G*/CT	10,5 ± 2,2	3 ± 0,3	18,7 ± 4,1	18,3 ± 3,4
G*G*/CT DACH Pt	17,3 ± 2,8	11,8 ± 1,3	34,3 ± 5,6	85,9 ± 5,3

Nous montrons qu'en absence de nucléotide, la protéine MutS reconnaît avec une affinité forte la lésion composée du DACH Pt, bien que cette affinité relative soit légèrement plus faible que celle pour le duplexe G*G*/CT contenant une lésion composée du cisplatine (facteur 1,6). Ces résultats montrent que l'adduit intrabrin majoritaire du DACH-Pt est moins bien reconnu que celui du cisplatine dans le cas d'un composé de lésion. Marinus et coll. ont montré que l'affinité relative de MutS pour l'ADN modifié par le dérivé DACH est deux fois plus faible que celle pour l'ADN modifié par le cisplatine (Zdraveski et coll., 2002), ce qui

suggère que l'adduit intrabrin majoritaire du cisplatine est aussi mieux reconnu que celui du DACH-Pt dans le contexte d'un homoduplexe.

2- Effet des nucléotides sur la reconnaissance d'un composé de lésion du DACH Pt par MutS

Les titrations sont ensuite réalisées en présence d'ADP, d'ATP ou d'AMPPNP, dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude précédente, c'est-à-dire en présence de 5mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 100 nM de compétiteur froid non spécifique et 2 mM de nucléotide. Les résultats de l'interaction de MutS à une concentration fixe avec les duplexes G*G*/CT et G*G*/CT DACH Pt en présence d'ADP (pistes 4 et 5), d'ATP (pistes 6 et 7) et d'AMPPNP (pistes 8 et 9) sont présentés figure 38.

Les valeurs des K_d déterminés pour chaque condition expérimentale à partir des courbes de titrations (fig. 39) sont résumées dans le tableau V. Les variations de l'affinité relative de MutS pour le duplexe G*G*/CT DACH Pt sont représentées figure 40, celles obtenues dans l'étude précédente pour les duplexes GG/CT et G*G*/CT étant indiquées pour comparaison.

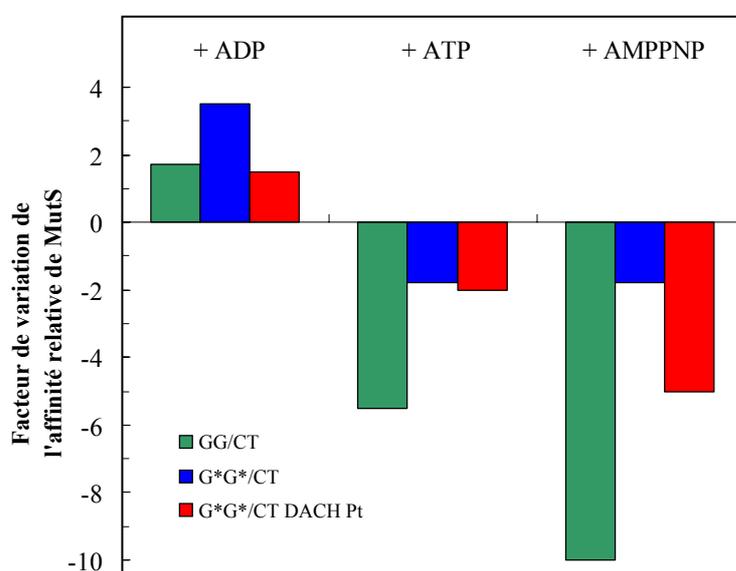


Fig. 40 : Variation de l'affinité relative de la protéine MutS pour les duplexes GG/CT (en vert), G*G*/CT (en bleu) et G*G*/CT DACH Pt (en rouge) en fonction de l'absence ou de la présence des nucléotides ADP, ATP et AMPPNP. Pour chaque duplexe, l'augmentation ou la diminution d'affinité est déterminée par rapport à une valeur arbitraire de 1 attribuée à l'affinité de MutS pour chaque duplexe en absence de nucléotide. La valeur positive du facteur traduit une augmentation de l'affinité relative de MutS pour le duplexe, tandis qu'une valeur négative traduit une diminution de cette affinité.

En présence d'ADP, l'affinité relative de MutS pour le duplexe G*G*/CT DACH Pt augmente d'un facteur 1,5, tandis que l'ATP provoque une diminution d'un facteur 2. Un résultat étonnant est l'effet de l'AMPPNP. Comme dans le cas de la sonde GG/CT contenant un mésappariement G/T, le nucléotide triphosphate non hydrolysable a un effet négatif 2,5 plus important que l'ATP sur l'affinité de MutS pour G*G*/CT DACH Pt.

Il semble donc que dans le cas de l'adduit intrabrin du DACH-Pt, l'effet de l'ADP sur l'affinité de MutS pour la lésion composée est faible. Par contre, nous retrouvons le même résultat avec l'ATP, c'est-à-dire une inhibition de l'effet de l'ATP sur l'affinité de la protéine pour G*G*/CT DACH Pt, similaire à celle observée dans le cas de l'étude avec le duplexe G*G*/CT. Ce résultat suggère que le platine est à l'origine de l'inhibition de cette perturbation. La différence la plus importante que nous mettons en évidence est l'effet de l'AMPPNP. La présence de l'analogue de l'ATP ne déplaçait le K_d de MutS pour G*G*/CT que d'un facteur 1,8 alors que dans le cas de la lésion composée du DACH Pt, nous trouvons une chute de l'affinité de MutS d'un facteur 5. Ce résultat est assez surprenant mais nous ne pouvons pas l'expliquer.

3- Effet de la concentration en AMPPNP sur le complexe MutS/ G*G*/CT DACH Pt

Puisque l'effet négatif de l'AMPPNP sur l'affinité de la protéine MutS pour le mésappariement G/T est partiellement restauré du fait de la présence de la lésion intrabrin 1,2-d(GpG) du DACH Pt, nous avons déterminé l'affinité relative de MutS pour l'adénine triphosphate lorsque la protéine interagit avec le duplexe G*G*/CT DACH Pt. Pour cela, nous avons étudié par gel de retardement électrophorétique la réduction de la fraction de complexe MutS/G*G*/CT DACH Pt formée à l'équilibre en fonction de l'augmentation de la concentration en AMPPNP dans le milieu réactionnel (fig. 41B). Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles utilisées lors de l'étude précédente. Les résultats obtenus avec le duplexe G*G*/CT sont indiqués pour comparaison (fig. 41A).

Dans chaque cas, la fraction de complexe à l'équilibre pour une concentration en protéine de 30 nM obtenue en absence du nucléotide a été normalisée à 100%. Les fractions de complexes MutS/ G*G*/CT et MutS/ G*G*/CT DACH Pt sont reportées en fonction de la concentration en AMPPNP (fig. 42). La courbe obtenue lors de l'étude précédente avec le duplexe GG/CT est indiquée pour mémoire.

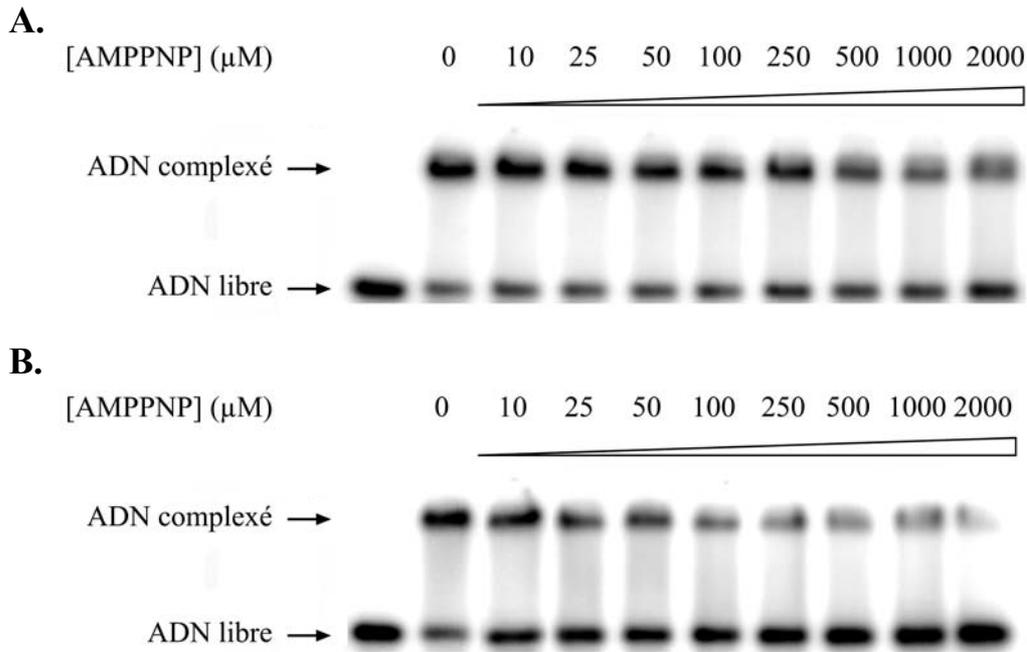


Fig. 41 : Effet de l'augmentation de la concentration en AMPPNP sur la fraction de complexes MutS/G*G*/CT (A) et MutS/G*G*/CT DACH Pt (B). Le duplexe radiomarqué G*G*/CT ou G*G*/CT DACH Pt (2 nM) est incubé 15 minutes à 4°C dans le tampon de complexation (voir matériel et méthodes) en présence de 30 nM de protéine MutS et de 100 nM de compétiteur froid non spécifique GG/CC. Après ajout de quantités croissantes d'AMPPNP (entre 10 et 2000 μM) et 10 min d'incubation à 4°C, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide.

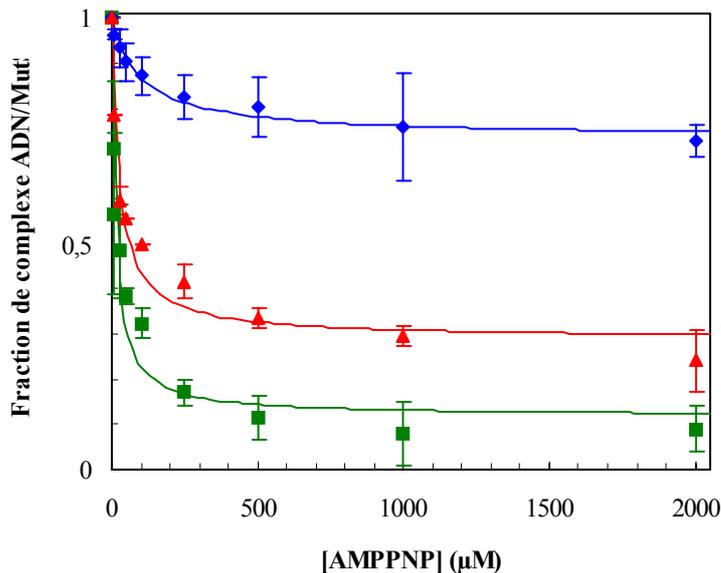


Fig. 42 : Effet de la concentration de l'AMPPNP sur les complexes MutS/GG/CT (■), MutS/G*G*/CT (◆) et MutS/G*G*/CT DACH Pt (▲). La fraction de complexes MutS/GG/CT, MutS/G*G*/CT et MutS/G*G*/CT DACH Pt déterminée par gel de retardement électrophorétique est reportée en fonction de la concentration en AMPPNP. La moyenne et les écart-types sont déterminés à partir de deux expériences. Les courbes sont obtenues par régression d'après l'équation $y = 1 - \frac{(P_1 \cdot x)}{(P_2 + x)}$ où P_1 est la valeur du plateau de saturation et P_2 est la valeur du K_d relatif de la protéine pour le nucléotide triphosphate.

Les valeurs des K_d (en μM) déterminées à partir de ces courbes (voir matériel et méthodes) sont résumées dans le tableau VI.

Tableau VI : Affinité relative (en μM) de la protéine MutS pour l'AMPPNP. Ces valeurs sont déterminées à partir des courbes théoriques suivant l'équation hyperbolique $y = 1 - ((P_1 \cdot x) / (P_2 + x))$.

	GG/CT	G*G*/CT	G*G*/CT DACH Pt
Kd (μM)	14,45 \pm 3,4	100,2 \pm 18,6	26,4 \pm 5,8

Nous avons trouvé précédemment un K_d relatif de la protéine MutS pour l'AMPPNP de 14.4 μM en présence d'un hétéroduplexe contenant un mésappariement G/T, cette affinité chutant d'un facteur 7 lorsque le duplexe contient un composé de lésion du cisplatine. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous trouvons que MutS en présence du duplexe G*G*/CT DACH Pt a une affinité pour l'AMPPNP de 26.4 μM .

La protéine en interaction avec un composé de lésion du DACH Pt possède toujours une forte affinité pour l'AMPPNP et la présence d'AMPPNP dans le milieu réactionnel induit une forte diminution de l'affinité de MutS pour le duplexe G*G*/CT DACH Pt. Ces résultats suggèrent :

- que la présence du DACH Pt surimposé à un mésappariement G/T ne perturbe pas la fixation de l'AMPPNP
- que ce dérivé du cisplatine ne perturbe pas les propriétés biochimiques de MutS de la même façon que le cisplatine.

Pour essayer de relier directement la fixation de l'AMPPNP sur la protéine complexée à un hétéroduplexe modifié ou non à l'effet négatif du nucléotide sur l'affinité de la protéine pour ce duplexe, nous avons reporté la valeur du K_d relatif de MutS pour le duplexe déterminé en présence d'AMPPNP en fonction de la valeur du K_d relatif de MutS pour l'AMPPNP (fig. 43).

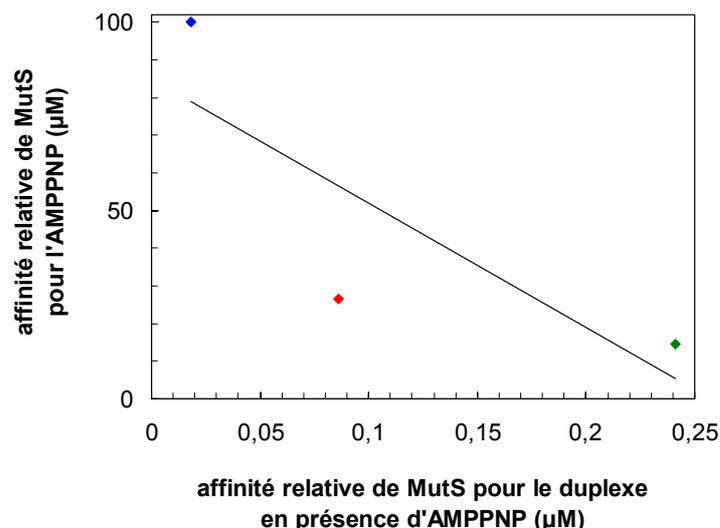


Fig. 43 : Etablissement d'une corrélation entre la fixation de l'AMPPNP sur MutS et l'effet du nucléotide sur l'affinité de MutS. La valeur du K_d relatif de MutS pour les duplexes GG/CT (◆), G*G*/CT (◆) et G*G*/CT DACH Pt (◆) déterminée en présence d'AMPPNP est reportée en fonction de la valeur du K_d relatif de MutS pour l'AMPPNP déterminée précédemment.

La régression linéaire de ces trois points montre que la fixation du triphosphate et son effet sur l'affinité de la protéine ne sont pas reliés directement puisque la droite ne passe pas par les trois points.

