



**HAL**  
open science

# Effets du peptide Amyloïde- $\beta$ , caractéristique de la maladie d'Alzheimer, sur les systèmes de réparation de l'ADN

Anne Forestier

► **To cite this version:**

Anne Forestier. Effets du peptide Amyloïde- $\beta$ , caractéristique de la maladie d'Alzheimer, sur les systèmes de réparation de l'ADN. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV067 . tel-00680083

**HAL Id: tel-00680083**

**<https://theses.hal.science/tel-00680083v1>**

Submitted on 17 Mar 2012

**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**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE  
GRENOBLE**

Spécialité : **Neurobiologie/Neurosciences**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Anne FORESTIER**

Thèse dirigée par le Dr **Thierry DOUKI** et  
codirigée par le Dr **Walid RACHIDI**

préparée au sein du **Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques**  
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

**Effets du peptide Amyloïde- $\beta$ ,  
caractéristique de la maladie  
d'Alzheimer, sur les systèmes de  
réparation de l'ADN.**

Thèse soutenue publiquement le « **21 octobre 2011** »,  
devant le jury composé de :

**Pr Patrice MARCHE** – *Président du jury*  
Institut Albert Bonniot, Grenoble

**Dr Marie GALLAS** – *Rapporteur*  
Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Lille

**Dr J. Pablo RADICELLA** – *Rapporteur*  
Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Fontenay-aux-Roses

**Pr Sylvain LEHMANN** – *Examineur*  
Institut de Génétique Humaine, Montpellier

**Pr Alain BUISSON** – *Examineur*  
Institut des Neurosciences, Grenoble



<b>Liste des abréviations</b> .....	5
<b>Avant propos</b> .....	7
<b>Chapitre I : Etude Bibliographique</b> .....	9
I. L'ADN, ses lésions et sa réparation .....	9
A. La molécule support de l'information génétique .....	9
B. Les attaques subies par la molécule d'ADN et les dommages occasionnés .....	10
1. Les sources endogènes et lésions associées.....	10
2. Les sources exogènes et lésions associées.....	15
3. Conséquences des lésions de l'ADN .....	17
C. Les voies de réparation.....	24
1. La réparation par excision de base (BER) .....	27
2. La réparation par excision de nucléotides (NER) .....	34
3. La réparation des cassures double brin .....	38
4. La réparation des mésappariements (MMR) .....	42
5. La réparation par réversion directe (DDR).....	43
6. Les pathologies associées à une déficience des systèmes de réparation de l'ADN .....	43
II. La maladie d'Alzheimer .....	49
A. L'organe touché par la maladie d'Alzheimer .....	49
1. Le cerveau : organisation et fonctions .....	49
2. Les cellules du cerveau .....	54
B. La maladie d'Alzheimer : signes cliniques et prévalence .....	58
C. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	60
D. Etiologie de la maladie d'Alzheimer .....	63
1. Découverte de la maladie et première mise en évidence de lésions cérébrales spécifiques.....	63
2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer .....	63
3. Le rôle du stress oxydant dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer ..	71
4. Lien entre dommages à l'ADN et apoptose dans les neurones .....	73
III. Déficience des systèmes de réparation et maladie d'Alzheimer.....	74
<b>Objectifs</b> .....	77
<b>Chapitre II : Résultats</b> .....	79
I. La lignée APP751, représentative de la maladie d'Alzheimer ? .....	79
A. Introduction .....	79
B. Résultats .....	82
1. Cinétique de production d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 par la lignée APP751 .....	82
2. Evaluation de la cytotoxicité engendrée par un stress oxydant ou métallique 84	
3. Mesure du niveau de ROS au sein des deux lignées .....	86
4. Quantification de la délétion commune de l'ADN mitochondrial des lignées mock et APP751 .....	88
5. Détection des lésions oxydatives au niveau de l'ADN nucléaire des deux lignées 90	
C. Conclusion .....	94
II. La sécrétion du peptide A $\beta$ entraîne une dérégulation du BER .....	97
A. Introduction .....	97
B. Résultats .....	99
1. Effets du peptide A $\beta$ sur l'expression des gènes du BER .....	99
2. Analyse de l'expression des protéines du BER.....	103

3.	Evaluation de la capacité d'excision de la 8oxoG dans un substrat d'ADN génomique.....	105
4.	Mesure de la capacité d'excision de petites bases endommagées par l'utilisation d'un test multiplexé : la biopuce oligonucléotidique .....	108
C.	Conclusion .....	112
III.	Surexpression du NER chez la lignée APP751 après un stress oxydant.....	115
A.	Introduction .....	115
B.	Résultats .....	116
1.	Evolution de la viabilité et du potentiel clonogénique engendrés par les UVC au sein des deux lignées .....	116
2.	Comparaison des profils d'expression des gènes du NER à l'état basal entre la lignée APP751 et la lignée mock .....	119
3.	Comparaison des profils d'expression des gènes du NER à l'issue d'un stress oxydant ou d'un stress UVC .....	120
4.	Mesure de l'activité d'excision des photoproduits par les extraits protéiques des lignées mock et APP751.....	122
5.	Cinétique de réparation des photoproduits .....	125
C.	Conclusion .....	127
IV.	Etat des autres systèmes de réparation en présence d'A $\beta$ .....	129
A.	Introduction .....	129
B.	Résultats .....	129
1.	Modulation des gènes de l'HR et du NHEJ (figure 45) .....	129
2.	Modulation des gènes du MMR (figure 46).....	132
C.	Conclusion .....	133
	<b>Chapitre III : Discussion générale.....</b>	<b>135</b>
	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>153</b>
	<b>Chapitre IV : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>157</b>
I.	Culture cellulaire .....	157
A.	Produits et matériel.....	157
B.	Culture des lignées de neuroblastome humain .....	158
C.	Congélation de cellules .....	158
D.	Quantification des isoformes d'A $\beta$ sécrétées dans le milieu de culture .....	159
E.	Test de cytotoxicité après traitement par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ou CuSO <sub>4</sub> .....	159
F.	Tests de cytotoxicité et de clonogénicité après expositions aux UVC.....	160
G.	Préparation de cellules traitées sous la forme de culots secs ou conservés dans du milieu de congélation .....	161
II.	Evaluation du stress oxydant et des dommages à l'ADN .....	162
A.	Mesure des ROS par cytométrie en flux.....	162
B.	Evaluation des dommages à l'ADN nucléaire par la technique des comètes ...	162
C.	Evaluation des dommages à l'ADN par spectrométrie de masse.....	164
1.	Extraction et digestion de l'ADN .....	164
2.	Hydrolyse de l'ADN .....	164
D.	Quantification de la délétion commune dans l'ADN mitochondrial.....	165
1.	Préparation du lysat.....	165
2.	Amplification des ADN nucléaire, mitochondrial total et mitochondrial délété par qPCR en temps réel.....	165
III.	Evaluation du phénotype réparation de l'ADN .....	167
A.	Analyse de l'expression des gènes de réparation de l'ADN .....	167
1.	Extraction d'ARNm et contrôle qualité.....	167
2.	<i>Reverse transcription</i> .....	168



3.	PCR quantitative en temps réel .....	168
B.	Mesure de l'expression et de l'activité des protéines du BER.....	171
1.	Extraits nucléaires.....	171
2.	Dosage de protéines.....	172
3.	Mesure de l'expression des protéines.....	173
C.	Test de réparation sur biopuce oligonucléotidique (puce oligo) .....	174
1.	Dépôt des ODN « support ».....	174
2.	Hybridation des duplexes d'ADN .....	175
3.	La réaction d'excision sur le support à partir d'extrait .....	176
D.	Test de réparation basé sur la technique des comètes .....	176
1.	Préparation du substrat génomique lésé .....	176
2.	Préparation des extraits totaux .....	177
3.	Mesure des capacités de réparation de l'ADN.....	177
<b>Bibliographie</b> .....		183
<b>Annexes</b> .....		197
I.	Article original d'Alois Alzheimer (1907) traduit en français.....	197
II.	Communications scientifiques.....	200
III.	Article scientifique .....	201



## Liste des abréviations

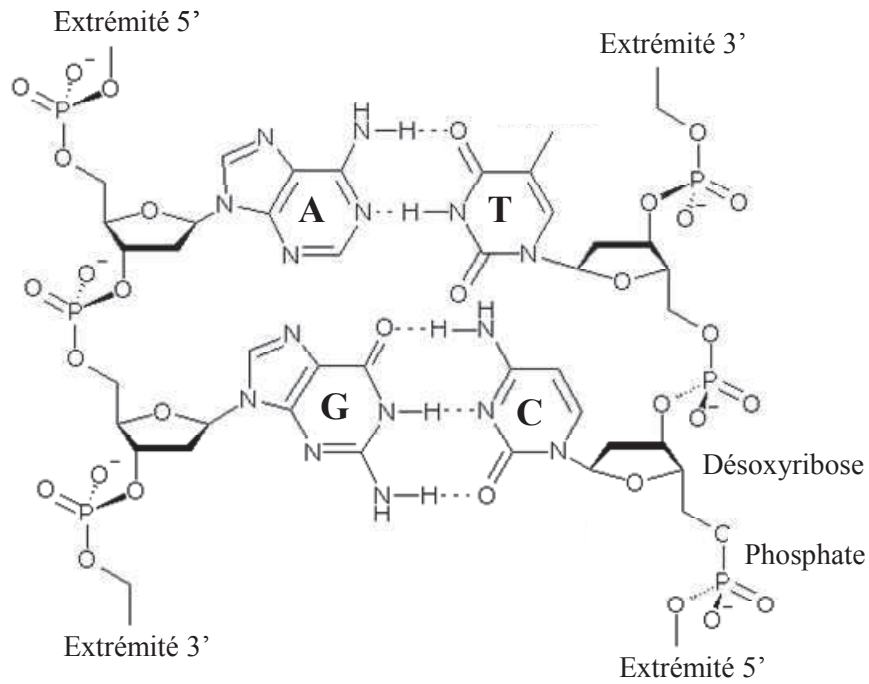
- ·OH : radical hydroxyl
- 4-HNE : 4-hydroxy-2-nonénal
- 5-OH-C : 5-hydroxy-cytosine
- 5-OH-U : 5-hydroxy-uracile
- 6-4 PPs : photoproduits 6-4
- 8oxoA : 7,8 dihydro-8-oxoadénine
- 8oxoG : 7,8 dihydro-8-oxoguanine
- A : adénine
- AD : Alzheimer's Disease
- AND : acide désoxyribonucléique
- AICD : APP intracellular domain
- ALS : amyotrophic lateral sclerosis
- AMP : adenosine monophosphate
- AOA1 : Ataxia with Oculomotor Apraxia 1
- APE1 : apurinic endonuclease 1
- APOE : apolipoprotéine  $\epsilon$
- APP : amyloid precursor protein
- APP<sup>sw</sup> : mutation suédoise (Swedish) de l'APP
- APTX : aprataxine
- ARN : acide ribonucléique
- ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*
- ATR : *Ataxia Telangiectasia Related*
- A $\beta$  : peptide amyloïde- $\beta$
- BACE :  $\beta$ -amyloid converting enzyme
- BaP : benzo[a]pyrène
- BER : base excision repair, réparation par excision de base
- C : cytosine
- C31 : peptide de 31 acides aminés issu du clivage amyloïdogène de l'APP en C-terminale
- C83 : peptide de 83 acides aminés issu du clivage amyloïdogène de l'APP en C-terminale
- C99 : peptide de 99 acides aminés issu du clivage amyloïdogène de l'APP en C-terminale
- CDK : cyclin-dependant kinase
- CPD : cyclobutane pyrimidi dimer
- CS : Cockayne Syndrome
- DR : direct reversal, reversion directe
- dRP : désoxyribose phosphate
- ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
- fapyA : formamidopyrimidine adénine
- fapyG : formamidopyrimidine guanine
- FEN-1 : flap endonuclease 1
- fpg : formamidopyrimidine glycosylase
- G : guanine
- G0 : growth phase 0, phase de croissance 0 du cycle cellulaire
- G1 : growth phase 1, phase de croissance 1 du cycle cellulaire
- G2 : growth phase 2, phase de croissance 2 du cycle cellulaire
- GG-NER : global-genome NER
- HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
- HR : homologous recombination, recombinaison homologue