III Discussion

D'après nos résultats précédents, nous pensons que la présence d'un composé de lésion du cisplatine perturbe la régulation des propriétés biochimiques de la protéine MutS par les nucléotides ADP et ATP, ce qui pourrait être à l'origine de la cytotoxicité du cisplatine *via* le système MMR. Bien qu'induisant les mêmes types d'adduits (Jennerwein et coll., 1989 ; Saris et coll., 1996 ; Woynarowski et coll., 1998) et les mêmes déformations de l'ADN que le cisplatine (Scheef et coll., 1999 ; Spingler et coll., 2001), les dérivés DACH n'induisent pas la même réponse cellulaire médiée par le système MMR (Fink et coll., 1996). Or il n'est pas exclu que ces molécules forment *in vivo* des composés de lésions susceptibles d'être reconnus par MutS. Nous avons donc étudié l'interaction de MutS avec un composé de lésion du DACH Pt contenant l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) et une thymine non

complémentaire en face de la guanine en 3' de l'adduit. Dans un premier temps, nous avons déterminé l'affinité relative de MutS pour ce composé de lésion, puis nous avons étudié l'effet des nucléotides ADP, ATP et AMPPNP sur cette affinité.

Aucune information n'est disponible actuellement dans la littérature sur l'interaction entre MutS et un composé de lésion du DACH Pt puisque la seule étude disponible s'est penchée sur l'interaction entre MutS et des ADN modifiés globalement par le cisplatine et le DACH Pt (Zdraveski et coll., 2002). Nous montrons que MutS reconnaît spécifiquement un composé de lésion de dérivé DACH, mais avec une affinité 1,6 fois plus faible que celle pour le composé de lésion du cisplatine. Ces résultats sont en accord avec ceux de Zdraveski et coll. (2002). Il semble que, comme dans le cas des adduits intrabrins des dérivés DACH, le noyau cyclohexane diminue l'interaction entre MutS et le composé de lésion d'un dérivé du platine. Une hypothèse proposée est que la protubérance du ligand non polaire dans le grand sillon de l'ADN empêche les interactions électrostatiques entre le domaine IV (ou domaine "clamp") de MutS chargé positivement et l'ADN (Zdraveski et coll., 2002). Cette hypothèse pourrait être valable dans le cas d'un composé de lésion des dérivés DACH.

En présence des nucléotides, l'affinité de MutS pour le composé de lésion du DACH Pt est toujours plus faible que celle pour un composé de lésion du cisplatine. Contrairement à l'étude de Zdraveski et coll. (2002), la présence d'ADP provoque une légère augmentation de l'affinité de MutS pour le composé de lésion des dérivés DACH. La présence d'ATP baisse cette affinité d'un facteur 2. Comme dans le cas du cisplatine, la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) induit une inhibition de l'effet de l'ATP sur l'affinité de MutS pour un mésappariement G/T, ce qui suggère un rôle du platine dans ce phénomène.

Les résultats obtenus avec l'AMPPNP sont surprenants. Bien que MutS en interaction avec un composé de lésion du DACH Pt a une affinité relative pour l'adénine triphosphate proche de celle déterminée lorsque MutS interagit avec un hétéroduplexe, la présence de l'AMPPNP induit une chute d'affinité de MutS pour le composé de lésion du DACH Pt d'un facteur 5. Ces résultats suggèrent que l'activité ATPasique intervient dans l'inhibition de la baisse de l'affinité de MutS pour un composé de lésion du dérivé DACH. Pour vérifier cette hypothèse, les expériences présentées dans cette étude devront être refaites avec l'ATP en conditions de non hydrolyse (sans Mg^{2+}).

Pour l'instant, notre étude comparative entre le cisplatine et le DACH Pt met en évidence deux différences majeures :

- la reconnaissance par MutS du composé de lésion du dérivé DACH est plus faible que celle du composé de lésion du cisplatine en absence et en présence de nucléotides, bien que cette reconnaissance reste spécifique en absence de nucléotide, et en présence d'ADP et d'ATP.
- la protéine MutS interagissant avec un hétéroduplexe a une affinité pour l'AMPPNP malgré la présence de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du DACH Pt, alors que cette affinité chute du fait de la présence de l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine.

En conclusion, cette étude reste à approfondir pour vérifier le rôle de l'activité ATPasique dans l'interaction de MutS avec un composé de lésion de dérivés DACH. De plus, l'utilisation d'un système de réparation *in vitro* en utilisant les protéines MutS, MutL et MutH permettra de déterminer si la présence de ce type de lésion conduit à la perturbation du système MMR telle que la formation du complexe ternaire ADN/MutS/MutL.

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La déficience du système de réparation des mésappariements MMR dans les cellules cancéreuses entraîne une chimiorésistance lors du traitement par le cisplatine, ce qui compromet le succès de la chimiothérapie dans la majorité des cas.

Pour comprendre les mécanismes biochimiques permettant de relier le système MMR à l'effet cytotoxique du cisplatine, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la protéine MutS et les adduits du cisplatine et les composés de lésions du cisplatine, formés lors de l'incorporation d'une base non complémentaire en face de l'une des deux purines pontées par le platine.

Nous montrons que MutS reconnaît faiblement mais spécifiquement l'adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine et reconnaît fortement les composés de lésion de cet adduit ainsi que quatre des composés de lésion de l'adduit intrabrin 1,2-d(ApG). Ces lésions sont susceptibles de se former *in vivo* ainsi que le suggèrent les études de mutagenèse (Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1995) et les études sur la réplication des ADN platinés (Vaisman et Chaney, 2000). Ces composés de lésion pourraient être les lésions critiques à l'origine d'un signal déclenchant la mort des cellules exposées au cisplatine.

Ces composés de lésion du cisplatine potentiellement cytotoxiques perturbent les propriétés biochimiques de MutS régulées par les nucléotides ADP et ATP. En effet, l'effet de l'ADP sur l'affinité de MutS pour un mésappariement G/T est potentialisé par la présence de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) tandis que l'effet négatif de l'ATP et de son analogue non hydrolysable, l'AMPPNP, est inhibé. Nous montrons que l'une des raisons de cette inhibition est la baisse d'affinité de MutS pour l'adénosine triphosphate lorsque la protéine interagit avec le composé de lésion du cisplatine. Même si on ne connaît pas la signification biologique d'un tel effet, cette inhibition pourrait être un signal direct suffisamment fort pour déclencher la mort cellulaire MMR-dépendante.

Ces perturbations existent, quoique plus faibles, lorsque MutS interagit avec un composé de lésion dérivé du platine, le 1,2-diamminecyclohexane platine (DACH Pt). Or la cytotoxicité des cellules exposées aux dérivés 1,2-diamminecyclohexane ne semble pas dépendre du système MMR (Fink et coll., 1996) bien que ces molécules forment majoritairement les mêmes adduits que le cisplatine (Saris et coll., 1996 ; Woynarowski et coll., 1998) et induisent des déformations similaires de l'ADN (Scheeff et coll., 1999 ; Spingler et coll., 2001). Nous montrons qu'un composé de lésion du DACH Pt, contenant un

adduit majoritaire intrabrin 1,2-d(GpG) surimposé à un mésappariement G/T, est moins bien reconnu par MutS que le composé de lésion du cisplatine, MutS ayant cependant une affinité plus forte pour cette lésion que pour un mésappariement G/T seul.

L'obtention d'une structure cristalline de MutS complexée à un hétéroduplexe contenant un composé de lésion du cisplatine pourrait permettre de comprendre les causes de l'augmentation de l'affinité de MutS pour le mésappariement et de la perte de l'affinité de la protéine pour l'adénine triphosphate du fait de la présence de l'adduit du cisplatine.

La caractérisation biochimique de l'activité ATPasique en présence d'un hétéroduplexe contenant un mésappariement G/T et d'un duplexe contenant un composé de lésion du cisplatine permettrait de vérifier si la présence de l'adduit perturbe aussi l'hydrolyse de l'ATP par MutS, autre raison qui pourrait expliquer l'inhibition de l'effet de l'ATP sur l'affinité de MutS. Cette étude est actuellement en cours au laboratoire.

Pour comprendre les implications de la perturbation de MutS par la présence d'un composé de lésion du cisplatine, il serait intéressant d'étudier la formation du complexe ternaire ADN/MutS/MutL, essentiel à la réparation d'un mésappariement par le système MMR, en présence d'un composé de lésion. De même, l'utilisation d'un système de réparation *in vitro* comprenant les protéines impliquées dans le système MMR permettrait de vérifier si la réparation d'une telle lésion est bloquée.

L'étude des interactions de MutS avec l'ADN modifié par le cisplatine pourrait être étendue à d'autres produits de lésion du cisplatine mis en évidence *in vitro*, telles que les délétions d'une base et mutations en 5' de l'adduit 1,2-d(GpG) (Hoffmann et coll., 1996^a) afin de vérifier que d'autres produits de lésions du cisplatine participent à la cytotoxicité du cisplatine.

La modulation par le système MMR de la sensibilité des cellules exposées au cisplatine est cliniquement importante. La compréhension du fonctionnement de ce système permettra d'améliorer l'effet cytotoxique des drogues anticancéreuses et/ou de trouver de nouvelles molécules dont les lésions induites sur l'ADN pourraient être mal réparées et facilement répliquées par les ADN polymérases de façon non fidèle, créant ainsi des composés de lésions perturbant la régulation de la protéine MutS par les nucléotides, principalement en bloquant l'effet de l'ATP.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Abbott, D.W., Thompson, M.E., Robinson-Benion, C., Tomlinson, G., Jensen, R.A. and Holt, J.T. (1999) : BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. **J Biol Chem** 274, 18808-18812.

Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1995) : Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. **Cell** 80, 859-868.

Abraham, R.T. (2001) : Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Gen Dev** 15, 2177-2187.

Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R.D. and Fishel, R. (1996) : hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 13629-13634.

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R.D., Boland R.C., Koi, M., Fishel, R. and Howell, S.B. (1996) : Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. **Cancer Res** 56, 3087-3090.

Alani, E. (1996) : The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. **Mol Cell Biol** 16, 5604-5615.

Alani, E., Reenan, R.A. and Kolodner, R.D. (1994) : Interaction between mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 137, 19-39.

Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J.J. and Lahue, R.S. (1997) : Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p : role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. **Mol Cell Biol** 17, 2436-2447.

Alberts, S.R., Townley, P.M., Goldberg, R.M., Cha, S.S., Sargent, D.J., Moore, D.F., Krook, J.E., Pitot, H.C., Fitch, T.R., Wiesenfeld, M. and Mailliard, J.A. (2003) : Gemcitabine and oxaliplatin for metastatic pancreatic adenocarcinoma : a North Central Cancer Treatment Group phase II study. **Ann Oncol** 14, 580-585.

Ali, J.A. and Lohman, T.M. (1997) : Kinetic measurement of the step size of DNA unwinding by *Escherichia coli* UvrD helicase. **Science** 275, 377-3780.

Allen, D.J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P. and Griffith, J.D. (1997) : MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. **EMBO J** 16, 4467-4476.

Amin, N.S., Nguyen, M.N., Oh, S. and Kolodner, R.D. (2001) : Exo1-dependent mutator mutations : model system for studying functional interactions in mismatch repair. **Mol Cell Biol** 21, 5142-5155.

Andegeko, Y., Moyal, L., Mittelman, L., Tsarfaty, I., Shiloh, Y. and Rotman, G. (2001) : Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. **J Biol Chem** 276, 38224-38230.

Anderson, C.W. (1993) : DNA damage and the DNA-activated protein kinase. **Trends Biochem Sci** 18, 433-437.

Andrews, P.A., Jones, J.A, Varki, N.M. and Howell, S.B. (1990) : Rapid emergence of acquired *cis*-diamminedichloroplatinum (II) resistance in an *in vivo* model of human ovarian carcinoma. **Cancer Commun** 2, 93-100.

Andrews, P.A. and Jones, J.A. (1991) : Characterization of binding proteins from ovarian carcinoma and kidney tubule cells that are specific for cisplatin modified DNA. **Cancer Commun** 3, 93-102.

Anin, M.F. and Leng, M. (1990) : Distortions induced in double-stranded oligonucleotides by the binding of *cis*- or *trans*-diamminedichloroplatinum (II) to the d(GTG) sequence. **Nucleic Acids Res** 18, 4395-4400.

Anthoney, D.A., McIlwrath, A.J., Gallagher, W.M., Edlin, A.R. and Brown, R. (1996) : Microsatellite instability, apoptosis and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. **Cancer Res** 56, 1374-1381.

Aquilina, G., Ceccotti, S., Martinelli, S., Hampson, R. and Bignami, M. (1998) : CCNU-sensitivity in mismatch repair defective human cells. **Cancer Res** 58, 135-141.

Argueso, J.L., Smith, D., Yi, J., Waase, M., Sarin, S. and Alani, E. (2002) : Analysis of conditional mutations in the *Saccharomyces cerevisiae mlh1* gene in mismatch repair and in meiotic crossing over. **Genetics** 160, 909-921.

Au, K.G., Clark, S., Miller, J.H. and Modrich, P. (1989) : *Escherichia coli mutY* gene encodes an adenine glycosylase active on G/A mispairs. **Prog Natl Acad Sci USA** 86, 8877-8881.

Au, K.G., Welsh, K. and Modrich, P. (1992) : Initiation of methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 267, 12142-12148.

Babic, I., Andrew, S.E. and Jirik, FR. (1996) : MutS interaction with mismatch and alkylated base containing DNA molecules detected by optical biosensor. **Mutat Res** 372, 87-96.

Baker, S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., et al. (1995) : Male mice defective in the DNA mismatch repair gene *pms2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. **Cell** 82, 309-319.

Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T. and Liskay, R.M. (1996) : Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. **Nat Genet** 13, 336-342.

Balajee, A.S. and Bohr, V.A. (2000) : Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. **Gene** 250, 15-30.

Ban, C. and Yang, W. (1998)^a : Crystal structure and ATPase activity of MutL : implications for DNA repair and mutagenesis. **Cell** 95, 541-552.

Ban, C. and Yang, W. (1998)^b : Structural basis for MutH activation in *Escherichia coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. **EMBO J** 17, 1526-1534.

Ban, C., Junop, M. and Yang, W. (1999) : Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis : a switch in DNA mismatch repair. **Cell** 97, 85-97.

Bancroft, D.P., Lepre, C.A., and Lippard, S.J. (1990) : Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA. **J Am Chem Soc** 112, 6860-6871.

Bassett, E., Vaisman, A., Tropea, K.A., McCall, C.M., Masutani, C., Hanaoka, F. and Chaney, SG. (2002) : Frameshifts and deletions during *in vitro* translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases β and η . **DNA Repair** 1, 1003-1016.

Becherel, O.J. and Fuchs, R.P. (1999) : SOS mutagenesis results from up-regulation of translesion synthesis. **J Mol Biol** 294, 299-306.

Beck, D.J., Popoff, S., Sancar, A. and Rupp, W.D. (1985) : Reactions of the UvrABC excision nuclease with DNA damaged by diamminedichloroplatinum (II). **Nucleic Acids Res** 13, 7395-7412.

Bell, D.C. and Cupples, C.G. (2001) : Very-short-patch repair in *Escherichia coli* requires the dam adenine methylase. **J Bacteriol** 183, 3631-3635.

Bellacosa, A. (2001)^a : Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. **Cell Death Differ** 8, 1076-92.

Bellacosa, A. (2001)^b : Role of *med1* (*mbd4*) gene in DNA repair and human cancer. **J Cell Physiol** 187, 137-144.

Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M. and Neri, G. (1999) : MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 3969-3974.

Bellon, S.F. and Lippard, S.J. (1990) : Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum (II) and *cis*-[Pt(NH₃)₂(N³-cytosine)Cl]⁺. **Biophys Chem** 35, 179-188.

Bellon, S.F., Coleman, J.H. and Lippard, S.J. (1991) : DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry** 30, 8026-35.