- IRM : imagerie par résonance magnétique
- LCR ; liquide céphalo-rachidien
- LP-BER : long patch BER, voie longue du BER
- M : mitosis, phase de mitose du cycle cellulaire
- MMR : mismatch repair, système de réparation des mésappariements
- MMSE : mini-mental state examination
- NER : nucleotide excision repair, réparation par excision de nucléotides
- NFT : Neuro-Fibrillary Tangles
- NHEJ : non homologous end joining, jointure non homologue des extrémités
- O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde
- ODN : oligonucléotide
- PHF : paired-helical filaments
- PS1 : préséniline 1
- PS2 : préséniline 2
- RF-C : replication factor C
- RMN : complexe Rad50, MRE11, NBS1
- ROS : reactive oxygen species, espèces réactives de l'oxygène
- RPA : replication protein A
- S : synthesis, phase de synthèse du cycle cellulaire
- SAM : S-adenosylmethionine
- SP-BER : short patch BER,
- SSB : single strand break, cassure simple brin
- T : thymine
- TC-NER : transcription-coupled NER
- TEMP : tomographie par émission monophotonique
- TEP : tomographie par émission de positons
- TTD : trichothiodystrophie
- UV : ultraviolet
- XP : *xeroderma pigmentosum*

## Avant propos

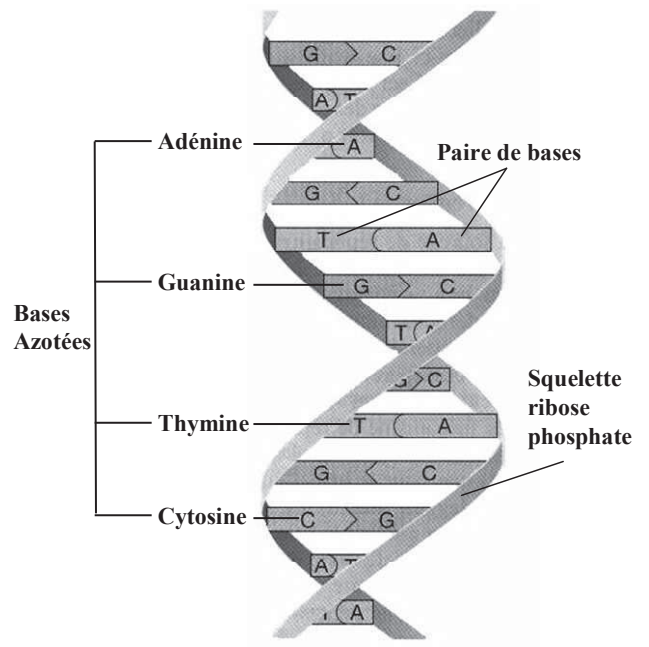
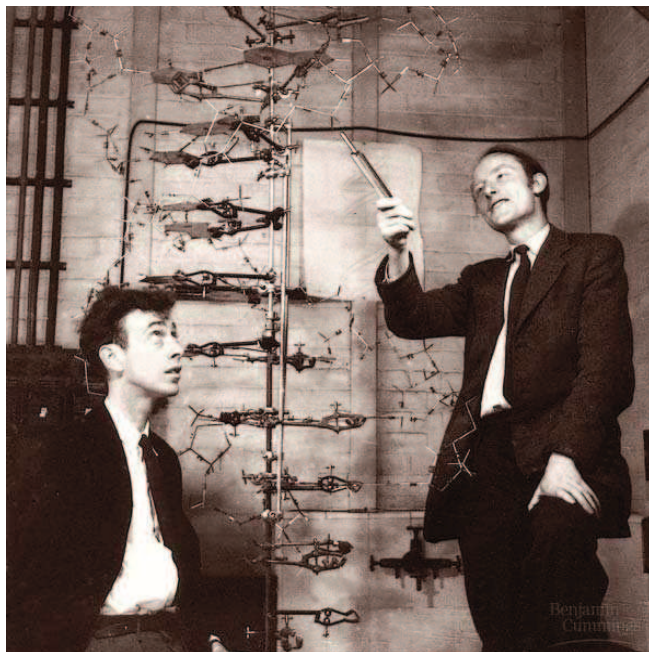
L'ADN n'est pas une molécule fragile. C'est toutefois une molécule réactive, constamment soumise à diverses agressions, d'origines endogènes ou exogènes, chimiques ou physiques, susceptibles de modifier l'information génétique qu'elle contient. Pour y remédier, il existe toute une batterie de systèmes de réparation qui veillent à la restauration de la séquence initiale. Bien souvent, les déficiences au niveau des systèmes de réparation de l'ADN sont associées à la cancérogénèse car elles laissent place à des mutations dans le patrimoine génétique de la descendance cellulaire. Pour les neurones qui ne se divisent pas, le problème de la transmission d'aberrations génétiques aux générations de cellules suivantes ne se pose pas. Cependant, il existe une autre conséquence à la non réparation d'un dommage : la mort cellulaire. Cette dernière se produit en excès dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, organe particulièrement sensible au stress oxydant. Le lien entre dommage à l'ADN, réparation et apoptose dans l'étiologie de cette maladie multifactorielle est donc à prendre en considération.

Les effets du peptide A $\beta$ , caractéristique de la maladie d'Alzheimer et aux nombreuses propriétés neurotoxiques, sur les systèmes de réparation de l'ADN constituera l'axe de recherche principal de ce travail.



**Figure 1 : Structure des bases azotées et de la chaîne désoxyribose-phosphate.**

Enchaînement de 5' en 3' des bases puriques Adénine (A) et Guanine (G) à gauche, et des bases pyrimidiques Cytosine (C) et Thymine (T) à droite. Au centre, les liaisons de Watson-Crick (liaisons hydrogène) entre les paires de bases (A-T ou G-C).



**Figure 2 : La double hélice d'ADN.**

Watson et Crick devant leur modèle de double hélice d'ADN en 1953, et la représentation schématisée de la structure hélicoïdale.

## Chapitre I : Etude Bibliographique

### I. L'ADN, ses lésions et sa réparation

#### A. La molécule support de l'information génétique

En 1865, lorsque le moine et botaniste Gregor J. Mendel publie le résultat de ses expériences de croisements de petits pois (Jay 2001), réalisées dans le jardin du monastère de Brunn, et conclut qu'il existe une notion de caractères héréditaires partiellement transmissibles d'une génération à l'autre, il ne se doute pas que l'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de cette hérédité. L'ADN est découvert peu d'années plus tard : en 1869, le physicien/biologiste suisse Friedrich Miescher, travaillant sur la composition chimique des leucocytes, remarque la présence d'un précipité blanc d'une substance inconnue (riche en phosphore, ni protéique ni lipidique) qu'il appelle alors nucléine puisqu'isolée à partir du noyau des cellules sanguines en question (Dahm 2008). Les découvertes autour de la structure de l'ADN se succèdent au cours de la première partie du XXème siècle, mais c'est seulement en 1944 qu'Avery, MacLeod et Mc Carty (Avery *et al.* 1944) suggèrent que l'ADN est le support de l'hérédité, hypothèse confirmée en 1952 par Hershey et Chase (Hershey *et al.* 1952). S'appuyant sur les analyses aux rayons X de Franklin (Franklin *et al.* 1953) et Wilkins (Wilkins *et al.* 1953), Watson et Crick résolvent la structure de l'ADN (voir figures 1 et 2). Ils proposent un modèle en double hélice, où des liaisons hydrogènes relient les deux brins d'ADN, de manière spécifique entre une adénine et une thymine ou une guanine et une cytosine (Watson *et al.* 1953). En 1958 Meselson et Stahl démontrent le mode semi-conservatif de la réplication de l'ADN (Meselson *et al.* 1958). Les découvertes autour de l'ADN ont constitué et constituent toujours des avancées considérables pour la science.

L'ADN, assisté de l'épigénome, contient toutes les informations nécessaires à une cellule pour son développement et son fonctionnement. Il assure deux fonctions fondamentales :

la synthèse des protéines, qui participent à tous les processus biologiques, et la transmission fidèle de l'information génétique. La propagation de la vie dépend de l'intégrité chimique du polymère héréditaire qu'est l'ADN. Cependant, ce dernier est une molécule réactive et peut être endommagé par de nombreux agents. D'origine exogène ou endogène, ces agents conduisent à l'apparition de lésions dans le génome qui peuvent avoir des conséquences sévères au niveau cellulaire. On estime qu'il se produit environ 10 000 lésions par cellule et par jour (Friedberg *et al.* 2006). Les modifications de l'ADN peuvent engendrer des mutations qui altèrent la séquence de nucléotides et conduisent à l'apparition de cancers chez les mammifères. D'autres lésions interfèrent avec les processus cellulaires tels que la réplication et la transcription et s'avèrent délétères pour la cellule (Scharer 2003).

Dans le paragraphe qui suit, nous nous intéresserons aux différentes sources d'agents génotoxiques et aux différentes lésions qu'elles engendrent. Puis nous étudierons les conséquences de ces dommages pour l'organisme.