Bende, S.M. and Grafstrom, R.H. (1991) : The DNA binding properties of the MutL protein isolated from *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res** 19, 1549-1555.

Berardini, M., Mazurek, A. and Fishel, R. (2000) : The effect of O⁶-methylguanine DNA adducts on the adenosine nucleotide switch functions of hMSH2/hMSH6 and hMSH2/hMSH3. **J Biol Chem** 275, 27851-2787.

Bergoglio, V., Canitrot, Y., Hogarth, L., Minto, L., Howell, S.B., Cazaux, C. and Hoffmann, J.S. (2001) : Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in human ovarian tumor cells : impact on sensitivity towards antitumor agents. **Oncogene** 20, 6181-6187.

Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M. and Garewal, H. (2002) : DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways : fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutat Res** 511, 145-178.

Bertrand, P., Tishkoff, D.X., Filosi, N., Das Gupta, R. and Kolodner, R.D. (1998) : Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 14278-14283.

Bhagwat, A.S. and Lieb, M. (2002) : Cooperation and competition in mismatch repair : very short-patch repair and methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol** 44, 1421-1428.

Bhattacharya, R. and Beck, D.J. (2002) : Survival and SOS induction in cisplatin-treated *Escherichia coli* deficient in Pol II, RecBCD and RecFOR functions. **DNA Repair** 1, 955-966.

Bhattacharyya, A., Ear, U.S., Koller, B.H., Weichselbaum, R.R. and Bishop, D.K. (2000) : The breast cancer susceptibility gene *brca1* is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. **J Biol Chem** 275, 23899-23903.

Billings, P.C., Davis, R.J., Engelsberg, B.N., Skov, K.A. and Hughes, E.N. (1992) : Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA. **Biochem Biophys Res Commun** 188, 1286-1294.

Bishop, D.K., Williamson, M.S., Fogel, S. and Kolodner, R.D. (1987) : The role of heteroduplex correction in gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature** 328, 362-364.

Biswas, I. and Hsieh, P. (1997) : Interaction of MutS protein with the major and minor grooves of a heteroduplex DNA. **J Biol Chem** 272, 13355-13364.

Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., and Seeberg, E. (1997) : Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. **EMBO J** 16, 6314-6322.

Bjornson, K.P., Allen, D.J. and Modrich, P. (2000) : Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. **Biochemistry** 39, 3176-3183.

Blackwell, L.J., Martik, D., Bjornson, K.P., Bjornson, E.S. and Modrich, P. (1998) : Nucleotide-promoted release of hMutSa from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. **J Biol Chem** 273, 32055-32062.

Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., Allen, D.J. and Modrich, P. (2001) : Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. **J Biol Chem** 276, 34339-34347.

Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W.S., Wang, W., Kashanchi, F. and Shiekhattar, R. (2000) : BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex : linking chromatin remodeling to breast cancer. **Cell** 102, 257-265.

Boehmer, P.E. (1998) : The herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein, ICP8, increases the processivity of the UL9 protein DNA helicase. **J Biol Chem** 273, 2676-83.

Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. and Hanawalt, P.C. (1985) : DNA repair in an active gene : removal of pyrimidine dimers from the *dhfr* gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. **Cell** 40, 359-369.

Boudny, V., Vrana, O., Gaucheron, F., Kleinwatcher, V., Leng, M. and Brabec, V. (1992) : Biophysical analysis of DNA modified by 1,2-diaminocyclohexaneplatinum (II) complexes. **Nucleic Acids Res** 20, 267-272.

Bowers, J., Sokolsky, T., Quach, T. and Alani, E. (1999) : A mutation in Msh6 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* Msh2/Msh6 complex disrupts mismatch recognition. **J Biol Chem** 274, 16115-16125.

Bowers, J., Tran, P.T., Joshi, A., Liskay, R.M. and Alani, E. (2001) : MSH/MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp. **J Mol Biol** 306, 957-968.

Brabec, V., Reedijk, J. and Leng, M. (1992) : Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum (II) binding. **Biochemistry** 31, 12397-12402.

Brabec, V. and Leng, M. (1993) : DNA intrastrand cross-links of *trans*-diamminedichloroplatinum (II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. **Prog Natl Acad Sci USA** 90, 5345-5349.

Brabec, V., Boudny, V. and Balcarova, Z. (1994) : Monofunctional adducts of platinum (II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturation. **Biochemistry** 33, 1316-1322.

Bradley, L.J., Yarema, K.J., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1993) : Mutagenicity and genotoxicity of the major DNA adduct of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry** 32, 982-988.

Bradley, T.S., Grossman, A.D. and Walker, G.C. (2001) : Visualization of mismatch repair in bacterial cells. **Mol Cell** 8, 1197-1206.

Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M. and Karran, P. (1993) : Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. **Nature** 362, 652-654.

Brandsma, J.A., de Ruijter, M., Visse, R., van Meerten, D., van der Kaaden, M., Moggs, J.G. and van de Putte, P. (1996) : The *in vitro* more efficiently repaired cisplatin adduct *cis*-Pt.GG is *in vivo* a more mutagenic lesion than the relative slowly repaired *cis*-Pt d(GCG) adduct. **Mutat Res** 362, 29-40.

Bravo, R. and Macdonald-Bravo, H. (1987) : Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle : association with DNA replication sites. **J Cell Biol** 105, 1549-1554.

Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C. and Warren, S.L. (1996) : UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II : a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. **Prog Natl Acad Sci USA** 93, 11586-11590.

Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., et al. (1994) : Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hmlh1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature** 368, 258-261.

Brouwer, J., van de Putte, P., Fichtinger-Schepman, A.M. and Reedijk, J. (1981) : Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide sequences in *Escherichia coli* K-12 induced by *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Prog Natl Acad Sci USA** 78, 7010-7014.

Brown, T.C. and Jiricny, J. (1988) : Different base/base mispairs are corrected with different efficiencies and specificities in monkey kidney cells. **Cell** 54, 705-711.

Brown, S.J., Kellett, P.J and Lippard, S.J. (1993)^a : Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. **Science** 261, 603-605.

Brown, R., Clugston, C., Burns, P., Edlin, A., Vasey, P., Vojtesek, B. and Kaye, S.B. (1993)^b : Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. **Int J Cancer** 55, 678-684.

Brown, R., Hirst, G.L., Gallagher, W.M., McIlwrath, A.J., Margison, G.P., van der Zee, A.G. and Anthony, D.A. (1997) : hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxicity anticancer agents. **Oncogene** 15, 45-52.

Brown, R. (1999) : Cisplatin resistance in ovarian cancer from **Platinum-based drugs in cancer therapy**, p 115-128. Edited by L. Kelland and N. Farrell. Humana Press, Totowa, NJ.

Brown, J., Brown, T. and Fox, K.R. (2001) : Affinity of mismatch-binding protein MutS for heteroduplexes containing different mismatches. **Biochem J** 354, 627-633.

Bruhn, S.L., Pil, P.M., Essigmann, J.M., Housman, D.E. and Lippard, S.J. (1992) : Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. **Prog Natl Acad Sci USA** 89, 2307-2311.

Bubley, G.J., Ashuner, B.P. and Teicher, B.A. (1991) : Spectrum of *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-induced mutations in a shuttle vector propagated in human cells. **Mol carcinog** 4, 397-406.

Burcheval, J.H., Kalaker, K., Dew, K. and Lokyst, L. (1979) : Rationale for development of platinum analogs. **Cancer Treat Rep** 63, 1493-1499.

Burcheval, J.H., Irani G., Kern, K., Lokyst, L. and Turkevich, J. (1980) : 1,2-diaminocyclohexane platinum derivatives of potential clinical value. **Rec Res Cancer Res** 74, 146-155.

Burnouf, D., Daune, M. and Fuchs, R.P. (1987) : Spectrum of cisplatin-induced mutations in *Escherichia coli*. **Prog Natl Acad Sci USA** 84, 3758-3762.

Burnouf, D., Gauthier, C., Chottard, J.C. and Fuchs, R.P. (1990) : single d(AG)/*cis*-diamminedichloroplatinum (II) adduct-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Prog Natl Acad Sci USA** 87, 6087-6091.

- Caillet-Fauquet, P., Defais, M. and Radman, M. (1977) : Molecular mechanisms of induced mutagenesis. Replication *in vivo* of bacteriophage phiX174 single-stranded, ultraviolet light-irradiation DNA in intact and irradiated host cells. **J Mol Biol** 117, 95-110.
- Calsou, P., Frit, P. and Salles, B. (1992) : Repair synthesis by human cell extracts in cisplatin-damaged DNA is preferentially determined by minor adducts. **Nucleic Acids Res** 20, 6363-6368.
- Campbell, J.L. and Kleckner, N. (1990) : *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. **Cell** 62, 967-979.
- Canitrot, Y., Cazaux, C., Frechet, M., Bouayadi, K., Lesca, C., Salles, B. and Hoffmann, J.S. (1998) : Overexpression of DNA polymerase β in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 12586-12590.
- Canitrot, Y., Frechet, M., Servant, L., Cazaux, C. and Hoffmann, J.S. (1999) : Overexpression of DNA polymerase β : a genomic instability enhancer process. **FASEB J** 13, 1107-1111.
- Cao, P.Q., Pitt, S., Leszyk, J. and Baril, E.F. (1994) : DNA-dependent ATPase from HeLa cells is related to human Ku autoantigen. **Biochemistry** 33, 8548-8557.
- Caradonna, J.P., Lippard, S.J., Gait, M.J. and Singh, M. (1982) : The antitumor drug *cis*-dichlorodiammineplatinum forms an intrastrand d(GpG) crosslink upon reaction with [d(ApGpGpCpCpT)]². **J Am Chem Soc** 104, 5793-5795.
- Carethers, J.M., Hawn, M.T., Chauhan, D.P., Luce, M.C., Marra, G., Koi, M. and Boland, C.R. (1996) : Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **J. Clin. Invest** 98, 199–206.
- Cariello, N.F., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1992) : *In vitro* mutational specificity of cisplatin in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. **Cancer Res** 52, 2866-2873.
- Chambers, S.R., Hunter, N., Louis, E.J. and Borts, R.H. (1996) : The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. **Mol Cell Biol** 16, 6110-6120.

Chaney, S.G. and Vaisman, A.. (1999) : Specificity of platinum-DNA adduct repair. **J Inorg Biochem** 77, 71-81.

Christine, K.S., MacFarlane, A.W. 4th, Yang, K. and Stanley, R.J. (2002) : Cyclobutylpyrimidine dimer base flipping by DNA photolyase. **J Biol Chem** 277, 38339-38344.

Chu, G. and Chang, E. (1990) : Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. **Prog Natl Acad Sci USA** 87, 3324-3328.

Chu, G. (1997) : Double strand break repair. **J Biol Chem** 272, 24097-24100.

Ciccarelli, R.B., Solomon, M.J., Varshavsky, A. and Lippard, S.J. (1985) : *In vivo* effects of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) on SV40 chromosomes : differential repair, DNA-protein cross-linking and inhibition of replication. **Biochemistry** 24, 7533-7540.

Ciotta, C., Ceccotti, S., Aquilina, G., Humbert, O., Palombo, F., Jiricny, J. and Bignami, M. (1998) : Increased somatic recombination in methylation tolerant cells with defective mismatch repair. **J Mol Biol** 276, 705-719.

Cizeau, J., Decoville, M., Leng, M. and Locker, D. (1994) : Deletions induced in the white and vermilion genes of *Drosophila melanogaster* by the antitumor drug *cis*-dichlorodiammineplatinum (II). **Mutat Res** 311, 31-38.

Clark, A.B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R.K. and Kunkel, T.A. (2000) : Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2/MSH6 and MSH2/MSH3 complexes. **J Biol Chem** 275, 36498-36501.

Clugston, C.K., McLaughlin, K., Kenny, M.K. and Brown, R. (1992) : Binding of human single-stranded DNA binding protein to DNA damaged by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res** 52, 6375-6379.

Cohen, S.M. and Lippard, S.J. (2001) : Cisplatin : from DNA damage to cancer chemotherapy. **Progr Nuclear Acid Res Mol Biol** 67, 93-130.

Coin, F., Frit, P., Viollet, B., Salles, B. and Egly, J.M. (1998) : TATA binding protein discriminates between different lesions on DNA, resulting in a transcription decrease. **Mol Cell Biol** 18, 3907-3914.

Comess, K.M., Burstyn, J.N., Essigmann, J.M. and Lippard, S.J. (1992) : Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed *cis*-diamminedichloroplatinum (II) DNA adducts. **Biochemistry** 31, 3975-3990.

Cooper, D.L., Lahue, R.S. and Modrich, P. (1993) : Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. **J Biol Chem** 268, 11823-11829.

Cooper, P.K., Nouspikel, T., Clarkson, S.G. and Leadon, S.A. (1997) : Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in cockayne syndrome patients from XP group G. **Science** 275, 990-993.

Corbett, A.H., Hong, D. and Osheroff, N. (1993) : Exploiting mechanistic differences between drug classes to define functional drug interaction domains on topoisomerase II. Evidence that several diverse DNA cleavage-enhancing agents share a common site of action on the enzyme. **J Biol Chem** 268, 14394-14398.

Corda, Y., Anin, M.F., Leng, M. and Job, D. (1992) : RNA polymerases react differently at d(AG) or a d(GG) adducts in DNA modified by *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry** 31, 1904-1908.

Corda, Y., Job, C., Anin, M.F., Leng, M. and Job, D. (1991) : Transcription by eucaryotic and prokaryotic RNA polymérases of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry** 30, 222-230.

Coste, F., Malinge, J.M., Serre, L., Shepard, W., Roth, M., Leng, M. and Zelwer, C. (1999) : Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution : hydration at the platinated site. **Nucleic Acids Res** 27, 1837-1846.

Dabholar, M., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V.A., Egwuagu, C. and Reed, E. (1992) : ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 84, 1512-1517.

Dabholar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J.J. and Reed, E. (1994) : Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. **J Clin Invest** 94, 703-708.

Dao, V. and Modrich, P. (1998) : Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. **J Biol Chem** 273, 9202-9207.

Das Gupta, R. and Kolodner, R.D. (2000) : Novel mutations in *Saccharomyces cerevisiae* Msh6. **Nat Genet** 24, 53-56.

Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G.F. and Jinks-Robertson, S. (1996) : Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 16, 1085-1093.

Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M. and Jinks-Robertson, S. (1997) : Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. **Prog Natl Acad Sci USA** 94, 9757-9762.

Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R. and West, S.C. (2001) : Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. **Mol Cell** 7, 273-282.

Davis, T.W., Wilson-Van Patten, C., Meyers, M., Kunugi, K.A., Cuthill, S., Reznikoff, C., Garces, C., Boland, C.R., Kinsella, T.J., Fishel, R. and Boothman, D.A. (1998) : Defective expression of the DNA mismatch repair protein MLH1 alters G₂-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. **Cancer Res** 58, 767-778.

de Boer, J.G. and Glyckman, B.W. (1989) : Sequence specificity of mutation induced by the anti-tumor drug cisplatin in the CHO *aprt* gene. **Carcinogenesis** 10, 1363-1367.

de Conti, R.C., Toftness, B.R., Lange, R.C. and Creasey, W.A. (1973) : Clinical and pharmacological studies with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res** 33, 1310-1315.

de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H. (1999) : Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes Dev** 13, 768-785.

de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C. and van der Vliet, P.C. (1989) : HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. **J Mol Biol** 208, 65-78.

de Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D.G., de Boer, P. and Riele, H. (1999) : Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. **Genes Dev** 13, 523-531.

de Weese, T.L., Shipman, J.M., Larrier, N.A., Buckley, N.M., Kidd, L.R., Groopman, J.D., Cutler, R.G., Riele, H. and Nelson, W.G. (1998) : Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective *msh2* alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 11915-11920.

de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M. and Riele, H. (1995) : Inactivation of the mouse *msh2* gene results in postreplicational mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination and predisposition to tumorigenesis. **Cell** 82, 321–330.