## **B. Les attaques subies par la molécule d'ADN et les dommages occasionnés**

### **1. Les sources endogènes et lésions associées**

#### **a) Produits du métabolisme cellulaire normal**

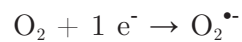
Le métabolisme cellulaire lui-même est susceptible d'endommager l'ADN. Ici réside ce que l'on nomme parfois le paradoxe de la vie en aérobie (Davies 1995). En effet, si tout eucaryote à l'exception des plantes a besoin de l'oxygène pour vivre, ce dernier peut également constituer un danger pour son hôte. Certains travaux estiment que l'ADN subirait plus de 1000 attaques oxydatives par cellule et par jour (Bernstein *et al.* 1989). Ce danger, que l'on qualifie de **stress oxydant**, est du à un déséquilibre entre la production et la destruction des espèces réactives de l'oxygène (**ROS**, reactive oxygen



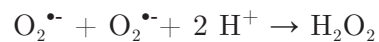
species), intermédiaires réactionnels de la phosphorylation oxydative ou chaîne respiratoire. Cette dernière est le siège de la production d'énergie et d'eau par la cellule, à partir de l'oxygène respiré, via 5 complexes successifs de protéines membranaires localisés dans la membrane mitochondriale interne (Shoffner 1997). Plus particulièrement, au cours de la réaction catalysée par la cytochrome oxydase du complexe IV, l'oxygène subit une réduction tétravalente aboutissant à la production d'eau :



Il arrive qu'une partie de cet oxygène (2 à 5 %) échappe à cette réaction et subisse plutôt une réduction monovalente, au niveau de l'ubiquinone du complexe I ou III (Brand 2010), conduisant à la formation de l'un des ROS, l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) :



L'anion super-oxyde ne réagit pas directement avec l'ADN, mais peut subir une dismutation par la super-oxyde dismutase (SOD) et conduire à la production d'un autre ROS, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), un oxydant faible et peu réactif en l'absence de métaux de transition :



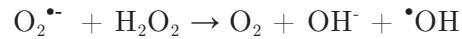
Cependant, en présence de Cuivre cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) ou de Fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut se décomposer et donner lieu, via la fameuse réaction de Fenton, à la formation du radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ), espèce hautement réactive :



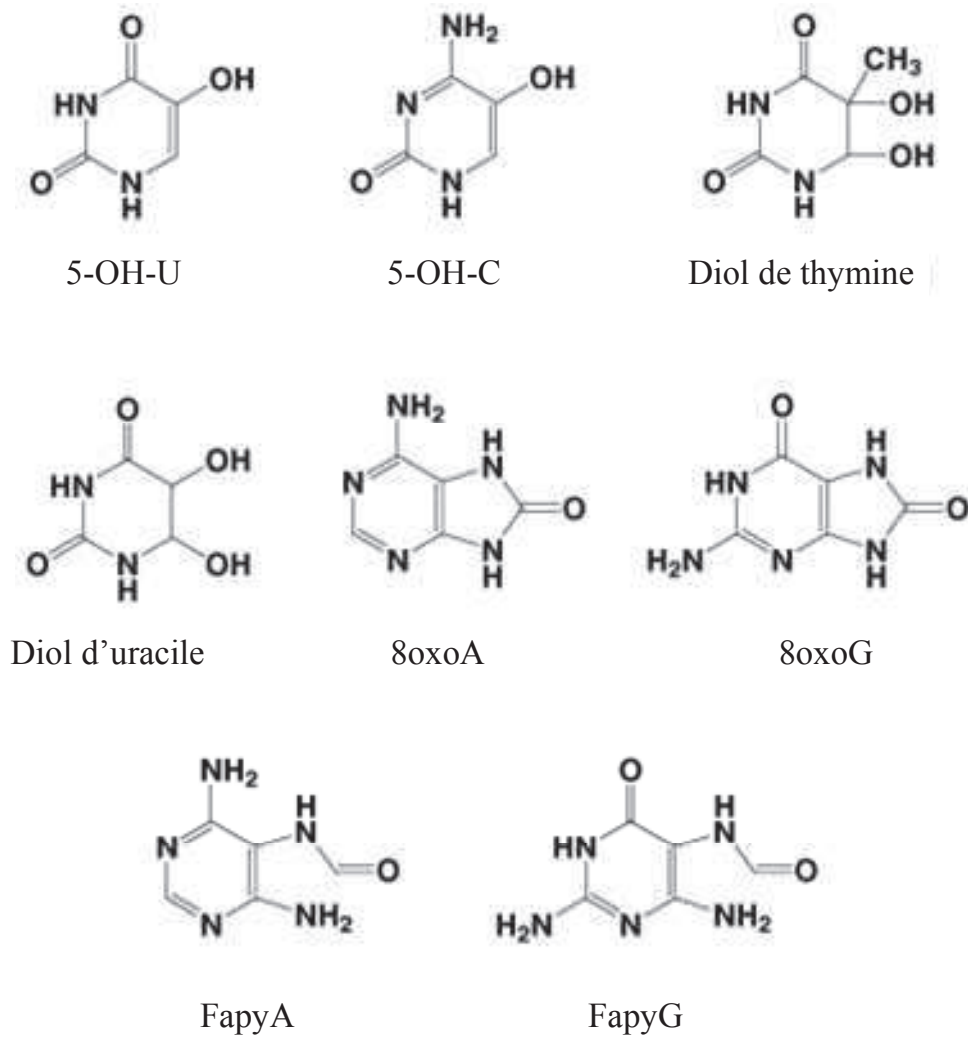
ou



Au cours de la réaction d'Haber-Weiss, qui met en jeu une dismutation différente de celle de Fenton, on observe également la formation d' $\bullet\text{OH}$ , à partir d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ , en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  :



Les **dommages oxydatifs** engendrés par la réaction des ROS sur l'ADN sont de nature variable et leur rendement relatif dépend de la nature des espèces oxydantes (Frelon *et al.* 2003). Comme précisé plus haut,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne réagissent pas ou peu avec l'ADN.  $\bullet\text{OH}$  quant à lui est à l'origine de modifications multiples dans la molécule d'ADN. En attaquant la partie désoxyribose, il génère une **cassure de brin** ou un simple **site abasique**. Par ailleurs,  $\bullet\text{OH}$  est capable de réagir avec toutes les bases de l'ADN et à différentes positions du cycle purique ou pyrimidique. Il engendre la formation de 60 bases modifiées parmi lesquelles les **diols de thymine**, les **diols d'uracile**, la 5-hydroxy-uracile (**5-OH-U**), l'hydroxy-cytosine (**5-OH-C**) en ce qui concerne les bases pyrimidiques. Pour les modifications de bases puriques citons les formamidopyrimidines (**fapyA** et **fapyG**) ainsi que la 8oxoAdénine (**8oxoA**) et la 8oxoGuanine (**8oxoG**) (figure 3).



**Figure 3 : Structure chimique de quelques bases oxydées de l'ADN**  
(5-OH-U : 5-hydroxy-uracile ; 5-OH-C : 5-hydroxy-cytosine ; 8oxoA : 8-oxo-adénine ; 8-oxo-G : 8-oxo-Guanine ; FapyA : formamidopyrimidine-adénine ; FapyG : formamidopyrimidine-guanine).

Dotée du plus faible potentiel d'ionisation parmi les constituants de l'ADN, la Guanine est la cible privilégiée des ROS (mis à part  $\bullet\text{OH}$  qui s'attaque à toutes les bases sans distinction). La 8oxoG résulte non seulement de l'action d' $\bullet\text{OH}$  sur une guanine mais aussi d'autres mécanismes de formation, comme les réactions d'oxydations à un électron ou les attaques par l'oxygène singulet, autre ROS. La 8oxoG est de ce fait généralement considérée comme la lésion oxydative prédominante (Cadet *et al.* 2010).

Outre les cassures de brin, les sites abasiques et de nombreuses bases oxydées, un autre groupe de lésions, considérées comme des lésions plus volumineuses, peut également être induit par les ROS. En effet, une base purique peut établir une liaison covalente soit avec le désoxyribose au sein d'un même nucléotide soit avec une pyrimidine adjacente pour donner respectivement naissance à une **cyclopurine** ou un **pontage intra-brin** de deux nucléotides voisins (Chatgililoglu *et al.* 2011). Finalement,  $\bullet\text{OH}$  et les réactions d'oxydations à un électron sont capables d'induire la formation de deux modifications adjacentes, mais indépendantes, non reliées par une liaison covalente, dites **lésions tandem** dont la présence a pu être établie au sein de l'ADN isolé (Bergeron *et al.* 2010). Par ailleurs au sein d'oligonucléotides, la formation de 8oxoG impliquée dans une lésion tandem au voisinage d'un résidu formylamine a été établie et représente 10% du taux de 8oxoG produite (Douki *et al.* 2002).

Un autre processus biologique, la peroxydation lipidique, elle-même engendrée par l'augmentation du stress oxydant, entraîne la production d'aldéhydes secondaires comme le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et l'acroléine. Ces derniers forment des adduits volumineux au niveau de la molécule d'ADN (Wang *et al.* 2005).

Enfin, certains cofacteurs de réactions enzymatiques, comme la S-adenosylmethionine (SAM), peuvent méthyler l'ADN de façon non contrôlée et former la 7-méthyladénine, la 7-méthylguanine ou encore la  $O^6$ -méthyl-guanine (Scharer 2003).

## b) Instabilité intrinsèque de l'ADN

Il arrive que les liaisons chimiques au sein de la molécule d'ADN puissent s'altérer spontanément. L'hydrolyse de la liaison glycosidique d'un nucléotide mène à la formation d'un site abasique. Les 4 bases de l'ADN sont concernées par cette éventualité avec toutefois une prédilection pour la Guanine et l'Adénine. Les réactions de désaminations, autre type d'hydrolyse, ayant lieu au niveau des groupes amines exocycliques, convertissent les Cytosine, Adénine, Guanine ou 5-méthyl-Cytosine en Uracile, Hypoxanthine, Xanthine et Thymine respectivement (Hoeijmakers 2001).

Des erreurs au cours de la réplication de l'ADN conduisent à la formation de mésappariements (adénine en face d'une cytosine par exemple) qui ne sont pas des lésions en tant que telles mais constituent une aberration génétique. Un décalage dans le cadre de lecture d'un gène peut également se produire à la suite d'une insertion ou d'une délétion d'un ou plusieurs nucléotides.

La réplication d'une cassure simple-brin ou l'effondrement de la fourche de réplication conduisent à la formation de cassures double-brin.