Dempke, W.C., Shellard, S.A., Hosking, L.K., Fichtinger-Schepman, A.M. and Hill, B.T. (1992) : Mechanisms associated with the expression of cisplatin resistance in a human ovarian tumor cell line following exposure to fractionated X-irradiation *in vitro*. **Carcinogenesis** 13, 1209-1215.

Dijt, F.J., Fichtinger-Schepman, A.M., Berends, F. and Reedijk, J. (1988) : Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. **Cancer Res** 48, 6058-6062.

Donahue, B.A., Augot, M., Bellon, S.F., Treiber, D.K., Toney, J.H., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1990) : Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d(ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. **Biochemistry** 29, 5872- 5880

Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D., Hanawalt, P.C. (1994) : Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 8502-8506

Downs, A.J., Lowndes, N.F. and Jackson, S.P. (2000) : A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H₂A in DNA repair. **Nature** 408, 1001-1004

Drotschmann, K., Aronshtam, A., Frtiz, H.J. and Marinus, M.G. (1998) : The *Escherichia coli* MutL protein stimulates binding of Vsr and Muts to heteroduplex DNA. **Nucleic Acids Res** 26, 948-953.

Drotshmann, K., Clark, A.B., Tran, H.T., Resnick, M.A., Gorfenin, D.A. and Kuntel, T.A. (1999) : Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the *msh2* gene. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 2970-2975.

Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J. and Modrich, P. (1995) : Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 268, 1909-1912.

Drummond, J.T., Anthony, A., Brown, R. and Modrich, P. (1996) : Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. **J Biol Chem** 271, 19645–19648.

Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I.H., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M. and Modrich, P. (1996) : Human MutS recognizes damaged DNA base pairs containing *O*⁶-methylguanine, *O*⁴-methylthymine or the cisplatin d(GpG) adduct. **Prog Natl Acad Sci USA** 93, 6443–6447.

Duckett, D.R., Bronstein, S.M., Taya, Y. and Modrich, P. (1999) : hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 12384-12388.

Dufner, P., Marra, G., Räschle, M. and Jiricny, J. (2000) : Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS α is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. **J Biol Chem** 275, 36550-36555.

Durant, S.T., Morris, M.M., Iland, M., McKay, H.J., McCormick, C., Hirst, G.L., Borts, R.H. and Brown, R. (1999) : Dependence on Rad52 and Rad1 for anticancer drug resistance mediated by inactivation of mismatch repair genes. **Curr. Biol.** 9, 51–54.

Dynan, W.S. and Yoo, S. (1998) : Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. **Nucleic Acids Res** 26, 1551-1559.

Dzidic, S. and Radman, M. (1989) : Genetic requirements for hyper-recombination by very short patch mismatch repair : involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase I. **Mol Gen Genet** 217 p 254-256.

Eastman, A. (1983): Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and *cis*-dichloro(ethylenediammine)platinum(II). **Biochemistry** 22, 3927-3933.

Eastman, A. (1985): Interstrand cross-links and sequence specificity in the reaction of *cis*-dichloro(ethylenediammine)platinum (II) with DNA. **Biochemistry** 24, 5027-5032.

Eastman, A. (1987) : The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. **Pharmacol Ther** 34, 155-166.

Eastman, A., Jennerwein, M.M. and Nagel, D.L. (1988) : Characterization of bifunctional adducts produced in DNA by *trans*-diamminedichloroplatinum (II). **Chem Biol Interact** 67, 71-80.

Eissenberg, J.C., Ayyagari, R., Gomes, X.V. and Burgers, P.M. (1997) : Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase delta and DNA polymerase epsilon. **Mol Cell Biol** 17, 6367-6378.

Elizondo-Riojas, M.A. and Kozelka, J. (2001) : Unrestrained 5 ns molecular dynamics simulation of a cisplatin-DNA 1,2-GG adduct provides a rationale for the NMR features and reveals increased conformational flexibility at the platinum binding site. **J Mol Biol** 314, 1227-1243.

Evans, E., Moggs J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1997) : Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. **EMBO J** 16, 6559-6573.

Evans, E. and Alani, E. (2000) : Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. **Mol Cell Biol** 20, 7839-7844.

Evans, E., Sugawara, N., Haber, J.E. and Alani, E. (2000) : The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 mismatch repair protein localizes to recombination intermediates *in vivo*. **Mol Cell** 5, 789-799.

Evans, G.L. and Gralla, J.D. (1992) : Differential effects of cisplatin on the expression of chimeric marker genes in CV-1 cells. **Biochem Pharmacol** 44, 107-119.

Fabisiewicz, A. and Worth, L. Jr. (2001) : *Escherichia coli* MutS,L modulate RuvAB-dependent branch migration between diverged DNA. **J Biol Chem** 276, 9413-9420.

Fajac, A., da Silva, J., Ahomadegbe, J.C., Rateau, J.G., Bernaudin, J.F., Riou, G. and Benard, J. (1996) : Cisplatin-induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. **Int J Cancer** 68, 67-74.

Fang, W.H. and Modrich, P. (1993) : Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. **J Biol Chem** 268, 11838-11844.

Fichtinger-Schepman, A.M., van der Veer, J.L., den Hartog, J.H., Lohman, P.H. and Reedijk, J. (1985) : Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) with DNA : formation, identification, and quantitation. **Biochemistry** 24, 707-713.

Fichtinger-Schepman, A.M., van Oosterom, A.T., Lohman, P.H. and Berends, F. (1987) : *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients : quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res** 47, 3000-3004.

Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nhemé, A., Christen, R.D. and Howell, S.B. (1996) : The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. **Cancer Res** 56, 4881-4886.

Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P.S., Aebi, S., Lin, T.P., Nhemé, A., Christen, R.D., Haas, M., MacLeod, C. and Howell, S.B. (1997) : *In vitro* and *in vivo* resistance in cells that have lost DNA mismatch repair. **Cancer Res** 57, 1841-1845.

Fink, D., Aebi, S. and Howell, S.B. (1998) : The role of DNA mismatch repair in drug resistance. **Clin Cancer Res** 4, 1-6.

Fishel, R. and Kolodner, R.D. (1983) : Gene conversion in *Escherichia coli* : the identification of two repair pathways for mismatched nucleotides. **UCLA Symp Mol Cell Biol** 11, 309-312.

Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. (1993) : The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 75, 1027-1038.

Fishel, R. and Wilson, T. (1997) : MutS homologs in mammalian cells. **Curr Opin Genet Dev** 7, 105-113.

Fishel, R. (1998) : Mismatch repair, molecular switches and signal transduction. **Genes Dev** 12, 2096-2101.

Fishel, R. (2001) : The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer : revising the mutator hypothesis. **Cancer Res** 61, 7369-7374.

Flores-Rozas, H. and Kolodner, R.D. (1998) : The *Saccharomyces cerevisiae mlh3* gene functions in Msh3-dependent suppression of frameshift mutations. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 12404-12409.

Flores-Rozas, H., Clark, D. and Kolodner, R.D. (2000) : Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p/Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. **Nat Genet** 26, 375-378.

Fouchet, M.H., Guittet, E., Cognet, J.A., Kozelka, J., Gauthier, C., Le Bret, M., Zimmermann, K. and Chottard, J.C. (1997) : Structure of a nonanucleotide duplex cross-linked by cisplatin at an ApG sequence. **J Biol Inorg Chem** 2, 83-92.

Fourrier, L., Brooks, P. and Malinge, J.M. (2003) : Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. **J Biol Chem** 278, 21267-21275.

Fox, M.E., Feldman, B.J. and Chu, G. (1994) : A novel role for DNA photolyase : binding to DNA damaged by drug is associated with enhanced cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 14, 8071-8077.

Fram, R.J., Cusick, P.S., Wilson, J.M. and Marinus, M.G. (1985) : Mismatch repair of *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-induced DNA damage. **Mol Pharmacol** 28, 51-55.

Fraival, H.N., Rawlings, C.J. and Roberts, J.J. (1978) : Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. **Mutat Res** 51, 121-132.

Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W. (1995) : **DNA Repair and Mutagenesis**. ASM Press, Washington.

Friedman, H.S., Johnson, S.P., Dong, Q. et al. (1997) : Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. **Cancer Res** 57, 2933-2936.

Frit, P., Canitrot, Y., Muller, C., Foray, N., Calsou, P., Marangoni, E., Bourhis, J. and Salles, B. (1999) : Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) : role of Ku autoantigen. **Mol Pharmacol** 56, 141-146.

Fritzell, J.A., Narayanan, L., Baker, S.M., Bronner, C.E., Andrew, S.E., Prolla, T.A., Bradley, A., Jirik, F.R., Liskay, R.M. and Glazer, P.M. (1997) : Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation. **Cancer Res** 57, 5143-5147.

Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H. and Pommier, Y. (2002) : Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. **Cancer Res** 62, 4899-4902.

Gabbara, S., Wyszynski, M. and Bhagwat, A.S. (1994) : A DNA repair process in *Escherichia coli* corrects U/G and T/G mismatches to C/G at sites of cytosine methylation. **Mol Gen Genet** 243, 244-248.

Galio, L., Bouquet, C. and Brooks, P. (1999) : ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. **Nucleic Acids Res** 27, 2325-2331.

Garner, M.M. and Revzin, A. (1981) : A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions : application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. **Nucleic Acids Res** 9, 3047-3060.

Gelasco, A. and Lippard, S.J. (1998) : NMR solution of a DNA dodecamer duplex containing a *cis*-diamminedichloroplatinum (II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Biochemistry** 37, 9230-9239.

Gendrel, C.G. and Dutreix, M. (2001) : (CA/TG) microsatellite sequences escape the inhibition of recombination by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 159, 1539-1545.

Genschel, J., Bazemore, L.R. and Modrich, P. (2002) : Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. **J Biol Chem** 277, 13302-13311.

Gerlach, V.L., Feaver, W.J., Fischhaber, P.L. and Friedberg, E.C. (2001) : Purification and characterization of pol κ , a DNA polymerase encoded by the human *dinbl* gene. **J Biol Chem** 276, 92-98.

Gibbons, G.R., Kaufmann, W.K. and Chaney, S.G. (1991) : Role of DNA replication in carrier-ligand-specific resistance to platinum compounds in L1210 cells. **Carcinogenesis** 12, 2253-2257.

Giraud-Panis, M.J. and Lilley, D.M. (1996) : T4 endonuclease VII. Importance of a histidine-aspartate cluster within the zinc-binding domain. **J Biol Chem** 271, 33148-33155.

Glyckman, B.W. and Radman, M. (1980) : *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. **Prog Natl Acad Sci USA** 77, 1063-1067.

Godwin, A.R., Bollag, R.J., Christie, D. and Liskay, R.M. (1994) : Spontaneous and restriction enzyme-induced chromosomal recombination in mammalian cells. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 12554-12558.

Gomi, A., Shinoda, S., Sakai, R., Hirai, H., Ozawa, K. and Masuzawa, T. (1996) : Elevated expression of DNA polymerase β gene in glioma cell lines with acquired resistance to 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea. **Biochem Biophys Res Commun** 227, 558-563.

Gong, J.G., Costanzo, A., Yang, H.Q., Melino, G., Kaelin, W.G. Jr, Levrero, M. and Wang, J.Y. (1999) : The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. **Nature** 399, 806-809.

Gormley, P.E., Gangji, D., Wood, J.H. and Poplack, D.G. (1981) : Pharmacokinetic study of cerebrospinal fluid penetration of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Chemother Pharmacol.** 5, 257-260.

Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993) : The DNA-dependent protein kinase : requirement for DNA ends and association with Ku antigen. **Cell** 72, 131-142.

Gowen, L.C., Avrutskaya, A.V., Latour, A.M., Koller, B.H. and Leadon, S.A. (1998) : BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. **Science** 281, 1009-1012.

Gradia, S., Acharya, S. and Fishel, R. (1997) : The human mismatch recognition complex hMSH2/hMSH6 functions as a novel molecular switch. **Cell** 91, 995-1005.

Gradia, S., Subramanian, D., Wilson, T., Acharya, S., Makhov, A., Griffith, J. and Fishel, R. (1999) : hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. **Mol Cell** 3, 255-261.

Grilley, M., Welsh, K., Su, S.S. and Modrich, P. (1989) : Isolation and characterisation of the *Escherichia coli* mutL gene product. **J Biol Chem** 264, 1000-1004.

Grilley, M., Griffith, J. and Modrich, P. (1993) : Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 268, 11830-11837.

Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. and Li, G.M. (1998) : ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. **Nucleic Acids Res** 26, 1173-1178.

Gu, Y., Parker, A., Wilson, T.M., Bai, H., Chang, D.-Y. and Lu A-L. (2002) : Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS Homolog 2/Human MutS Homolog 6. **J Biol Chem** 277, 11135-11142.

Guarne, A., Junop, M.S. and Yang, W. (2001) : Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2 : a monomeric GHL ATPase. **EMBO J** 20, 5521-5531.

Gunz, D., Hess, M.T. and Naegeli, H. (1996) : Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. **J Biol Chem** 271, 25089-25098.

Haber, L.T. and Walker, G.C. (1991) : Altering the conserved binding motif in the *Salmonella typhirium* MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities. **EMBO J** 10, 2707-2715.

Haber, J.E. (1999) : Gatekeepers of recombination. **Nature** 398, 665-667.

Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1996) : Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins Msh2 and Msh3. **Curr Biol** 6, 1185-1187.

Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1997) : Enhancement of Msh2/Msh3-mediated mismatch recognition by the yeast Mlh1/Pms1 complex. **Curr Biol** 7, 790-793.

Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1998) : ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast Msh2/Msh6 and Mlh1/Pms1 protein complexes. **J Biol Chem** 273, 9837-9841.

Hall, M.C., Jordan, J.R. and Matson, S.W. (1998) : Evidence for a physical interaction between the *Escherichia coli* methyl-directed repair proteins MutL and UvrD. **EMBO J** 17, 1535-1541.

Hall, M.C. and Matson, S.W. (1999) : The *Escherichia coli* MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. **J Biol Chem** 274, 1306-1312.

- Hall, M.C., Shcherbakova, P.V. and Kunkel, T.A. (2002) : Differential ATP binding and intrinsic ATP hydrolysis by amino-terminal domains of the yeast Mlh1 and Pms1 proteins. **J Biol Chem** 277, 3673-3679.
- Hanawalt, P.C. (1994) : Transcription-coupled repair and human disease. **Science** 266, 1957-1958.
- Hansson, J. and Wood, R.D. (1989) : Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum(II). **Nucleic Acids Res** 17, 8073-8091.
- Harfe, B.D. and Jinks-Robertson, J. (2000) : DNA mismatch repair and genetic instability. **Annu Rev Genet** 34, 359-399.
- Harfe, B.D., Minesinger, B.K. and Jinks-Robertson, S. (2000) : Discrete *in vivo* roles for the MutL homologs Mlh2p and Mlh3p in the removal of frameshift intermediates in budding yeast. **Curr Biol** 10, 145-148.
- Harrington, J.J. and Lieber, M.R. (1994) : The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease. **EMBO J** 13, 1235-1246.
- Harris, R.S., Ross, K.J., Lombardo, M.J. and Rosenberg, S.M. (1998) : Mismatch repair in *Escherichia coli* cells lacking single-strand exonuclease Exo1, ExoVII and RecJ. **J Bacteriol** 190, 989-993.
- Havener, J.M., McElhinny, S.A., Bassett, E., Gauger, M., Ramsden, D.A. and Chaney, S.G. (2003) : Translesion synthesis past platinum DNA adducts by human DNA polymerase μ . **Biochemistry** 42, 1777-1788.
- Hawn, M.T., Umar, A., Carethers, J.M., Marra, G., Kunkel, T.A., Boland, C.R. and Koi, M. (1995) : Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G₂ cell cycle checkpoint. **Cancer Res** 55, 3721-3725.
- He, Z., Henricksen, L.A., Wold, M.S. and Ingles, C.J. (1995) : RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. **Nature** 374, 566-569.
- Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J. and Bird, A. (1999) : The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. **Nature** 401, 301-304.
- Hennecke, F., Kolmar, H., Brundl, K. and Fritz, H.J. (1991) : The *vsr* gene product of *E. coli* K-12 is a strand- and sequence-specific DNA mismatch endonuclease. **Nature** 353, 776-778.