## 2. Les sources exogènes et lésions associées

De nombreux facteurs environnementaux sont susceptibles de s'attaquer à la molécule d'ADN. Parmi les agents **génétoxicques physiques**, citons d'abord les rayons ultraviolets (UV). Les UVB occasionnent majoritairement des lésions volumineuses (photoproduits), telles que les dimères cyclobutane de pyrimidines (**CPDs**) ou les photoproduits 6-4 (**6-4 PPs**). Dans une moindre mesure, ils peuvent aussi engendrer la formation de petites lésions oxydatives, en générant un stress oxydant, telles la 8oxoG. Les UVA, quant à eux, ont été pendant longtemps associés exclusivement à la formation de dommages oxydatifs (Cadet *et al.* 2005). Cependant une étude a démontré qu'une irradiation par les UVA conduisait à la formation de six fois plus de CPDs que de

8oxoG dans l'ADN de fibroblastes (Courdavault *et al.* 2004). Le rayonnement ionisant engendre des cassures de l'ADN, simple double brin, mais aussi la formation de bases oxydées par effet direct des radiations ou libération d'espèces réactives de l'oxygène, à l'issue de la radiolyse de l'eau.

En ce qui concerne les **généotoxiques chimiques**, des agents de diverses origines réalisent des alkylations au niveau de la molécule d'ADN. Ces alkylations peuvent être directes ou indirectes. Dans ce dernier cas, l'agent génotoxique nécessite une d'être métabolisé au préalable par la cellule afin de pouvoir s'ajouter à l'ADN. Ceci se produit par exemple pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), polluant que l'on retrouve dans la fumée de cigarette. Le métabolite de l'un des HAP les plus nocifs, le benzo-[a]-Pyrène (BaP), réagit alors avec l'ADN pour donner l'adduit volumineux du BaP-diol époxyde (Tarantini *et al.* 2011). Ce genre d'alkylations indirectes se produit également dans le cas du solvant industriel qu'est le chlorure de méthylène, dont le composé actif a la capacité de s'ajouter à l'ADN (Watanabe *et al.* 2007). Le cisplatine en revanche réalise une alkylation directe. Utilisé comme médicament anticancéreux, il donne lieu à l'adduit volumineux du cisplatine fixé sur une base de l'ADN ou peut être à l'origine de liaisons covalentes **intra** ou **inter-brins** (Donahue *et al.* 1990; Puch *et al.* 2011).

La métabolisation du BaP donne également lieu au relargage d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la formation de dommages oxydatifs. Similairement, à son arrivée dans la cellule, le cisplatine peut réagir avec les composants cellulaires et générer des ROS (Santos *et al.* 2007), induisant la formation de bases oxydées et de cassures de chaînes.

### 3. Conséquences des lésions de l'ADN

Certaines modifications de la structure chimique de l'ADN sont indispensables à la vie. Les processus de méthylation et déméthylation d'une cytosine au sein d'un dinucléotide CpG ont pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression génique (Rountree *et al.* 2001). Les gènes codant pour les récepteurs aux antigènes subissent des coupures et réarrangements pour aboutir à la grande diversité des immunoglobulines et des cellules T, qui régissent le système immunitaire (Candeias *et al.* 1997). Outre ces modifications physiologiques issues de processus enzymatiques contrôlés, certaines altérations de la structure chimique de l'ADN ont des conséquences néfastes au niveau cellulaire. Du fait de leur dénouement pathologique et non plus physiologique, ces modifications chimiques imprévisibles constituent le large panel des lésions de l'ADN. Ces lésions sont capables d'interférer avec tous les processus biologiques qui mettent en jeu la molécule support de l'hérédité, comme la transcription, la réplication ou la mitose (Friedberg *et al.* 2004). L'impact d'un dommage est en partie dépendant de l'activité à laquelle la cellule se livre lorsque son ADN est lésé. Afin de préciser l'orientation cellulaire en réponse à un dommage, nous distinguerons les cellules en fonction de leur caractère prolifératif ou non prolifératif.

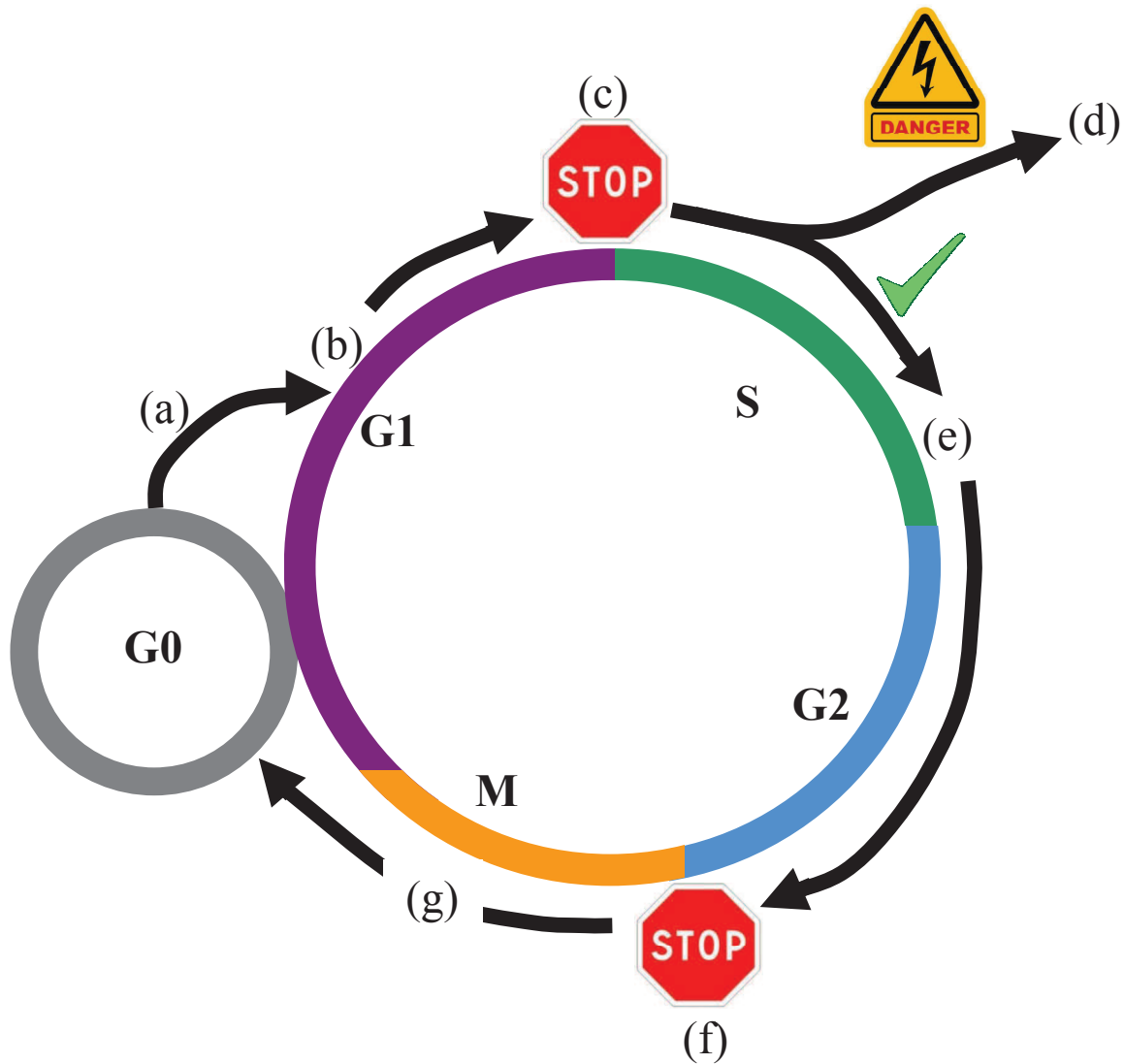
#### a) Réponse aux dommages dans les cellules en prolifération

L'état prolifératif caractérise les cellules enrôlées dans le cycle cellulaire, événement défini par l'intervalle qui sépare deux divisions cellulaires ou mitoses. Chaque cycle consiste en quatre étapes successives (Kaufmann *et al.* 1996) (figure 4). La phase **G1** (Growth phase 1) constitue une période de croissance qui précède toute tentative de division. C'est une phase de préparation qui implique une régulation transcriptionnelle intense, permettant à la cellule de croître en taille et de synthétiser les protéines cytoplasmiques qui seront ensuite réparties dans les deux cellules filles. Au cours de la

phase **S** (DNA Synthesis), le processus de réplication du génome dans sa totalité est accompli. Le contenu en ADN de la cellule est multiplié par deux. Pendant la phase S, la cellule continue à transcrire les gènes codant pour les protéines nécessaires à sa survie et au maintien des fonctions spécialisées. La phase **G2** (Growth phase 2) constitue une période pendant laquelle les constituants mécaniques, qui vont organiser les chromosomes et diviser physiquement la cellule, sont assemblés. Une légère régulation transcriptionnelle s'effectue encore en phase G2. La phase ultime du cycle cellulaire est la mitose ou phase **M** (Mitosis). Il s'agit d'un processus cytologique complexe et raffiné qui divise précisément le jeu de chromosomes dupliqués et coordonne les événements de fission pour produire deux cellules à partir d'une seule. A l'issue de la mitose, dans le cas où un stimulus constant, sous la forme d'un facteur de croissance, entretient le processus de division cellulaire, les deux cellules filles réintègrent la phase G1 en vue d'un nouveau cycle. En absence de stimulus, les cellules filles sortiront du cycle cellulaire, pour entrer en phase de quiescence ou **G0**, phase qui caractérise les cellules non-prolifératives et qui sera détaillée ultérieurement. Les transitions d'une phase à l'autre du cycle sont régulées par les cyclines et les cyclines-dépendantes-kinases (CDKs).

La survenue d'un dommage à l'ADN au cours du cycle cellulaire peut avoir des conséquences néfastes, qui varient en fonction de la phase au cours de laquelle la lésion est générée. En phase S, lors de la réplication de l'ADN, la présence d'un dommage dans l'un des deux brins modèles entrainera une mauvaise reconnaissance de la séquence d'ADN par les polymérase répliquatives. La synthèse du brin fils sera donc infidèle et entrainera l'apparition de **mutations** lors de la division cellulaire suivante. Une cassure survenant sur un chromosome au cours de la mitose engendrera des **aberrations chromosomiques** pour les cellules filles. Le processus de transcription est présent au sein des phases G1, S et G2. Un arrêt de la transcription provoqué par un dommage, au niveau des gènes codant pour les protéines indispensables à la survie de la cellule, aura un **effet létal** pour la cellule endommagée.





**Figure 4 : Le cycle cellulaire.**

(a) Sous l'influence d'un facteur de croissance, la cellule reçoit l'ordre de se diviser : les cellules sortent de la phase G0 et progressent au-delà d'un point de restriction si elles reçoivent un stimulus constant (b). (c) Il existe un point de contrôle G1/S ne laissant se répliquer que l'ADN normal. (d) L'ADN est trop endommagé et la cellule évolue vers la mort. (e) La cellule a passé le point de contrôle et double sa quantité d'ADN. (f) Il existe un second point de contrôle avant la mitose. (g) La mitose s'accomplit et les cellules retournent en G0, sauf si un stimulus constant entretient le processus de division.

Afin d'éviter ces conséquences néfastes, les différents dommages à l'ADN sont capables d'activer des points de contrôle (checkpoints), qui vont permettre à la cellule de ralentir ou de stopper sa progression dans le cycle pour répondre à l'agression subie par le génome par l'intermédiaire des cyclines et CDKs. Il existe deux points de contrôles majeurs, dédiés aux transitions G1/S ou G2/M. A l'heure actuelle, on ne sait pas s'il existe un mécanisme global capable de reconnaître toutes les lésions ou si différents senseurs reconnaissent chacun un type de lésion en particulier. De nombreux travaux ont porté sur la reconnaissance des cassures doubles brin. Ces lésions sont reconnues par des protéines qui possèdent à la fois une activité signalétique (kinase) et une activité de réparation de l'ADN. La protéine kinase ATM joue un rôle majeur dans la reconnaissance des cassures doubles brin et son spectre de phosphorylation est extrêmement large. Le type d'effecteur phosphorylé dépend du taux de dommages à l'ADN et conditionne la réponse cellulaire. Si le taux de dommage est minime, l'action phosphorylante d'ATM s'orientera vers les protéines du système de réparation de l'ADN qui corrigeront l'erreur sans pour autant impliquer un arrêt du cycle cellulaire (Petrini 2000). Si le taux de dommages est plus conséquent, ATM phosphorylera alors la protéine p53, qui activera elle-même la protéine p21 capable de réaliser l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M, octroyant à la cellule un temps supplémentaire pour réparer les dommages auxquels elle fait face (Agarwal *et al.* 1995). Si le taux de dommages est très élevé ou si les systèmes de réparation ne sont pas assez efficaces, l'action d'ATM ciblera également p53, qui n'activera non plus la protéine p21, mais directement les protéines pro-apoptotiques comme Bax ou PUMA (Roos *et al.* 2006).

Les cassures double brin, extrêmement cytotoxiques, font partie des lésions qui bloquent la transcription et la réplication, phénomène enclin à déclencher l'arrêt du cycle cellulaire. La 8oxoG quant à elle ne bloque que très faiblement la transcription et pas du tout la réplication. Lorsqu'elle n'est pas réparée efficacement, la 8oxoG est considérée comme une lésion hautement mutagène (Scharer 2003). En effet, au cours de

la réplication, une Adénine est fréquemment mal appariée en face d'une 8oxoG. L'Adénine faussement insérée sera répliquée au cours du cycle cellulaire suivant, ce qui donnera lieu à l'insertion d'une Thymine. Cette transversion de la Guanine initiale vers une Thymine constitue une mutation par substitution.

Pour résumer la situation dans les cellules en prolifération (figure 5), à l'issue de l'induction d'un dommage, l'ADN peut être réparé : on assiste à l'élimination du dommage pour retrouver une séquence d'ADN intacte. La réparation de l'ADN est parfois facilitée par un arrêt du cycle cellulaire pour que la cellule puisse réparer. Les différents mécanismes de la réparation de l'ADN seront détaillés dans la partie I.C. Il arrive que l'ADN ne soit pas complètement réparé et que la lésion subsiste. Certaines lésions peuvent également échapper aux mécanismes de réparation. Ces lésions persistantes conduiront à des erreurs au cours de la réplication de l'ADN et entraîneront l'apparition de mutations dans le génome. Les mutations qui se produisent au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur sont à la base de la cancérogénèse (Fearon *et al.* 1990). Notons que certaines mutations qui confèrent un avantage sélectif sont à l'origine de l'Evolution. Enfin, si le taux de dommages est trop important et que la cellule ne peut y faire face, la voie de l'apoptose sera mise en place en vue de détruire la cellule lésée. Un excès d'apoptose est une caractéristique du vieillissement naturel, mais plus encore des maladies neurodégénératives.

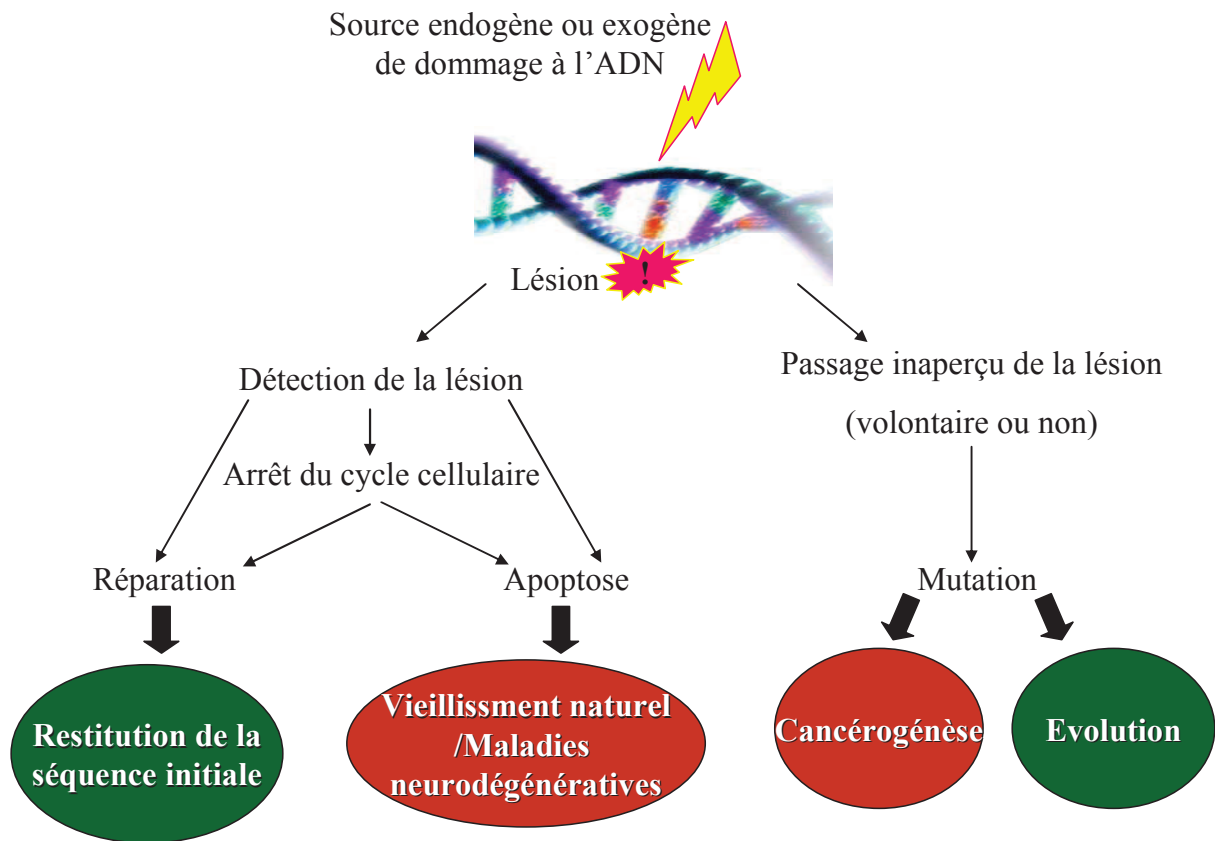


Figure 5 : Réponse(s) cellulaire(s) face aux dommages à l'ADN.

### **b) Réponse aux dommages dans les cellules non-prolifératives**

Les cellules non prolifératives sont des cellules qui ont quitté le cycle cellulaire, d'une façon plus ou moins permanente. Les lymphocytes restent en G0 jusqu'à ce qu'une stimulation antigénique ne les fasse réintégrer la phase G1 du cycle cellulaire (Faller *et al.* 2010). Les cellules hautement différenciées comme les polynucléaires et les neurones ne réintègrent pas le cycle cellulaire. On dit qu'elles se trouvent dans un état G0 définitif (Herrup *et al.* 2007a). Dans ces cellules, la question de la transmission de mutations d'une cellule mère vers une cellule fille ne se pose pas. Les conséquences des lésions se limitent donc vraisemblablement à la réparation du dommage ou à l'élimination de la cellule trop fortement lésée par apoptose. Les mécanismes de réparation de l'ADN étant limités au sein des neurones par exemple, on imagine facilement que ces derniers accumulent des lésions au cours de leur existence (Nospikel *et al.* 2003). Ce taux important de dommage n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire puisque les neurones ne cyclent pas, mais au contraire on assiste à une tentative de ré-entrée dans le cycle cellulaire. Cette tentative est rapidement avortée et provoque l'apoptose chez les neurones endommagés pour des raisons encore mal connues (Herrup *et al.* 2004).

### **c) Conclusions**

Si dans les cellules en prolifération l'apoptose constitue un moyen de lutter contre les mutations et par extension contre la cancérogénèse, dans des cellules spécialisées comme les neurones, la mort cellulaire peut avoir un effet catastrophique. Les neurones ne pouvant être remplacés, leur perte entraîne progressivement une réduction de la masse cérébrale et des conséquences sévères au niveau des fonctions cognitives ou motrices. On compare souvent la cancérogénèse et les maladies neurodégénératives aux deux faces d'un même mal (Staropoli 2008). L'une de ces pathologies implique un déficit en

apoptose et l'autre un excès. Ces deux dénouements paradoxaux proviennent souvent, au moins en partie, d'une seule et même cause, une déficience dans les systèmes de réparation de l'ADN, dont les mécanismes et spectres d'action en termes de lésions seront détaillés dans les paragraphes suivant.

### C. Les voies de réparation

« The double helix is indeed a remarkable molecule. Modern man is perhaps 50,000 years old, civilization has existed for scarcely 10,000 years and the United States for only just over 200 years; but DNA and RNA have been around for at least several billion years. All that time the double helix has been there, and active, and yet we are the first creatures on Earth to become aware of its existence.”