Her, C. and Doggett, N.A.. (1998) : Cloning, structural characterization and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* Msh5 gene. **Genomics** 52, 50-61.

Herman, F., Kozelka, J., Stoven, V., Guittet, E., Girault, J.P., Huynh-Dinh, T., Igolen, J., Lallemand, J.Y. and Chottard, J.C. (1990) : A d(GpG)-platinated decanucleotide duplex is kinked. An extended NMR and molecular mechanics study. **Eur J Biochem** 194, 119-133.

Herzog, K.-H., Chong, M.J., Kapsetaki, M.M., James, I. and McKinnon, P.J. (1998) : Requirement for ATM in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. **Science** 280, 1089-1091.

Hey, T., Lipps, G. and Krauss, G. (2001) : Binding of XPA and RPA to damaged DNA investigated by fluorescence anisotropy. **Biochemistry** 40, 2901-2910.

Hingorani, M.M. and O'Donnell, M. (2000) : Sliding clamps : a (tail)ored fit. **Curr Biol** 10 R25-29.

Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.E. and Mak, T.W. (2000) : DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. **Science** 287, 1824-1827.

Hoeijmakers, J.H. (2001) : Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature** 411, 366-374.

Hoffmann, J.S., Johnson, N.P. and Villani, G. (1989) : Conversion of monofunctional DNA adducts of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) to bifunctional lesions. Effect on the *in vitro* replication of single-stranded DNA polymérase I and eucaryotic DNA polymérases alpha. **J Biol Chem** 264, 15130-15135.

Hoffmann, J.S., Pillaire, M.J., Maga, G., Podust, V., Hubscher, U. and Villani, G. (1995) : DNA polymérase β bypasses *in vitro* a single d(GpG)-cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. **Prog Natl Acad Sci USA** 92, 5356-5360.

Hoffmann, J.S., Pillaire, M.J., Garcia-Estefania, D., Lapalu, S. and Villani, G. (1996)^a : *In vitro* bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymérase β and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic. **J Biol Chem** 271, 15386-15392.

Hoffmann, J.S., Pillaire, M.J., Lesca, C., Burnouf, D., Fuchs, R.P., Defis, M. and Villani, G. (1996)^b : Folk-like DNA templates support bypass replication of lesions that block DNA synthesis on single-stranded templates. **Prog Natl Acad Sci USA** 26, 13766-13769.

Hoffmann, J.S., Locker, D., Villani, G. and Leng, M. (1997) : HMG1 protein inhibits the translesion synthesis of the major DNA cisplatin adduct by cell extracts. **J Mol Biol** 270, 539-543.

Hollingsworth, N.M., Ponte, L. and Halsey, C. (1995) : Msh5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. **Genes Dev** 9, 1728-1739.

Holmes, J.Jr, Clarks, S. and Modrich, P. (1990) : Strand-specificity mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines. **Prog Natl Acad Sci USA** 87, 5837-5841.

Hopkins, P.B., Millard, J.T., Woo, J., Weidner, M.F., Kirchner, J.J., Sigmasson, S.T. and Raucher, S. (1991) : Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents : Importance of minimal DNA structural reorganization in the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatin and mitomycin C. **Tetrahedron** 47, 2475-2489.

Hsieh, P. (2001) : Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. **Mutation Res** 486, 71-87.

Huang, H., Zhu, L., Reid, B.R., Drobny, G.P. and Hopkins, P.B. (1995) : Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. **Science** 270, 1842-1845.

Huang, J., Zamble, D.B., Reardon, J.T., Lippard, S.J. and Sancar, A. (1994) : HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 10394-10398.

Huang, L., Turchi, J.J., Wahl, A.F. and Bambara, R.A. (1993) : Effects of the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) on the activities of calf thymus DNA polymerase epsilon. **Biochemistry** 32, 841-848.

Hughes, M.J. and Jiricny, J. (1992) : The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. **J Biol Chem** 267, 23873-23882.

Hughes, P., Tratner, I., Ducoux, M., Piard, K. and Baldacci, G. (1999) : Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase δ by PCNA-affinity chromatography of mouse FM3 cell extracts. **Nucleic Acids Res** 27, 2108-2114.

Hugues, E.N., Engelsberg, B.N. and Billings, P.C. (1992) : Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. **J Biol Chem** 267, 13520-13527.

Hunter, W.N., Brown, T., Kneale, G., Anand, N.N., Rabinovich, D. and Kennard, O. (1987) : The structure of guanosine-thymidine mismatches in B-DNA at 2.5 Å resolution. **J Biol Chem** 262, 9962-9970.

Iaccarino, I., Palombo, F., Drummond, J., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Modrich, P. and Jiricny, J. (1996) : Msh6, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that binds to mismatches as a heterodimer with Msh2. **Curr Biol** 6, 484-486.

Iaccarino, I., Marra, G., Palombo, F. and Jiricny, J. (1998) : hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α . **EMBO J** 17, 2677-2686.

Iaccarino, I., Marra, G., Dufner, P. and Jiricny, J. (2000) : Mutation in the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutS α sliding clamp from translocating along DNA. **J Biol Chem** 275, 2080-2086.

Ikeda, S., Biswas, T., Roy, R., Izumi, T., Boldogh, I., Kurosky, A., Sarker, A.H., Seki, S. and Mitra S. (1998) : Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. **J Biol Chem** 273, 21585-21593.

Imamura, T., Izumi, H., Nagatani, G., Ise, T., Nomoto, M., Iwamoto, Y. and Kohno, K. (2001) : Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. **J Biol Chem** 276, 7534-40.

Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Kohno, K. (1999) : Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. **Cancer Res** 59, 342-346.

- Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J. and Haber, J.E. (1996) : Genetics requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 142, 693-704.
- Jackson, S.P. (2002) : Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis** 23, 687-696.
- Jayaraman, L., Moorthy, N.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., Bustin, M. and Prives, C. (1998) : High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activation of p53. **Genes Dev** 12, 462-472.
- Jennerwein, M.M., Eastman, A. and Khokhar, A. (1989) : Characterization of adducts produced in DNA by isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum (II) complexes. **Chem Biol Interact** 70, 39-49.
- Jennerwein, M. and Andrews, P.A. (1995) : Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Drug Metab Dispos** 23, 178-184.
- Jeong-Yu, S.J. and Carroll, D. (1992) : Test of the double-strand-break repair model of recombination in *Xenopus laevis* oocytes. **Mol Cell Biol** 12, 112-119.
- Jiricny, J. (1998) : Eukaryotic mismatch repair : an update. **Mutat Res** 409, 107-121.
- Jiricny, J. (2000) : Mismatch repair : the praying hands of fidelity. **Curr Biol** 10, 788-790.
- Jones, C.J. and Wood, R.D. (1993) : Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. **Biochemistry** 32, 12096-12104.
- Jones, M., Wagner, R. and Radman, M. (1987) : Mismatch repair of deaminated 5-methyl-cytosine. **J Mol Biol** 194, 155-159.
- Jordan, P. and Carom-Fonseca, M. (1998) : Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*. **Nucleic Acids Res** 26, 2831-2836.
- Joshi, A., Sen, S. and Rao, B.J. (2000) : ATP-hydrolysis-dependent conformational switch modulates the stability of MutS-mismatch complexes. **Nucleic Acids Res** 28, 853-861.
- Joshi, A. and Rao, B.J. (2002) : ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex : a case for MutS treadmilling? **Biochemistry** 41, 3654-3666.

Jung, Y., Mikata, Y. and Lippard, S.J. (2001): Kinetic studies of the TATA-binding protein interaction with cisplatin-modified DNA. **J Biol Chem** 276, 43589-43596.

Junop, M.S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P. and Yang, W. (2001) : Composite active site of an ABC ATPase : MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorise DNA repair. **Mol Cell** 7, 1-12.

Junop, M.S., Yang, W., Funchain, P., Clendenin, W. and Miller, J.H. (2003) : *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants : correlation of mismatch repair and DNA recombination. **DNA repair** 2, 387-405.

Karran, P. (2001) : Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. **Carcinogenesis** 22, 1931-1937.

Karran, P. and Bignami, M. (1992) : Self-destruction and tolerance in resistance of mammalian cells to alkylation damage. **Nucleic Acids Res** 20, 2933-2940.

Karran, P. and Bignami, M. (1994) : DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. **Bioessays** 16, 833-839.

Kartalou, M., Samson, L.D. and Essigmann, J.M. (2000) : Cisplatin adducts inhibit 1, N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. **Biochemistry** 39, 8032-8038.

Kartalou, M. and Essigmann, J.M. (2001)^a : Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res** 478, 23-43.

Kartalou, M. and Essigmann, J.M. (2001)^b : Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. **Mutat Res** 478, 1-21.

Kat, A., Thilly, W.G., Fang, W.H., Longley, M.J., Li, G.M. and Modrich, P. (1993) : An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. **Prog Natl Acad Sci USA** 90, 6424-6428.

Kawate, H., Ihara, K., Kohda, K., Sakumi, K. and Sekiguchi, M. (1995) : Mouse methyltransferase for repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine in DNA. **Carcinogenesis** 16, 1595-1602.

Kim, P.M., Allen, C., Wagener, B.M. Shen, Z. and Nickoloff, J.A. (2001) : Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. **Nucleic Acids Res** 29, 4352-4360.

Kim, S.T. and Sancar, A. (1991) : Effect of base, pentose, and phosphodiester backbone structures on binding and repair of pyrimidine dimers by *Escherichia coli* DNA photolyase. **Biochemistry** 30, 8623-8630.

Kleczkowska, H.E., Marra, G., Lettieri, T. and Jiricny, J. (2001) : hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. **Genes Dev** 15, 724-736.

Kleibl, K. (2002) : Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O6-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. **Mutat Res** 512, 67-84.

Klungland, A. and Lindahl, T. (1997) : 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.

Kneitz, B., Cohen, P.E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M.F., Hou, H. Jr., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R., Pollard, J.W. and Edelman, W. (2000) : MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. **Genes Dev** 14, 1085-1097.

Koi, M., Umar, A., Chauhan, D.P., Cherian, S.P., Carethers, J.M., Kunkel, T.A. and Boland, C.R. (1994) : Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. **Cancer Res** 54, 4308-4312.

Kolodner, R.D. and Marsischky, G.T. (1999) : Eukaryotic DNA mismatch repair. **Curr Opin Genet Dev** 9, 89-96.

Kondo, E., Horii, A. and Fukushige, S. (2001) : The interacting domains of three MutL heterodimers in man : hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. **Nucleic Acids Res** 29, 1695-1702.

Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997) : DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. **Biochemistry J** 325, 1-16.

Kunkel, T.A. (1986) : Frameshift mutagenesis by eucaryotic DNA polymerases *in vitro*. **J Biol Chem** 261, 13581-13587.

Kunkel, T.A. (1992) : DNA replication fidelity. **J Biol Chem** 267, 18251-18254.

Kuraoka, I., Morita, E.H., Saijo, M., Matsuda, T., Morikawa, K., Shirakawa, M. and Tanaka, K. (1996) : Identification of a damaged-DNA binding domain of the XPA protein. **Mutat Res** 362, 87-95.

Laengle–Rouault, F., Maenhaut–Michel, G. and Radman, M. (1986) : GATC sequence and mismatch repair in *Escherichia coli*. **EMBO J** 5, 2009-2013.

Lage, H. and Dietel, M. (1999) : Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. **J Cancer Res Clin Oncol** 125, 156-165.

Lahue, R.S., Au, K.G. and Modrich, P. (1987) : Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction. **Prog Natl Acad Sci USA** 84, 1482-1486.

Lahue, R.S., Au, K.G. and Modrich, P. (1989) : DNA mismatch correction in a defined system. **Science** 245, 160-164.

Lamers, M.H., Perrakis, A., Enzlin, J.H., Winterwerp, H.H., de Wind, N. and Sixma, T.K. (2000) : The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G/T mismatch. **Nature** 407, 711-717.

Lamers, M.H., Winterwerp, H.H. and Sixma, T.K. (2003) : The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. **EMBO J** 22, 746-756.

Langland, G., Kordich, J., Creaney, J., Goss, K.H., Lillard-Wetherell, K., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Groden, J. (2001) : The Bloom's syndrome protein (BLM) interacts with MLH1 but is not required for DNA mismatch repair. **J Biol Chem** 276, 30031-5.

Lau, P.J., Flores-Rozas, H. and Kolodner, R.D. (2002) : Isolation and characterization of new proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mutator mutants that are defective in DNA mismatch repair. **Mol Cell Biol** 22, 6669-6680.

Lau, P.J. and Kolodner, R.D. (2003) : Transfer of the MSH2/MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. **J Biol Chem** 278, 14-17.

Le Page, F., Klungland, A., Barnes, D.E., Sarasin, A. and Boiteux, S. (2000)^a : Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: The Ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences. **Prog Natl Acad Sci USA** 97 , 8397-8402.

Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. and Sarasin, A. (2000)^b : BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. **Cancer Res** 60, 5548-5552.

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., Nystrom-Lahti, M., et al. (1993) : Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell** 75, 1215-1225.

Leadon, S.A. (1999) : Transcription-coupled repair of DNA damage : unanticipated players, unexpected complexities. **Am J Hum Genet** 64, 1259-1263.

Leber, R., Wise, T.W., Mizuta, R. and Meek, K. (1998) : The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. **J Biol Chem** 273, 1794-1801.

Lee, K.B., Parker, R.J., Bohr, V., Cornelison, T. and Reed, E. (1993) : Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. **Carcinogenesis** 14, 2177-2180.

Lee, K.B., Wang, D., Lippard, S.J. and Sharp, P.A. (2002) : Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II *in vitro*. **Prog Natl Acad Sci USA** 99, 4239-4244.

Lee, S.H. and Hurwitz, J. (1990) : Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , by proliferating cell nuclear antigen and activator 1. **Prog Natl Acad Sci USA** 87, 5672-5676.

Lemaire, M.A., Schwartz, A., Rahmouni, A.R. and Leng, M. (1991) : Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. **Prog Natl Acad Sci USA** 88, 1982-1985.

Lempers, E.L., Inagaki, K. and Reedijk, J. (1988) : Reactions of [PtCl(dien)]Cl with glutathione, oxidized glutathione and S-methyl glutathione. Formation of an S-bridged dinuclear unit. **Inorg Chim Acta** 152, 201-207.

Leopold, W.R., Batzinger, R.P., Miller, E.C., Miller, J.A. and Earhart, R.H. (1981) : Mutagenicity, tumorigenicity and electrophilic reactivity of the stereoisomeric platinum (II) complexes of 1,2-diaminocyclohexane. **Cancer Res** 41, 4368-4377.

Lepre, C.A., Strothkamp, K.G. and Lippard, S.J. (1987) : Synthesis and ¹H NMR spectroscopic characterization of *trans*-[Pt(NH₃)₂[d(ApGpGpCpCpT)-N7-A(1),N7-G(3)]]. **Biochemistry** 26, 5651-5657.

Lepre, C.A. and Lippard, S.J. (1990) : Interaction of platinum antitumor compounds with DNA. **Nucleic Acids and Mol Biol** 4, 9-38.