Francis Crick

Si l'ADN est présent depuis plusieurs milliards d'années comme le dit Francis Crick, les dommages le concernant aussi. C'est pourquoi très tôt au cours de l'évolution, les organismes vivants les plus primitifs (bactéries et archaea) ont du mettre en place toute une batterie de systèmes de réparation, capables de prendre en charge le large panel de lésions existantes (DiRuggiero *et al.* 1999). Bien que diversifiés, ces systèmes sont également étonnamment bien conservés, au niveau fonctionnel, du procaryote à l'homme. Chez ce dernier, il existe six systèmes qui se recouvrent partiellement (figure 6). Les bases oxydées, alkylées, les cassures simple brin, les sites abasiques et l'uracile dans l'ADN sont réparés par le système de réparation par excision de base (BER). Les photoproduits, les pontages intra ou inter-brin et les adduits volumineux sont pris en charge par le système de réparation par excision de nucléotides (NER). Les cassures double brin disposent de deux systèmes de réparation, suivant la phase du cycle cellulaire à laquelle elles surviennent : la réparation par recombinaison homologue (HR) et la jonction non homologue des extrémités (NHEJ). Le système de réparation des mésappariements (MMR) prend en charge les lésions du même nom. Enfin, certaines

bases alkylées comme l'O<sup>6</sup>-méthylguanine seront réparées par réversion directe (DR). Ces systèmes de réparation seront exposés dans les paragraphes suivants. Les systèmes par excision de base (BER) et de nucléotides (NER) seront particulièrement détaillés, puisqu'ils auront été majoritairement étudiés dans la suite de ce travail. L'importance de la réparation de l'ADN sera finalement illustrée dans un paragraphe regroupant les maladies que sa déficience génétique peut engendrer.

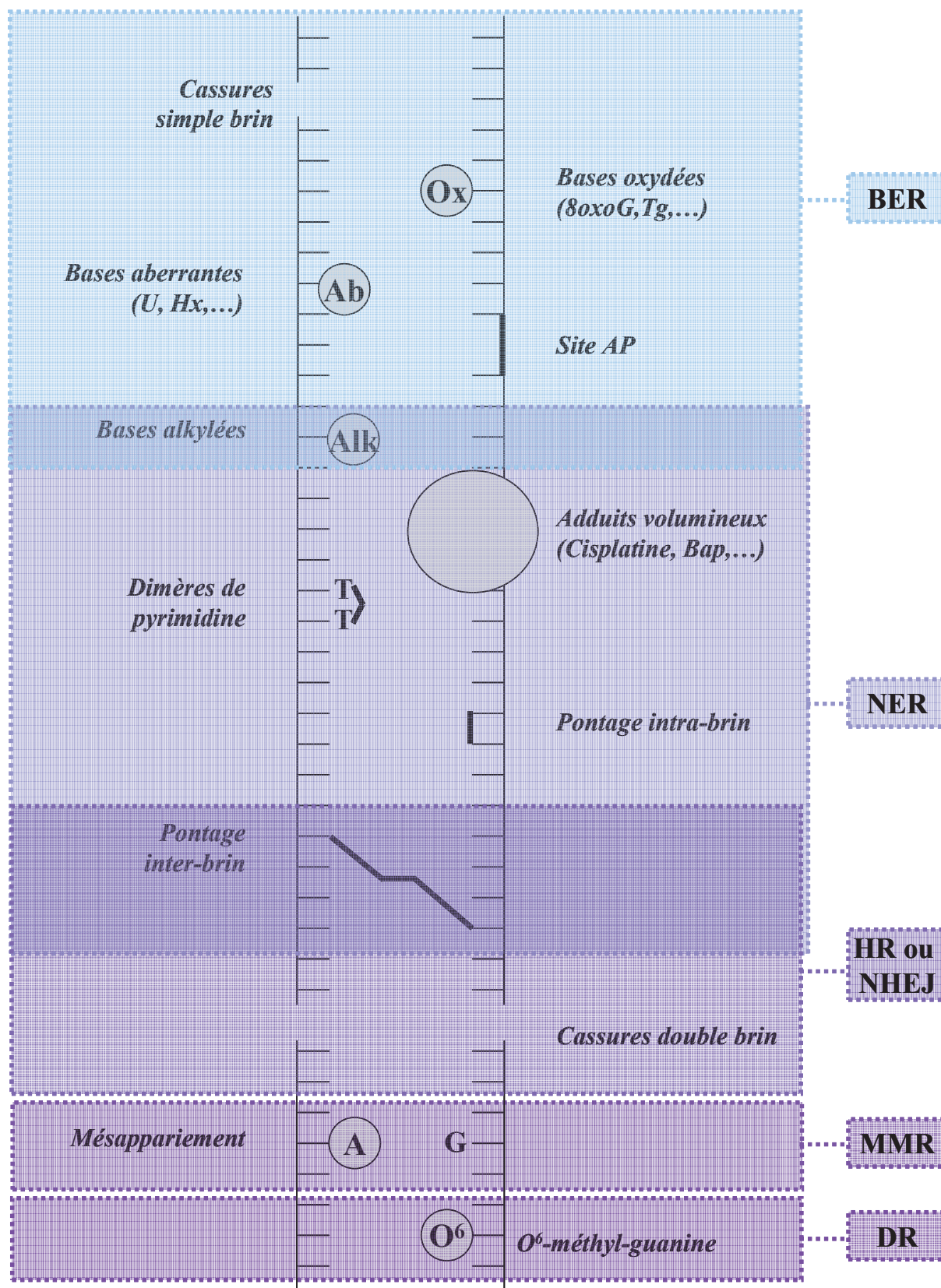


Figure 6 : Les principales lésions de l'ADN et les systèmes de réparation associés.



## 1. La réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base est par définition la voie de réparation des bases endommagées, résultant de « petites » altérations chimiques (oxydation, méthylation, désamination), mais aussi des cassures simple brin. Cette voie est donc le gardien principal contre les dommages induits par le métabolisme cellulaire et notamment le stress oxydant (Hoeijmakers 2001). La voie BER peut être divisée en quatre étapes : l'excision de la base endommagée, l'élimination d'un site abasique, la resynthèse d'ADN et la ligation. Ces quatre étapes seront regroupées deux à deux et détaillées dans les paragraphes suivants. Le cas des cassures simple brin sera traité dans un paragraphe indépendant.

### a) Excision de la base endommagée et génération d'un site abasique

La reconnaissance et l'excision de la base suspecte se font par une catégorie d'enzymes spécialisées, les *N*-glycosylases. Chacune d'entre elles possède une forte spécificité pour son substrat, c'est-à-dire pour un type de lésion donné (tableau 1, figure 7). Il existe deux types de *N*-glycosylases. Les *N*-glycosylases monofonctionnelles réalisent l'excision de la base endommagée, mais nécessitent l'action d'une enzyme spécialisée pour l'incision du site abasique créé. Les glycosylases bi-fonctionnelles sont quant à elles capables de réaliser les deux actions : on dit qu'elles possèdent une activité lyase intrinsèque (Mitra *et al.* 2001).

#### *(1) Cas des N-glycosylases mono-fonctionnelles*

Les ***N*-glycosylases monofonctionnelles** ont pour seule fonction de cliver le lien *N*-glycosidique qui existe entre la base et le sucre. Le site abasique en découlant nécessite d'être pris en charge par l'endonucléase spécifique des sites abasiques (APE1). Cette dernière coupe le brin d'ADN en effectuant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester en

5' du site abasique. Le produit de ce clivage est un interstice avec de part et d'autre un 3'-OH et une extrémité 5'-désoxyribose-phosphate (dRP) (Doetsch *et al.* 1990). Ajoutons que, quel que soit le type de glycosylase mise en jeu, ces enzymes spécialisées permettent la compression du squelette de l'ADN pour faire pénétrer la base modifiée dans le site actif de la protéine (Hoeijmakers 2001).

### (2) Cas des glycosylases bi-fonctionnelles

Il existe deux sous-groupes de glycosylases bifonctionnelles, qui se distinguent par la nature de l'interstice qu'elles engendrent. La première famille de **N-glycosylases bifonctionnelles** réalise une  **$\beta$ -élimination**, qui permet le relargage de la base et la formation d'un interstice avec d'un côté une unité désoxyribose oxydée (= aldéhyde insaturé) et de l'autre une extrémité 5' porteuse d'un groupement phosphate.

Le second groupe de **N-glycosylases bifonctionnelles** procède par le biais d'une  **$\beta,\delta$ -élimination**, de laquelle découle un espace entouré par deux extrémités phosphorylées.

**Tableau 1 : Les ADN glycosylases chez les mammifères et leurs prototypes bactériens.**  
Adapté de (Hegde *et al.* 2008)

Cible de l'enzyme	<i>Humain</i>			<i>E. coli</i>		
		Type	Substrat		Type	Substrat
Uracile dans l'ADN	UNG	Mono	Uracile	Ung	Mono	Uracile
	SMUG1	Mono	Uracile			
	TDG	Mono	U et T dans U(T)·G			
Bases alkylées	MPG	Mono	3-méthyladénine Hypoxanthine	Tag, AlkA	Mono	3-méthyladénine
Mésappariement spécifique à l'Adénine	MYH	Mono	A dans A·8oxoG	MutY	Mono	A dans A·8oxoG
Bases oxydées	NTH1	Bi ( $\beta$ )	Tg, 5-formylU	EndoIII (Nth)	Bi ( $\beta$ )	5-OH-dC, 5-OH-dU, Tg
	OGG1	Bi ( $\beta$ )	8oxoG, Fapy-G			
	NEIL1	Bi ( $\beta\delta$ )	Fapy-A(-G), Tg, 5-OH-dU	EndoVIII (Nei)		Tg, 5-OH-dU
	NEIL2	Bi ( $\beta\delta$ )	Hydanthoine (Sp, Gu), 5-OH-dU	Fpg (MutM)		Fapy-G (-A), 8-oxoG

Mono, mono-fonctionnelle ; Bi, bi-fonctionnelle, Sp, spiriminohydanthoine ; Gu, guanidinohydanthoine ; Tg, thymine glycol ; Fapy, formamidopyrimidine.

## b) Nettoyage des extrémités et synthèse d'ADN

A l'issue de l'excision de la base endommagée et du clivage du site abasique, une cassure simple brin (indirecte, par opposition aux cassures simple brin directes, occasionnées par le stress oxydant) subsiste et présente des extrémités qui ne correspondent pas forcément au substrat préférentiel des polymérases chargées de la resynthèse du brin endommagé (figure 7). En effet, le substrat naturel d'une ADN polymérase est un interstice bordé de résidus 3'-OH et 5'-phosphate. Ceci introduit la nécessité d'un « nettoyage » des extrémités générées précédemment, pour terminer le processus de réparation (Wiederhold *et al.* 2004) (figure 7).