Lewis, L.K., Karthikeyan, G., Westmoreland, J.W. and Resnick, M.A. (2002) : Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). **Genetics** 160, 49-62.

Li, X., Li J., Harrington, J., Lieber, M.R. and Burgers, P.M. (1995) : Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen. **J Biol Chem** 270, 22109-22112.

Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E. and Alt, F.W. (1995) : The *xrcc4* gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand Break repair and V(D)J recombination. **Cell** 83 , 1079-1089.

Lieb, M. and Rehmat, S. (1995) : Very short patch repair of T/G mismatches *in vivo* : importance of context and accessory proteins. **J Bacteriol** 177, 660-666.

Lieb, M., Allen, E. and Read, D. (1986) : Very short patch mismatch repair in phage lambda : repair sites and length of repair tracts. **Genetics** 114, 1041-1060.

Lieb, M., Rehmat, S. and Bhagwat, A.S. (2001) : Interaction of MutS and Vsr : some dominant-negative *mutS* mutations that disable methyladenine-directed mismatch repair are active in very-short-patch repair. **J Bacteriol** 183, 6487-6490.

- Lin, X., Kim, H.K. and Howell, S.B. (1999) : The role of DNA mismatch repair in cisplatin mutagenicity. **J Inorg Biochem** 77, 89-93.
- Lin, Y.L., Shivji, M.K., Chen, C., Kolodner, R.D., Wood, R.D. and Dutta, A. (1998) : The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. **J Biol Chem** 273, 1453-1461.
- Lipkin, S.M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A.D., Lynch, H.T., Elliott, R.M. and Collins, F.S. (2000) : *mlh3* : a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nat Genet** 24, 27-35.
- Liu, H., Hewitt, S.R. and Hays, J.B. (2000) : Antagonism of ultraviolet-light mutagenesis by the methyl-directed mismatch-repair system of *Escherichia coli*. **Genetics** 154, 503-512.
- Liu, L., Markowitz, S. and Gerson, S.L. (1996) : Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. **Cancer Res** 56, 5375-5379.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J.E. (1999) : DNA replication, repair, and recombination from **Molecular cell biology**, 4th Edition. Edited by W.H. Freeman and Co, New York.
- Longley, M.J., Pierce, A.J. and Modrich, P. (1997) : DNA polymerase δ is required for human mismatch repair *in vitro*. **J Biol Chem** 272, 10917-10921.
- Lopez de Saro, F.J. and O'Donnell, M. (2001) : Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. **Prog Natl Acad Sci USA** 98, 8376-8380.
- Lovett, S.T. and Kolodner, R.D. (1989) : Identification and purification of a single-strand-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene product of *Escherichia coli*. **Prog Natl Acad Sci USA** 89, 2627-2631.
- Lu, A.L., Clark, S. and Modrich, P. (1983) : Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches *in vitro*. **Prog Natl Acad Sci USA** 80, 4639-4643.

Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac N., Blanco, L., Blanca, G., Spadari, S. and Hubscher, U. (2002) : Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. **J Biol Chem** 277, 48434-48440.

Malinge, J.M., Perez, C. and Leng, M. (1994) : Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. **Nucleic Acids Res** 22, 3834-3839.

Malkov, V.A., Biswas, I., Camerini-Otero, R.D. and Hsieh, P. (1997) : Photocross-linking of the NH₂-terminal region of *Taq* MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA. **J Biol Chem** 272, 23811-23817.

Mamenta, E.L., Poma, E.E., Kaufmann, W.K., Delmastro, D.A., Grady, H.L. and Chaney, S.G. (1994) : Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines. **Cancer Res** 54, 3500-3505.

Manaka, R.C. and Wolf, W. (1978) : Distribution of cisplatin in blood. **Chem Biol Interact** 22, 353-358.

Marinus, M.G., Poteete, A. and Arraj, J.A. (1984) : Correlation of DNA adenine methylase activity with spontaneous mutability in *Escherichia coli* K-12. **Gene** 28, 123-125.

Marrot, L. and Leng, M. (1989) : Chemical probes of the conformation of DNA modified by *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry** 28, 1454-61.

Marsischky, G.T. and Kolodner, R.D. (1999) : Biochemical characterization of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* Msh2/Msh6 complex and mispaired bases in DNA. **J Biol Chem** 274, 26668-26682.

Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O. (2002) : DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. **J Cell Physiol** 191, 28-41.

Marzilli, L.G., Saad, J.S., Kuklenyik, Z., Keating, K.A. and Xu, Y. (2001) : Relationship of solution and protein-bound structures of DNA duplexes with the major intrastrand cross-link lesions formed on cisplatin binding to DNA. **J Am Chem Soc** 123, 2764-2770.

Matic, I., Taddei, F. and Radman, M. (2000) : No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. **J Bacteriol** 182, 5922-5924.

Matson, S.W. (1986) : *Escherichia coli* helicase II (*urvD* gene product) translocates unidirectionally in a 3' to 5' direction. **J Biol Chem** 261, 10169-10175.

Matsuda, T., Saijo M., Kuraoka, I., Kobayashi, T., Nakatsu, Y., Nagai, A., Enjoji, T., Masutani, C., Sugasawa, K., Hanaoka, F. et al. (1995) : DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA). **J Biol Chem** 270, 4152-4157.

Mazurek, A., Berardini, M. and Fishel, R. (2002) : Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. **J Biol Chem** 277, 8260-8266.

McA'Nulty, M.M., Whitehead, J.P. and Lippard, S.J. (1996) : Binding of Ixrl, a yeast HMG-domain protein, to cisplatin-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. **Biochemistry** 35, 6089-6099.

Mechanic, L.E., Frankel, B.A. and Matson, S.W. (2000) : *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. **J Biol Chem** 275, 38337-38346.

Mello, J.A., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1995) : DNA adducts of *cis*-diamminedichloro-platinum (II) and its *trans* isomer inhibit RNA polymérase II differently *in vivo*. **Biochemistry** 34, 14783-14791.

Mello, J.A., Acharya, S., Fishel, R. and Essigmann, J.M. (1996) : The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. **Chem Biol** 3, 579-589.

Mellon, I. and Champe, G.N. (1996) : Products of DNA mismatch repair genes *mutS* and *mutL* are required for transcription-coupled nucleotide-excision repair of the lactose operon in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 292-1297.

Mellon, I., Rajpal, D.K., Koi, M., Boland, C.R. and Champe, G.N. (1996) : Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. **Science** 272, 557-560.

Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. and Miller, J.H. (1992) : A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. **Biochemistry** 31, 10964-10968.

Mimori, T. and Hardin, J.A. (1986) : Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. **J Biol Chem** 261, 10375-10379

Mis, J.R. and Kunz, B.A. (1990) : Analysis of mutations induced in the *sup4-o* gene of *Saccharomyces cerevisiae* by *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Carcinogenesis** 11, 633-638.

Mizuta, R., LaSalle, J.M., Cheng, H.L., Shinohara, A., Ogawa, H., Copeland, N., Jenkins, N.A., Lalande, M. and Alt, F.W. (1997) : Rab22 and Rab163/mouse BRCA2 : proteins that specifically interact with the Rad51 protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 94, 6927-6932.

Modrich, P. (1991) : Mechanisms and biological effects of mismatch repair. **Annu Rev Genet** 25 p 229-253.

Modrich, P. and Lahue, R.S. (1996) : Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. **Annu Rev Biochem** 65, 101-133.

Modrich, P. (1997) : Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. **J Biol Chem** 272, 24727-24730.

Moggs, J.G., Yarema, K.J., Essigmann, J.M., and Wood, R.D. (1996) : Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. **J Biol Chem** 271, 7177-7186.

Moggs, J.G., Szymkowski, D.E., Yamada, M., Karran, P. and Wood, R.D. (1997) : Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. **Nucleic Acids Res** 25, 480-91.

Mohindra, A., Hays, L.E., Phillips, E.N., Preston, B.D., Helleday, T. and Meuth, M. (2002) : Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines. **Hum Mol Genet** 11, 2189-2200.

Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D.S., Gary, R., Park, M.S., Motycka, T.A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G. and Tomkinson, A.E. (1998) : DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen : identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. **EMBO J** 17, 3786-3795.

- Morrison, C., Sonoda, E., Takao, N., Shinohara, A., Yamamoto, K. and Takeda, S. (2000) : The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. **EMBO J** 19, 463-471.
- Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H. and Jasin, M. (1999) : BRCA1 controls homology-directed DNA repair. **Mol Cell** 4, 511-518.
- Mu, D., Tursun, M., Duckett, D.R., Drummond, J.T., Modrich, P. and Sancar, A. (1997) : Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. **Mol Cell Biol** 17, 760-769.
- Muller, C., Calsou, P., Frit, P., Cayrol, C., Carter, T. and Salles, B. (1998) : UV sensitivity and impaired nucleotide excision repair in DNA-dependent protein kinase mutant cells. **Nucleic Acids Res** 26, 1382-1389.
- Mymryk, J.S., Zaniewski, E. and Archer, T.K. (1995) : Cisplatin inhibits chromatin remodeling, transcription factor binding and transcription from the mouse mammary tumor virus promoter *in vivo*. **Prog Natl Acad Sci USA** 92, 2076-2080.
- Myung, K., Datta, A., Chen, C. and Kolodner, R.D. (2001) : Sgs1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. **Nat Genet** 27, 113-116.
- Naegeli, H., Modrich, P. and Friedberg, E.C. (1993) : The DNA helicase activities of Rad3 protein of *Saccharomyces cerevisiae* and helicase II of *Escherichia coli* are differentially inhibited by covalent and noncovalent DNA modifications. **J Biol Chem** 268, 10386-10392.
- Nakagawa, T., Datta, A. and Kolodner, R.D. (1999) : Multiple functions of MutS- and MutL-related heterocomplexes. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 14186-14188.
- Neddermann, P., Gallinari, P., Lettieri, T., Schmid, D., Truong, O., Hsuan, J.J., Wiebauer, K. and Jiricny, J. (1996) : Cloning and expression of human G/T mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. **J Biol Chem** 271, 12767-12774.
- Nehmé, A., Baskaran, R., Aebi, S., Fink, D., Nebel, S., Cenni, B., Wang, J.Y., Howell, S.B. and Christen, R.D. (1997) : Differential induction of c-jun NH₂-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. **Cancer Res** 57, 3253-3257.

New, L., Liu, K. and Crouse, G.F. (1993) : The yeast gene *mhs3* defines a new class of eukaryotic MutS homologs. **Mol Gen Genet** 239, 97-108.

Ni, T.T., Marsischky, G.T. and Kolodner, R.D. (1999) : Msh2 and Msh6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxoguanine in *S. cerevisiae*. **Mol Cell** 4, 439-444.

Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K.C., Ruben, S.M., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M. et al. (1994) : Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature**.371, 75-80.

Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. and Yang, W. (2000) : Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. **Nature** 407, 703-710.

Ohndorf, U.M., Whitehead, J.P., Raju, N.L. and Lippard, S.J. (1997) : Binding of tsHMG, a mouse testis-specific HMG-domain protein, to cisplatin-DNA Adducts. **Biochemistry** 36, 14807-14815.

Ouchi, T., Monteiro, A.N., August, A., Aaronson, S.A. and Hanafusa, H. (1998) : BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. **Prog Natl Acad Sci USA** 95 p 2302-2306.

Ozer, Z., Reardon, J.T., Hsu, D.S., Malhotra, K. and Sancar, A. (1995) : The other function of DNA photolyase : stimulation of excision repair of chemical damage to DNA. **Biochemistry** 34, 15886-15889.

Paillard, S. and Strauss, F. (1991) : Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. **Nucleic Acids Res** 19, 5619-5624.

Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J.J. and Jiricny, J. (1995) : GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 268, 1912-1914.

Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T. and Jiricny, J. (1996) : hMutS β , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds insertion/deletion loops in DNA. **Curr Biol** 6, 1181-1184

Pang, Q. Prolla, T.A. and Liskay, R.M. (1997) : Functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA mismatch repair proteins and their relevance to human hereditary non-polyposis colorectal cancer-associated mutations. **Mol Cell Biol** 17, 4465-4473.

Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.F., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D. et al (1994) : Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. **Science**. 1994 263, 1625-9.

Paques, F. and Haber, J.E. (1999) : Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 63, 349-404.

Paquet, F., Perez, C., Leng, M., Lancelot, G. and Malinge, J.M. (1996) : NMR solution structure of a DNA decamer containing an interstrand cross-link of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **J Biomol Struct Dyn** 14, 67-77.

Paquis-Flucklinger, V., Santucci-Darmanin, S., Paul, R., Saunieres, A., Turc-Carel, C. and Desnuelle, C. (1997) : Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. **Genomics** 44, 188-194.

Park, C.H. and Sansar, A. (1994) : Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4 (XPF) excision repair proteins. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 5017-5021.

Park, C.H., Bessho, T., Matsunaga, T. and Sancar, A. (1995) : Purification and characterization of the XPF/ERCC1 complex of human DNA repair excision nuclease. **J Biol Chem** 270, 22657-22660.

Parker, A., Gu, Y., Mahoney, W., Lee, S.H., Singh, K.K. and Lu, A.L. (2001) : Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair. **J Biol Chem** 276, 5547-5555.

Parker, B.O. and Marinus, M.G. (1992) : Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. **Prog Natl Acad Sci USA** 89, 1730-1734.

Parkinson, J.A., Chen, Y., del Socorro Murdoch, P., Guo, Z., Berners-Price, S.J., Brown, T. and Sadler, P.J. (2000) : Sequence-dependent bending of DNA induced by cisplatin : NMR structures of an A/T-rich 14-mer duplex. **Chemistry** 6, 3636-3644.

Patrick, S.M. and Turchi, J.J. (1998) : Human replication protein A preferentially binds cisplatin-damaged duplex DNA *in vitro*. **Biochemistry** 37, 8808-8815.

Paull, T.T. and Gellert, M. (1999) : Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. **Genes Dev** 13, 1276-1288.

Payne, A. and Chu, G. (1994) : Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. **Mutat Res** 310, 89-102.

Pedrazzi, G., Perrera, C., Blaser, H., Kuster, P., Marra, G., Davies, S.L., Ryu, G.H., Freire, R., Hickson, I.D., Jiricny, J. and Stagljar, I. (2001) : Direct association of Bloom's syndrome gene product with the human mismatch repair protein MLH1. **Nucleic Acids Res** 29, 4378-4386.

Pepponi, R., Marra, G., Fuggetta, M.P., Falcinelli, S., Pagani, E., Bonmassar, E., Jiricny, J. and D'Atri, S. (2003) : The effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair activities on the sensitivity of human melanoma cells to temozolomide, 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea and cisplatin. **Pharmacol Exp Ther** 304, 661-668.

Petes, T.D., Malone, R.E. and Syminton, L.S. (1991) : Recombination in yeast from **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces***, p 407-521. Edited by J.R. Broach, J.R. Pringle and E.W. Jones. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.

Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G.D., Seeholzer, S.H., Stoerker, J., Genuardi, M., Yeung, A.T., Matsumoto, Y. and Bellacosa, A. (2000)^a : Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MDB4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. **J Biol Chem** 275, 32422-32429.

Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G.D., Seeholzer, S.H., Genuardi, M., Karbowski, M., Yeung, A.T., Matsumoto, Y. and Bellacosa, A. (2000)^b : Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1(MDB4) : fundamental role of the catalytic domain. **J Cell Physiol** 185, 473-480.

Pichierri, P., Franchitto, A., Piergentili, R., Colussi, C. and Palitti, F. (2001) : Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair. **Carcinogenesis** 22, 1781-1787.

Pil, P.M. and Lippard, S.J. (1992) : Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. **Science** 256, 234-237.

Pillaire, M.J., Margot, A., Villani, G., Sarasin, A., Defais, M. and Gentil, A. (1994) : Mutagenesis in monkey cells of a vector containing a single d(GpG) *cis*-diamminedichloroplatinum (II) adduct placed on codon 13 of the human *H-ras* proto-oncogene. **Nucleic Acids Res** 22, 2519-2524.

Pinto, A.L. and Lippard, S.J. (1985) : Sequence-dependent termination of *in vitro* DNA synthesis by *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II). **Proc Natl Acad Sci USA** 82, 4616-4619.

Plooy, A.C., van Dijk, M. and Lohman, P.H. (1984) : Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity and antitumor activity. **Cancer Res** 44 p2043-2051.

Plooy, A.C., van Dijk, M., Berends, F. and Lohman, P.H. (1985) : Formation and repair of DNA interstand cross-links in relation to cytotoxicity and unscheduled DNA synthesis induced in control and mutant human cells treated with *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res** 45, 4178-4184.

Poll, E.H., Abrahams, P.J., Arwert, F. and Eriksson, A.W. (1984) : Host-cell reactivation of *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-treated SV40 DNA in normal human, Fanconi anaemia and xeroderma pigmentosum fibroblasts. **Mutat Res** 132, 181-187.

Porello, S.L., Williams, S.D., Kuhn, H., Michaels, M.L. and David, S.S. (1996) : Specific recognition of substrate analogs by the DNA mismatch repair enzyme MutY. **J Am Chem Soc** 118, 10684-10692.

Povirk, L.F. (1996) : DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. **Mutat Res** 355, 71-89.

Preston, C.R., Engels, W. and Flores, C. (2002) : Efficient repair of DNA breaks in *Drosophila* : Evidence for single-strand annealing and competition with other repair pathways. **Genetics** 161, 711-720.

Proffitt, J.H., Davie, J.R., Swinton, D. and Hattman, S. (1984) : 5-methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. **Mol Cell Biol** 4, 985-988.

Prolla, T.A., Christie, D.M. and Liskay, R.M. (1994)^a : Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for *mlh1* and *pms1*, two homologs of the bacterial *mutL* gene. **Mol Cell Biol** 14, 407-415.

Prolla, T.A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R.D. and Liskay, R.M (1994)^b : Mlh1, Pms1 and Msh2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast. **Science** 265, 1091-1093.

- Rajagopalan, M., Lu, C., Woodgate, R. O'Donnell, M., Goodman, M.F. and Echols, H. (1992) : Activity of the purified mutagenesis proteins UmuC, UmuD' and RecA in replicative bypass of an abasic DNA lesion by DNA polymérase III. **Prog Natl Acad Sci USA** 89, 10777-10781.
- Ramilo, C., Gu, L., Guo, S., Zhang, X., Patrick, S.M., Turchi, J.J. and Li, G.M. (2002) : Partial reconstitution of human DNA mismatch repair *in vitro* : characterisation of the role of human replication protein A. **Mol Cell Biol** 22, 2037-2046.
- Räschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P. and Jiricny, J. (1999) : Identification of hMutL β , a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. **J Biol Chem** 274, 32368-32375.
- Räschle, M., Dufner, P., Marra, G. and Jiricny, J. (2002) : Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutL α mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutS α . **J Biol Chem** 277, 21810-21820.
- Rasmussen, L.J. and Samson, L. (1996) : The *Escherichia coli* MutS DNA mismatch binding protein specifically binds O6-methylguanine DNA lesions. **Carcinogenesis** 17, 2085-2088.
- Ray, B.L., White, C.I. and Haber, J.E. (1991) : Heteroduplex formation and mismatch repair of the "stuck" mutation during mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 11, 5372-5380.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S. and Radman, M. (1989) : The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. **Nature** 342, 396-401.
- Reenan, R.A. and Kolodner, R.D. (1992) : Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *msh1* and *msh2* genes : evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. **Genetics** 132, 975-985.
- Revzin, A. (1989) : Gel electrophoresis assays for DNA-protein interactions. **Biotechniques** 7, 346-355.
- Risinger, J.I., Umar, A., Boyd, J., Berchuck, A., Kunkel, T.A. and Barrett, J.C. (1996) : Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. **Nat Genet** 14, 102-105.

- Roberts, J.J. and Friedlos, F. (1987) : Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells : relationship to toxicity. **Pharmacol Ther** 34, 215-246.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) : DNA double-stranded breaks induce histone H₂AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem** 273, 5858-5868.
- Roongta, V.A., Jones, C.R. and Gorenstein, D.G. (1990) : Effect of distortions in the deoxyribose phosphate backbone conformation of duplex oligodeoxyribonucleotide dodecamers containing G/T, G/G, G/A, A/C, and G/U base-pair mismatches on 31P NMR spectra. **Biochemistry** 29, 5245-5258.
- Rosenberg, B., van Camp, L. and Krigas, T. (1965) : Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. **Nature** 205, 698-699.
- Ross-Macdonald, P. and Roeder, G.S. (1994) : Mutations of meiosis-specific MutS homolog decreases crossing-over but not mismatch correction. **Cell** 79, 1069-1080.
- Sancar, A. (1996) : DNA excision repair. **Annu Rev Biochem** 65, 43-81.
- Sancar, A. (1999) : Excision repair invades the territory of mismatch repair. **Nat Genet** 21, 247-249.
- Sancar, G.B. and Smith, F.W. (1989) : Interactions between yeast photolyase and nucleotide excision repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. **Mol Cell Biol** 9, 4767-4776.
- Saris, C.P., van der Vaart, P.J., Rietbroek, R.C., and Blommaert, F.A. (1996) : *In vitro* formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. **Carcinogenesis** 17, 2763-2769.
- Scheeff, E.D., Briggs, J.M. and Howell, S.B. (1999) : Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. **Mol Pharmacol** 56, 633-643.
- Schmutte, C., Marinescu, R.C., Sadoff, M.M., Guerrette, S., Overhauser, J. and Fishel, R. (1998) : Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. **Cancer Res** 58, 4537-4542.
- Schmutte, C., Sadoff, M.M., Shim, K.S., Acharya, S. and Fishel, R. (2001) : The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. **JBC** 276, 33011-33018.

Schofield, M.J., Brownell, F.E., Nayak, S., Du, C., Kool, E.T. and Hsieh, P. (2001)^a : The Phe-X-Glu DNA binding motif of MutS. The role of hydrogen bonding in mismatch recognition. **J Biol Chem** 276, 45505-45508.

Schofield, M.J., Nayak, S., Scott, T.H., Du, C. and Hsieh, P. (2001)^b : Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch. **J Biol Chem** 276, 28291-28299.

Schröder, G., Kozelka, J., Sabat, M., Fouchet, M.H., Beyerle-Pfnur, R. and Lippert, B. (1996) : Model of the second most abundant cisplatin-DNA cross-link: X-ray crystal structure and conformational analysis of *cis*-[(NH(3))(2)Pt(9-MeA-N7)(9-EtGH-N7)](NO(3)).2H(2)O (9-MeA = 9-Methyladenine; 9-EtGH = 9-Ethylguanine). **Inorg Chem** 35, 1647-1652.

Schweizer, U., Hey, T., Lipps, G. and Krauss, G. (1999) : Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA. **Nucleic Acids Res** 27, 3183-3189.

Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Ye, L., Young, R.A., Livingston, D.M. and Parvin, J.D. (1997)^a : BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. **Prog Natl Acad Sci USA** 94, 5605-5610.

Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. and Livingston, D.M. (1997)^b : Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells **Cell** 88, 265.

Scully, R., Ganesan, S., Vlasakova, K., Chen, J., Socolovsky, M. and Livingston, D.M. (1999) : Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. **Mol Cell** 4, 1093-1099.

Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1998) : RuvAB acts at arrested replication forks. **Cell** 95, 419-430.

Selby, C.P. and Sancar, A. (1990) : Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand *in vitro*. **J Biol Chem** 265, 21330-21336.

Selby, C.P., Witkin, E.M. and Sancar, A. (1991) : *Escherichia coli mfd* mutant deficient in "mutation frequency decline" lacks strand-specific repair : *in vitro* complementation with purified coupling factor. **Prog Natl Acad Sci USA** 88, 11574-11578.

Selby, C.P. and Sancar, A. (1993) : Molecular mechanism of transcription-repair coupling. **Science** 260, 53-58.

Selva, E.M., New, L., Crouse, G.F. and Lahue, R.S. (1995) : Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 139, 1175-1188.

Shellard, S.A., Fichtinger-Schepman, A.M., Lazo, J.S. and Hill, B.T. (1993) : Evidence of differential cisplatin-DNA adduct formation, removal and tolerance of DNA damage in three human lung carcinoma cell lines. **Anticancer Drugs** 4, 491-500.

Shiloh, Y. and Kastan, M.B. (2001) : ATM : genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. **Adv Cancer Res** 83, 209-254.

Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R.D. and Wang, J.Y. (2003) : Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. **Prog Natl Acad Sci USA** 100, 2420-2425.

Shiraishi, A., Sakumi, K. and Sekiguchi, M. (2000) : Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. **Carcinogenesis** 21, 1879-1883.

Sixma, T.K. (2001) : DNA mismatch repair : MutS structures bound to mismatches. **Curr Opin Struct Biol** 11, 47-52.

Slupska, M.M., Luther, W.M., Chiang, J.H., Yang, H. and Miller, J.H. (1999) : Functionnal expression of hMYH, a human homolog of the *Escherichia coli* MutY protein. **J Bacteriol** 181, 6210-6213.

Sohail, A., Lieb, M., Dar, M. and Bhagwat, A.S. (1990) : A gene required for very short patch repair in *Escherichia coli* is adjacent to the DNA cytosine methylase gene. **J Bacteriol** 172, 4214-4221.

Sorenson, C.M. and Eastman, A. (1988) : Mechanism of *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity : role of G₂ arrest and DNA double-strand breaks. **Cancer Res** 48, 4484-4488.

Sorenson, C.M., Barry, M.A. and Eastman, A. (1990) : Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. **J Natl Cancer Inst** 82, 749-755.

Spampinato, C. and Modrich, P. (2000) : The MutL ATPase is required for mismatch repair. **J Biol Chem** 275, 9863-9869.

Spingler, B., Whittington, D.A. and Lippard, S.J. (2001) : 2.4 Å crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. **Inorg Chem** 40, 5596-5602.

Stambuk, S. and Radman, M. (1998) : Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. **Genetics** 150, 533-542.

Su, S.S. and Modrich, P. (1986) : *Escherichia coli* MutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. **Prog Natl Acad Sci USA** 83, 5057-5061.

Su, S.S., Lahue, R.S., Au, K.G. and Modrich, P. (1988) : Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction *in vitro*. **J Biol Chem** 263, 6829-6835.

Su, S.S., Grilley, M., Thresher, R., Griffith, J. and Modrich, P. (1989) : Gap formation is associated with methyl-directed mismatch correction under conditions of restricted DNA synthesis. **Genome** 31, 104-111.

Sugawara, N., Paques, F., Colaiacovo, M. and Haber, J.E. (1997) : Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. **Prog Natl Acad Sci USA** 94, 9214-9219.

Sugawara, N., Ira, G. and Haber, J.E. (2000) : DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* Rad59 in double-strand break repair. **Mol Cell Biol** 20, 5300-5309.

Suwa, A., Hirakata, M., Takeda, Y., Jesch, S.A., Mimori, T. and Hardin, J.A. (1994) : DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 6904-6908.

Svoboda, D.L., Taylor, J.S., Hearst, J.E. and Sancar, A. (1993) : DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes. **J Biol Chem** 268, 1931-1936.

Swann, P.F., Waters, T.R., Moulton, D.C., Xu, Y.-Z., Edwards, M. and Mace, R. (1996) : Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. **Science** 273, 1109-1111.

Szymkowski, D.E., Lawrence, C.W. and Wood, R.D. (1993) : Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine/thymine photoproducts in DNA. **Prog Natl Acad Sci USA** 90, 9823-9827.

Takahara, P.M., Rosenzweig, A.C., Frederick, C.A. and Lippard, S.J. (1995) : Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature** 377, 649-652.

Takamatsu, S., Kato, R. and Kuramitsu, S. (1996) : Mismatch DNA recognition protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. **Nucleic Acids Res** 24, 640-647.

Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y. (2000) : A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. **Nature** 404, 42-49.

Tanaka, N., Saito, H., Kimoto, H. and Taketo, A. (1998) : Effects of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) on *Escherichia coli* and bacteriophage systems. **J Biochem** 123, 821-826.

Tang, M., Bruck, I., Eritja, R., Turner, J., Frank, E., Woodgate, R., O'Donnell, M. and Goodman, M.F. (1998) : Biochemical basis of SOS-induced mutagenesis in *Escherichia coli* : reconstitution of *in vitro* lesion bypass dependent on the UmuD'₂C mutagenic complex and RecA protein. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 9755-9760.

Tang, M., Shen, X., Frank, E.G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M.F. (1999) : UmuD'₂C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* pol V. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 8919-8924.

Tanguy le Gac, N., Villani, G. and Boehmer, P.E. (1998) : Herpes simplex virus type-1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) enhances the ability of the viral DNA helicase-primase to unwind cisplatin-modified DNA. **J Biol Chem** 273, 13801-13807.

Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., Matsuura, S., Nakamura, A., Shiraishi, T., Ito, E., Masnada, D., Delia, D. and Komatsu, K. (2001) : The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRad50/hMre11/Nbs1 complex DNA repair activity. **J Biol Chem** 276, 12-15.

Teuben, J.M., Bauer, C., Wang, A.H. and Reedjik, J. (1999) : Solution structure of a DNA duplex containing a *cis*-diamminedichloroplatinum (II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. **Biochemistry** 38, 12305-12312.

Thomas, D.C., Roberts, J.D. and Kunkel, T.A. (1991) : Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. **J Biol Chem** 266, 3744-3751.

Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B.A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R.B., Borg, A. and Kallioniemi, O.P. (1997) : Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. **Cancer Res** 57, 1222-1227.

Tishkoff, D.X., Filosi, N., Gaida, G.M. and Kolodner, R.D. (1997) : A novel mutation avoidance mechanism dependent on *Saccharomyces cerevisiae* Rad27 is distinct from DNA mismatch repair. **Cell** 88, 253-263.

Tishkoff, D.X., Amin, N.S., Viars, C.S., Arden, K.C. and Kolodner, R.D. (1998) : Identification of a human gene encoding a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Exo1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination. **Cancer Res** 58, 5027-5031.

Toney, J.H., Donahue, B.A., Kellett, P.J., Bruhn, S.L., Essigmann, J.M. and Lippard, S.J. (1989) : Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Prog Natl Acad Sci USA** 86, 8328-8332.

Tran, H.T., Gordenin, D.A. and Resnick, M.A. (1999) : The 3'→5' exonucleases of DNA polymerase δ and ϵ and the 5'→3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 19, 2000-2007.

Tran, P.T. and Liskay, R.M. (2000) : Functional studies on the candidate ATPase domains of *Saccharomyces cerevisiae* MutL α . **Mol Cell Biol** 20, 6390-6398.

Treiber, D.K., Zhai, X., Jantzen, H.M. and Essigmann, J.M. (1994) : Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 5672-5676.

Trimmer, E.E., Zamble, D.B., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1998) : Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. **Biochemistry** 37, 352-362.

Tsutakawa, S.E., Jingami, H. and Morikawa, K. (1999) : Recognition of a T/G mismatch : the crystal structure of very short repair endonuclease in complex with a DNA duplex. **Cell** 99, 615-623.

Turchi, J.J. and Henkels, K. (1996) : Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. **J Biol Chem** 271, 13861-13867.

Turchi, J.J., Patrick, S.M. and Henkels, K.M. (1997) : Mechanism of DNA-dependent protein kinase inhibition by *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-damaged DNA. **Biochemistry** 36, 7586-7593.