(i) L'action combinée d'une glycosylase monofonctionnelle et d'APE1 laisse place à un interstice bordé d'une extrémité 3'OH et d'un groupe 5'-dRP. Dans ce cas précis, la polymérase  $\beta$  ( $\text{pol}\beta$ ) clive elle-même le résidu 5'-dRP via son activité dRP-lyase (Fortini *et al.* 1998). Une tentative de ligation trop précoce peut également se produire au niveau de l'extrémité 5'-dRP et générer la fixation d'une entité AMP en 5'. L'aprataxine (APTX) est capable de catalyser le relargage des groupements 5'-adénylés et de restaurer l'extrémité 5'-phosphate (Rass *et al.* 2007a).

(ii) L'action d'une *N*-glycosylase bi-fonctionnelle avec une activité  $\beta$ -lyase intrinsèque induit un interstice bordé d'un aldéhyde insaturé en 3' et d'une extrémité 5'-phosphate. L'activité 3'-phosphodiesterase d'APE1 permet l'élimination de l'aldéhyde insaturé pour générer une extrémité 3'-OH (Hegde *et al.* 2008).

(iii) L'action des glycosylases bifonctionnelles avec une propriété de  $\beta,\delta$ -élimination intrinsèque occasionne un interstice entouré de deux extrémités phosphorylées. La poly nucléotide kinase (PNK), possédant une activité 5'-kinase et 3'-phosphatase mais n'utilisant que la dernière de ses propriétés, génère une extrémité 3'-OH (Wiederhold *et al.* 2004).

A l'issue du nettoyage, la pol $\beta$  ajoute le nucléotide manquant à l'extrémité 3' de la coupure. La liaison phosphodiester manquante est réalisée par la DNA ligase III (Lig3) qui interagit avec le facteur X-Ray Cross-Complementing group 1 (XRCC1) via la pol $\beta$ .

Cette voie, qui n'utilise pour seule polymérase que la pol $\beta$  est appelé **voie courte du BER** (short patch (SP-) ou single nucleotide (SN-) BER) (figure 7).

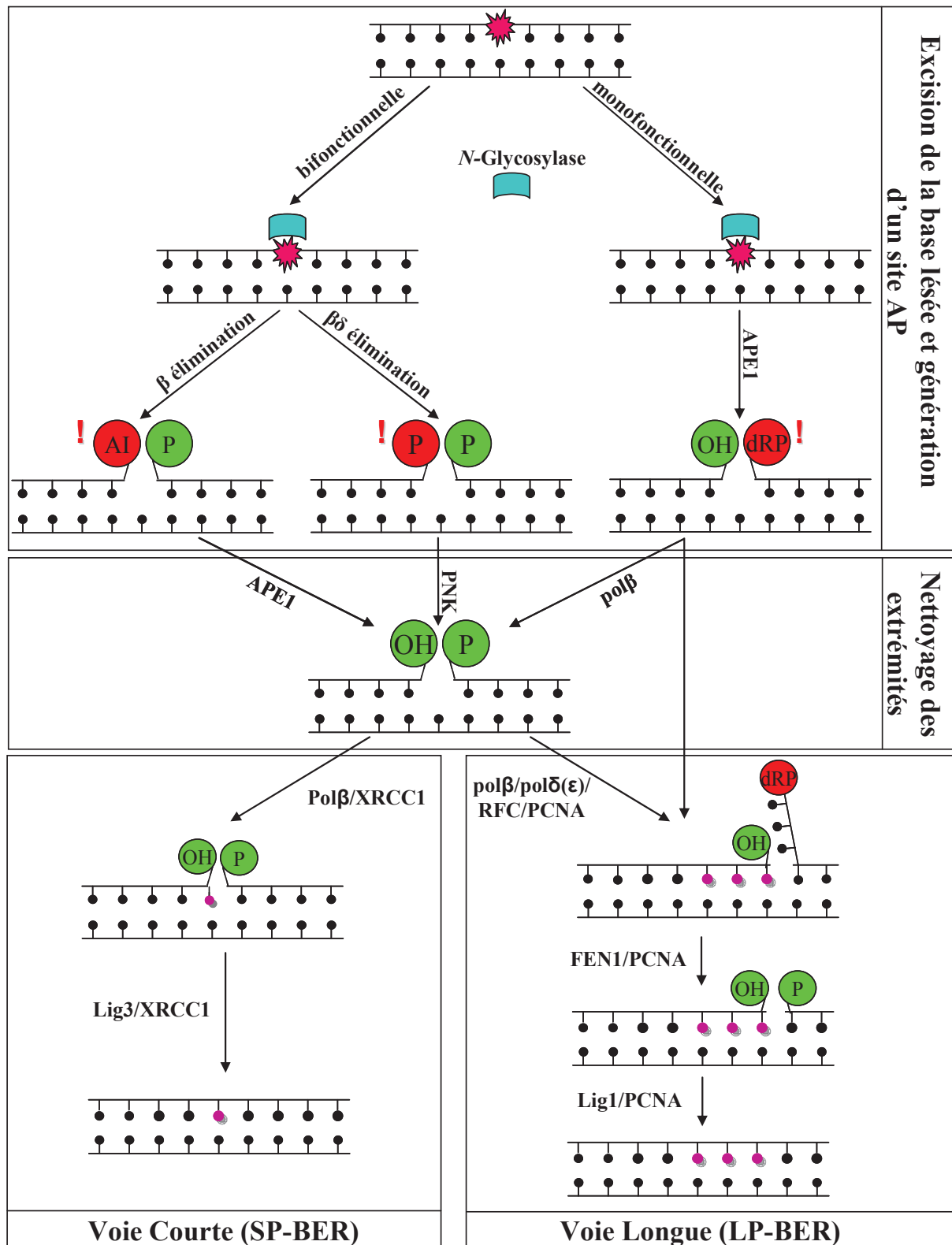


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes et sous voies du BER. AI : aldéhyde insaturé ; P : phosphate ; dRP : déoxyribose phosphate. Adapté de (Hegde *et al.* 2008)

Il arrive cependant que le résidu 5'-dRP ne soit pas hydrolysé de façon efficace. En effet, lorsque la pol $\beta$  exerce son activité de dRP lyase c'est par un mécanisme de  $\beta$ -élimination, extrêmement sensible aux modifications du dRP. Par exemple, les sites AP oxydés ou réduits s'avèrent résistants à cette  $\beta$ -élimination.

Dans cette éventualité, il existe une alternative à la voie courte : la **voie longue du BER** (long patch (LP-) BER) (figure 7). Dans la voie longue du BER, c'est toujours la pol $\beta$  qui insert le premier nucléotide, mais son activité dRP lyase ne fonctionne pas (Podlutzky *et al.* 2001). Alors, ce sont les polymérase  $\delta$  ou  $\epsilon$  (pol $\delta$  ou pol $\epsilon$ ) qui prennent le relai. Les pol  $\delta$  ou  $\epsilon$  sont dépendantes du facteur de processivité des ADN polymérase, le proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Sa structure de trimère toroïdal lui permet d'être ouvert puis fermé autour de l'ADN naissant, grâce à l'activité enzymatique du facteur de chargement RF-C (Maga *et al.* 2003). Le positionnement de PCNA sur l'ADN permet le retrait de la pol $\beta$  et son remplacement par la pol $\delta$  ou  $\epsilon$  (Klungland *et al.* 1997). Le complexe pol $\delta/\epsilon$ -PCNA-RF-C procède alors à la synthèse de deux à huit nucléotides supplémentaires par une invasion dans le brin d'ADN endommagé. Cette invasion entraîne le soulèvement de quelques nucléotides, une structure qu'on appelle « flap ». PCNA libère alors pol $\delta/\epsilon$  et recrute la flap endonucléase (FEN-1) qui incise le flap en laissant une coupure simple dans le double brin d'ADN. C'est finalement la ligase I (Lig1) qui réalise la dernière étape de ligation, scellant ainsi le brin néo-synthétisé. Les pol $\delta/\epsilon$ , PCNA, RF-C, FEN-1 et Lig1 font partie de la machinerie de réplication de l'ADN. L'étape de resynthèse au sein de la voie longue du BER se déroule de manière identique à la réplication du brin retardé de l'ADN, lorsqu'un fragment d'Okazaki naissant rencontre l'amorce ARN d'un fragment plus ancien (Liu *et al.* 2004a).

Hormis le type d'extrémités issues des premières étapes du BER, l'implication de l'une ou l'autre voie dépend de plusieurs facteurs. L'avancement du cycle cellulaire pourrait

par exemple constituer un déterminant (Krokan *et al.* 2000). Le type de glycosylase préalablement mis en jeu est également très important : la réparation de la 8oxoG par la glycosylase bi-fonctionnelle OGG1 évoluerait principalement vers la voie courte (Fortini *et al.* 1999; David *et al.* 2007).

### **c) Cas d'une cassure simple brin**

Dans le cas des cassures simple brin, la protéine poly(ADP-ribose)polymerase (PARP1) s'active par un processus d'auto-ribosilation, lors de sa liaison au brin tronqué. Elle réalise des poly-ADP-ribosylations de nombreuses protéines au niveau de la cassure, induisant par là une signalisation précoce ainsi que le recrutement d'autres protéines du BER (Huber *et al.* 2004), comme PNK et XRCC1. Ces dernières participent à la fois à la protection et au limage/nettoyage des extrémités de part et d'autre des cassures simple brin (Hoeijmakers 2001). En effet, les cassures simples brins directes, induites par les ROS qui s'attaquent à la partie désoxyribose, peuvent laisser place à différents types d'extrémités « sales » et non ligables. Ces groupements bloquant incluent les extrémités 3'-phosphate, 3'-phosphoglycoaldéhydes ou encore 3'-phosphoglycolate (Breen *et al.* 1995). Pour l'extrémité 5' on peut trouver des résidus 5'-OH ou encore des dérivés 5'-phosphodésoxyribose (Mitra *et al.* 1997). On peut aussi trouver des extrémités 5'-adénylées, issues d'une tentative de ligation trop précoce et donc avortée. Comme pour les extrémités engendrées par l'excision d'une base endommagée, les extrémités de part et d'autre de la cassure simple brin doivent être nettoyées. APE1 se charge des résidus 3'-phosphoglycoaldéhydes et 3'-phosphoglycolate et PNK des résidus 3'-OH. Les extrémités 5'-adénylées sont prises en charge par l'aprataxine (APTX). Ce nettoyage constitue probablement l'étape enzymatique la plus diversifiée dans la réparation des cassures simple brin (Fortini *et al.* 2007). Ensuite, les étapes de resynthèse d'ADN et de ligation peuvent s'effectuer via la voie courte ou la voie longue, détaillées dans les paragraphes précédents.