Turchi, J.J., Henkels, K.M. and Zhou, Y. (2000) : Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. **Nucleic Acids Res** 28, 4634-4641.

Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N.W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L. and Chen, J. (1994) : Human DNA helicase II : a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. **EMBO J** 13, 4991-5001.

Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J. and Ashworth, A. (2001) : Mutation in BRCA2 stimulates error-prone hology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. **EMBO J** 17, 4704-4716.

Umar, A., Buermeier, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M. and Kunkel, T.A. (1996) : Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell** 87, 65-73.

Umar, A., Risinger, J.I., Glaab, W.E., Tindall, K.R., Barrett, J.C. and Kunkel, T.A. (1998) : Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. **Genetics** 148, 1637-1646.

Umezū, K., Sugawara, N., Chen, C., Haber, J.E. and Kolodner, R.D. (1998) : Genetic analysis of yeast Rpa1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. **Genetics** 148, 989-1005.

Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J. and Razin, A. (1982) : The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. **FEBS Lett** 146, 148-152.

Vaisman, A. and Chaney, S.G. (1995) : Induction of UV-damage recognition protein by cisplatin treatment. **Biochemistry** 34, 105-114.

Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C. and Chaney, S.G. (1998) : The role of hMLH1, hMSH3 and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance : correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. **Cancer Res** 58, 3579-3585.

Vaisman, A., Lim, S.E., Patrick, S.M., Copeland, W.C., Hinkle, D.C., Turchi, J.J. and Chaney, S.G. (1999) : Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. **Biochemistry** 38, 11026-11039.

Vaisman, A. and Chaney, S.G. (2000) : The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta. **J Biol Chem** 275, 13017-13025.

Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F. and Chaney, S.G. (2000) : Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. **Biochemistry** 39, 4575-4580.

Van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A. and West, S.C. (1999) : Binding of double-strand breaks in DNA by human RAD52 protein. **Nature** 398, 728-731.

Van Garderen, C.J. and Van Houte, L.P. (1994) : The solution structure of a DNA duplex containing the *cis*-Pt(NH₃)₂[d(-GTG-)-N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics. **Eur J Biochem** 225, 1169-1170.

Verhoeven, E.E., Wyman, C., Moolenaar, G.F. and Goosen, N. (2002) : The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands. **EMBO J** 21, 4196-4205.

Vichi, P., Coin, F., Renaud, J.P., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Moras, D. and Egly, J.M. (1997) : Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. **EMBO J** 16, 7444-7456.

Viel, A., Petronzelli, F., Della Puppa, L., Lucci-Cordisco, E., Fornasarig, M., Pucciarelli, S., Rovella, V., Quaia, M., Ponz de Leon, M., Boiocchi, M. and Genuardi, M. (2002) : Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the *mlh1* gene. **Hum Mutat** 20, 368-374.

Villani, G., Hubscher, U. and Butour, J.L. (1988) : Sites of termination of *in vitro* DNA synthesis on *cis*-diamminedichloroplatinum (II) treated single-stranded DNA : a comparison between *E. coli* DNA polymerase I and eucaryotic DNA polymerase alpha. **Nucleic Acids Res** 16, 4407-4418.

Villani, G., Pillaire, M.J. and Boehmer, P.E. (1994) : Effect of the major DNA adduct of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) on the activity of a helicase essential for DNA replication, the *Herpes simplex* virus type-1 origin-binding protein. **J Biol Chem** 269, 21676-21681.

Villani, G. and Tanguy le Gac, N. (2000) : Interactions of DNA hélicases with damaged DNA : possible biological consequences. **J Biol Chem** 275, 33185-33188.

Visse, R., de Ruitjer, M., Brouwer, J., Brandsma, J.A. and van de Putte, P. (1991) : Uvr excision repair protein complex of *Escherichia coli* binds to the convex side of a cisplatin-induced kink in the DNA. **J Biol Chem** 266, 7609-7617.

Viswanathan, M. and Lovett, S.T. (1999) : Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3'→5' DNase and DNA superfamilly member involved in DNA repair. **J Biol Chem** 274, 30094-30100.

Viswanathan, M., Burdett, V., Baitinger, C., Modrich, P. and Lovett, S.T. (2001) : Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 276, 31053-31058.

Vos, J.M. and Wauthier, E.L. (1991) : Differential introduction of DNA damage and repair in mammalian genes transcribed by RNA polymerises I and II. **Mol Cell Biol** 11, 2245-2252.

Waga, S. and Stillman, B. (1994) : Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. **Nature** 369, 207-212.

Wang, T.F., Kleckner, N. and Hunter, N. (1999)^a : Functional specificity of MutL homologs in yeast : evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. **Prog Natl Acad Sci USA** 96, 13914-13919.

Wang, H., Lawrence, C.W., Li, G.M. and Hays, J.B. (1999)^b : Specific binding of human MSH2/MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. **J Biol Chem** 274, 16894-16900.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. and Qin, J. (2000) : BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes Dev** 14, 927-939.

Wang, Q., Zhang, H., Guerrette, S., Chen, J., Mazurek, A., Wilson, T., Slupianek, A., Skorski, T., Fishel, R. and Greene, M.I. (2001) : Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. **Oncogene** 20, 4640-4649.

Webster, G.D., Sanderson, M.R., Skelly, J.V., Neidle, S., Swann, P.F., Li, B.F. and Tickle, I.J. (1990) : Crystal structure and sequence-dependent conformation of the A/G mispaired oligonucleotide d(CGCAAGCTGGCG). **Prog Natl Acad Sci USA** 87, 6693-6697.

Wei, M., Burenkova, O. and Lippard, S.J. (2003) : Cisplatin sensitivity in Hmbg1^{-/-} and Hmbg1^{+/+} mouse cells. **J Biol Chem** 278, 1769-1773.

Welsh, K.M., Lu A.L., Clark, S. and Modrich, P. (1987) : Isolation and characterisation of the *Escherichia coli mutH* gene product. **J Biol Chem** 262, 15624-15629.

Wiebauer, K. and Jiricny, J. (1989) : *In vitro* correction of G/T mispairs to G/C pairs in nuclear extracts from human cells. **Nature** 339 p 234-236.

Wiebauer, K. and Jiricny, J. (1990) : Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase β mediate the correction of G/T mispairs in nuclear extracts from human cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 5842-5845.

Wilson, T., Guerrette, S. and Fishel, R. (1999) : Dissociation of mismatch recognition and ATPase activity by hMSH2/hMSH3. **J Biol Chem** 274, 21659-21664.

Winand, N.J., Panzer, J.A. and Kolodner, R.D. (1998) : Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae msh5* gene. **Genomics** 53, 69-80.

Wood, R.D. (1996) : DNA repair in eukaryotes. **Annu Rev Biochem** 65, 135-167.

Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J. and Lindahl, T. (2001) : Human DNA Repair Genes. **Science** 291, 1284-1289.

- Worth, L. Jr., Clark, S., Radman, M. and Modrich, P. (1994) : Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. **Prog Natl Acad Sci USA** 91, 3238-3241.
- Worth Jr., L., Bader, T., Yang, J. and Clark, S. (1998) : Role of MutS ATPase activity in MutS,L-dependent block of *in vitro* strand transfer. **J Biol Chem** 273, 23176-23182.
- Woynarowski, J.M., Chapman, W.G., Napier, C., Herzig, M.C. and Juniewicz, P.E. (1998) : Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. **Mol Pharmacol** 54, 770-777.
- Woynarowski, J.M., Faivre, S., Herzig, M.C., Arnett, B., Chapman, W.G., Trevino, A.V., Raymond, E., Chaney, S.G., Vaisman, A., Varchenko, M. and Juniewicz, P.E. (2000) : Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. **Mol Pharmacol** 58, 920-927.
- Wu, T.H. and Marinus, M.G. (1994) : Dominant negative mutator mutations in the *mutS* gene of *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 176, 5393-5400.
- Wu, X., Li, J., Li, X., Hsieh, C.L., Burgers, P.M. and Lieber, M.R. (1996) : Processing of branched DNA intermediates by a complex of human FEN-1 and PCNA. **Nucleic Acids Res** 24, 2036-2043.
- Wu, X., Wilson, T.E. and Lieber M.R. (1999) : A role for FEN-1 in nonhomologous DNA end joining : the order of strand annealing and nucleolytic processing events. **Proc Natl Acad Sci USA** 96, 1303-8.
- Wu, T.H., Loh, T. and Marinus, M.G. (2002) : The function of Asp70, Glu77 and Lys79 in the *Escherichia coli* MthH protein. **Nucleic Acids Res** 30, 818-822.
- Wyatt, M.D., Allan, J.M., Lau, A.Y., Ellenberger, T.E. and Samson, L.D. (1999) : 3-methyladenine DNA glycosylases : structure, function and biological importance. **Bioessays** 21, 668-676.
- Wyrzykowski, J. and Volkert, M.R. (2003) : The *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair system repairs base pairs containing oxidative lesions. **J Bacteriol** 185, 1701-1704.
- Xie, Y., Liu, Y., Argueso, J.L., Henricksen, L.A., Kao, H.I., Bambara, R.A. and Alani, E. (2001) : Identification of *rad27* mutations that confer differential defects in mutation avoidance, repeat tract instability and flap cleavage. **Mol Cell Biol** 21, 4889-4899.

Xu, X., Weaver, Z., Linke, S.P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.W., Harris, C.C., Ried, T. and Deng, C.X. (1999) : Centrosome amplification and a defective G₂-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in *brca1* exon 11 isoform-deficient cells. **Mol Cell** 3, 389-395.

Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. and Karran, P. (1997) : Selective recognition of a cisplatin–DNA adduct by human mismatch repair proteins. **Nucleic Acids Res** 25, 491–495.

Yamaguchi, M., Dao, V. and Modrich, P. (1998) : MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. **J Biol Chem** 273, 9197-9201.

Yamamoto, A., Schoffeld, M.J., Biswas, I. and Hsieh, P. (2000) : Requirement for Phe36 for DNA binding and mismatch repair *Escherichia coli* by MutS protein. **Nucleic Acids Res** 28, 3564-3569.

Yaneva, J., Leuba, S.H., van Holde, K. and Zlatanova, J. (1997) : The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to *cis*-platinum-damaged DNA. **Prog Natl Acad Sci USA**, 13448-13451.

Yang, D., van Boom, SS, Reedijk, J., van Boom, J.H. and Wang, A.H. (1995) : Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin- cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis. **Biochemistry** 34, 12912.12920.

Yang, W. (2000) : Structure and function of mismatch repair proteins. **Mutat Res** 460, 245-256.

Yarema, K.J., Wilson, J.M., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1994) : Effects of DNA adduct structure and distribution on the mutagenicity and genotoxicity of two platinum anticancer drugs. **J Mol Biol** 236, 1034-1048.

Yarema, K.J., Lippard, S.J. and Essigmann, J.M. (1995) : Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Nucleic Acids Res** 23, 4066-4072.

Zamble, D.B. and Lippard, S.J. (1995) : Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. **Trends Biochem Sci** 20, 435-439.

Zamble, D.B., Mu, D., Reardon, J.T., Sancar, A. and Lippard, S.J. (1996) : Repair of cisplatin/DNA adducts by the mammalian excision nuclease. **Biochemistry** 35, 10004-10013.

Zamble, D.B., Jacks, T. and Lippard, S.J. (1998) : p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. **Prog Natl Acad Sci USA** 95, 6163-6168.

Zamble, D.B. and Lippard, S.J. (1999) : The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA from **Cisplatin : chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**, p 73-110. Edited by B. Lippert. Verlag helvetica Chemica Acta, Zürich, Switzerland.

Zdraveski, Z.Z., Mello, J.A., Marinus, M.G. and Essigmann, J.M. (2000) : Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. **Chem. Biol** 7, 39-50.

Zdraveski, Z.Z., Mello, J.A., Farinelli, C.K., Essigmann, J.M. and Marinus, M.G. (2002) : MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. **J Biol Chem** 277, 1255-1260.

Zell, R. and Fritz, H.J. (1987) : DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methylcytosine residues. **EMBO J** 6, 1809-1815.

Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B.L. and El-Deiry, W.S. (1998) : BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. **Oncogene** 16, 1713-1721.

Zhang, Q.M., Ishikawa, N., Nakahara, T. and Yonei, S. (1998) : *Escherichia coli* MutY protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine/guanine mispair to prevent spontaneous G:C-->C:G transversions. **Nucleic Acids Res** 26, 4669-4675.

Zoumpourlis, V., Kerr, D.J. and Spandidos, D.A. (1992) : Carboplatin as opposed to cisplatin does not stimulate the expression of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequences. **Biochem Pharmacol** 43, 650-654.

Mécanisme d'action de la drogue anticancéreuse *cis*-dichlorodiammineplatine (II) : étude de l'interaction entre les protéines de réparation des mésappariements et l'ADN platiné

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) est impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine, puissante drogue anticancéreuse qui interagit avec l'ADN. Nous avons étudié *in vitro* certaines étapes clé des mécanismes moléculaires qui relient le fonctionnement du système de réparation MMR avec la cytotoxicité de cette drogue.

Notre étude s'est focalisée sur l'interaction entre l'ADN platiné et la protéine MutS du système MMR impliquée dans les étapes d'initiation de la réparation. Trois points ont été abordés dans cette étude : i) la reconnaissance par MutS des lésions du cisplatine et des composés de lésion du cisplatine (formés lorsqu'une base non complémentaire est incorporée en face de l'une des deux purines pontées par le platine) ii) l'étape d'initiation de la réparation régulée par la fixation d'ATP et d'ADP par la protéine MutS iii) l'étude d'un dérivé du cisplatine (DACH-platine) ne présentant pas de résistance croisée avec le cisplatine.

Les principaux résultats ont été obtenus par des techniques électrophorétiques et par résonance plasmonique de surface. Notre étude montre que MutS joue le rôle d'un senseur des lésions du cisplatine et que l'ADN platiné peut jouer le rôle d'un cofacteur dans la régulation biochimique de l'activité de MutS en présence de nucléotides régulateurs. Nos résultats suggèrent que les composés de lésion des adduits majoritaires du cisplatine pourraient être les lésions critiques impliquées dans la cytotoxicité du cisplatine *via* le système MMR.

Molecular mechanism of the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) : Study of the interaction of the DNA mismatch repair protein MutS and cisplatin-modified DNA.

The DNA mismatch repair (MMR) system is involved in mediating the cytotoxicity of the anticancer drug cisplatin that interacts with DNA. We have studied *in vitro* some fundamental stages of molecular mechanisms linking MMR system and cisplatin cytotoxicity.

Our study investigated the interaction of MMR system MutS protein implicated in repair initiation with platinated DNA. More precisely, we are interested in : i) recognition by MutS of cisplatin cross-links and cisplatin compound lesions (with cisplatin 1,2-intrastrand cross-link on one strand and a non-complementary base opposite one of the adducted purines) ii) repair initiation modulated by the nucleotides ADP and ATP binding by MutS iii) study of a platinum compound (DACH-platin) having no cross-resistance with cisplatin.

Main results obtained by electrophoretic and surface plasmon resonance techniques show the ability of MutS to sense differentially various platinated DNA substrates and that platinated DNA may play a cofactor role in the biochemical regulation of MutS activity in presence of nucleotides. Our results suggest that cisplatin major intrastrand 1,2-d(GpG) compound lesions are probably critical in determining MMR-mediated cisplatin cytotoxicity.

Discipline : Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie

MOTS-CLES : système de réparation des mésappariements, ADN, protéine MutS, cisplatine, drogue anticancéreuse

Centre de Biophysique Moléculaire
CNRS UPR 4301
rue Charles-Sadron
45071 Orléans cedex 2 (France)