## 2. La réparation par excision de nucléotides (NER)

Comme le BER, le NER est un système de réparation qui fonctionne par excision-resynthèse. Le NER diffère du BER par le nombre de nucléotides resynthétisés (entre 1 et 8 pour le BER et jusqu'à 30 pour le NER) et par les acteurs protéiques mis en jeu. Les lésions prises en charge par le NER sont les adduits volumineux, les photoproduits et les pontages intra ou inter-brin. C'est le système de réparation le plus polyvalent en terme de reconnaissance de lésions. Il existe en fait deux sous-voies du NER (Mellon *et al.* 1986) (figure 8). La première dite Global Genome NER (GG-NER) surveille le génome entier pour les lésions volumineuses et déformant l'hélice. La seconde est la Transcription-Coupled NER (TC-NER) qui prend en charge les dommages qui bloquent l'évolution des ARN polymérase pendant la transcription (Fousteri *et al.* 2008). Ces deux sous-voies présentent des différences au niveau du mode de reconnaissance de la lésion, et des acteurs qui y participent.

Au sein de la GG-NER, le complexe spécifique XPC-hHR23B reconnaît la lésion sur la base d'une interruption d'appariement, plutôt que la lésion elle-même (Wood 1997) (Sugasawa *et al.* 2001). En effet, les lésions volumineuses déforment la structure tridimensionnelle de l'ADN, et engendrent la rupture des liaisons hydrogène, sensées relier deux bases complémentaires. On est alors face à une structure anormale de la double hélice qui constitue un signal de reconnaissance pour XPC (Buterin *et al.* 2005; Maillard *et al.* 2008), complexé à hHR23B qui le stimule.

Deux conditions sont nécessaires à la reconnaissance d'une lésion par XPC/hHR23B : en premier lieu, XPC/hHR23B reconnaît le dommage par la déformation de l'hélice qu'il engendre, mais il faut également que le système vérifie que cette déformation est due à une modification chimique. L'affinité d'XPC n'est pas la même pour les différents types de lésions. Par exemple, XPC a une préférence pour les photoproduits 6-4 par rapport aux CPDs (Kusumoto *et al.* 2001). Dans certains cas le complexe DDB1/DDB2,



également appelé XPE, se charge de la reconnaissance des lésions faiblement reconnus par XPC, comme les CPDs (Hwang *et al.* 1999) ou les adduits générés par le cisplatine (Buterin *et al.* 2005). Cependant, XPE ne permet pas la mise en place du NER à lui tout seul. Certains pensent que le complexe DDB1/DDB2 effectuerait un remaniement de la chromatine, dans le but de permettre à XPC/hHR23B d'accéder au dommage (Tang *et al.* 2002). La seconde hypothèse serait qu'XPE recrute directement XPC/hHRB23 (Moser *et al.* 2005).

Une fois recruté, le complexe XPC/hHR23B réalise une ouverture partielle de la double hélice (Mu *et al.* 1997). Il permet également le recrutement des protéines impliquées dans les étapes suivantes du NER, parmi lesquelles les hélicases XPB et XPD, deux sous-unités du facteur de transcription TFIIF. Ce dernier continue le déroulement de l'hélice sur une vingtaine de bases autour de la lésion, avec l'aide de l'endonucléase XPG, qui se positionne en 3' de la lésion (Evans *et al.* 1997). Les protéines XPA et RPA rejoignent alors le complexe et permettent d'achever l'ouverture complète de l'hélice sur environ 25 nucléotides.

XPA est supposé confirmer ensuite la présence du dommage (Buschta-Hedayat *et al.* 1999). RPA intervient dans la stabilisation du double-brin, en se fixant sur le brin non endommagé. XPA couplé à RPA stimulerait l'incision de l'endonucléase XPG en 3' de la lésion (Mu *et al.* 1996). Finalement, le complexe ERCC1/XPF est recruté et se place en 5' de la lésion. A ce point précis, le complexe de pré-incision est installé. Les coupures en 3' et 5' de la lésion par XPG et le complexe ERCC1/XPF respectivement, se produisent alors simultanément. Comme pour la voie longue du BER, c'est la machinerie de réplication habituelle qui comble l'espace résiduel.

En ce qui concerne la TC-NER, il faut que le dommage (adduits volumineux mais aussi petite base modifiée comme le diol de thymine ou la 7-méthyladénine) bloque vraiment la transcription pour que l'ARN polymérase II soit évincée. C'est le blocage de l'ARN polymérase (ARN pol II) au niveau du site lésé qui constitue le signal de recrutement

des autres protéines de réparation. Les protéines CSA, CSB et XAB2 ainsi recrutées sont responsables du passage de l'ARN pol II d'un état hypophosphorylé à un état hyperphosphorylé (Svejstrup 2002). Cette étape permet le retrait de la machinerie de transcription et le recrutement de la machinerie de réparation. Les facteurs TFIIH, XPG et RPA sont recrutés. XAB2 stimule quant à elle la fixation de XPA (Hanawalt *et al.* 2008). TFIIH peut alors procéder au déroulement et à l'ouverture de l'ADN autour de la lésion, sur une trentaine de base. Les étapes d'excision et de resynthèse qui suivent sont identiques pour la GG-NER et la TC-NER.

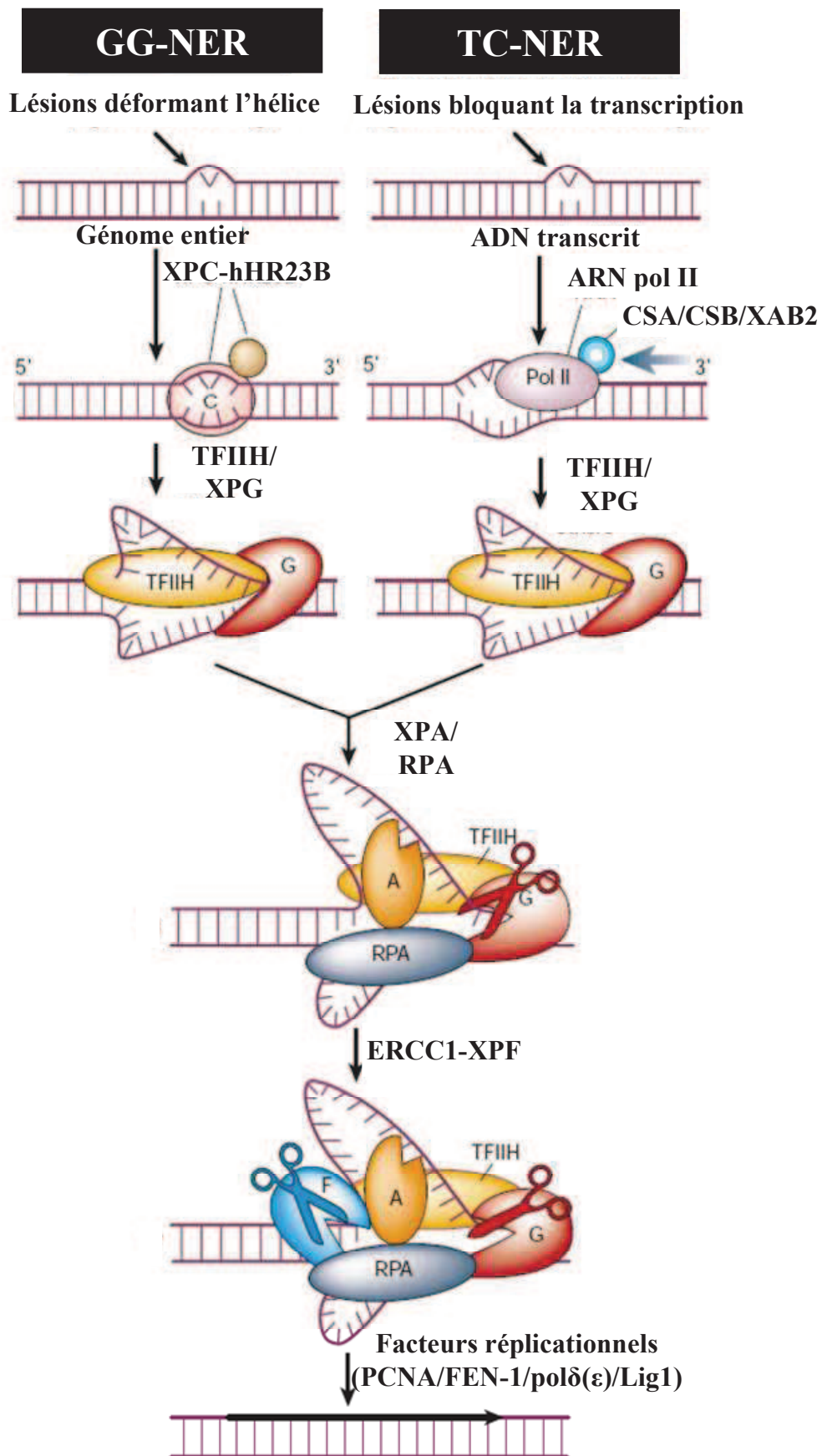


Figure 8: Mécanismes du NER. Adapté de (Hoeijmakers 2001)

### 3. La réparation des cassures double brin

Deux voies sont en charge de la réparation des cassures double-brin. Ce qui pourrait apparaître comme une redondance s'explique en fait par la complexité, et le véritable défi qu'occasionne ce type de lésion particulier : en effet, tous les autres systèmes de réparation ont accès au brin non lésé qui leur sert de modèle pour réparer le brin endommagé. La tâche est beaucoup plus ardue dans le cas des cassures double-brin, puisque que les systèmes de réparation doivent déterminer quelles extrémités « vont ensemble » au sein de l'immensité du génome. Les deux voies en question sont la recombinaison homologue (HR) (Nikolova *et al.* 2010) et la jointure non-homologue des extrémités (NHEJ) (Gao *et al.* 1998). Les raisons de la mise en place d'une voie ou de l'autre ne sont pas complètement clarifiées (Shrivastav *et al.* 2008), mais la phase du cycle cellulaire est un élément déterminant. Par exemple, la HR s'avèrerait dominante quand l'ADN se réplique, en phase S et G2 (Rothstein *et al.* 2000). Cette voie permet la resynthèse d'une deuxième copie conforme de la séquence tronquée, à partir de la chromatide sœur. La HR est considérée comme une voie qui n'engendre pas d'erreurs. En phase G1, c'est le NHEJ qui est sans brin modèle, en charge de la réparation des cassures double-brin. Contrairement à la HR le NHEJ est propice aux erreurs. Avant la mise en place de l'une ou l'autre voie, la détection d'une cassure double-brin déclenche une cascade complexe de réactions, dans le but de freiner la machinerie du cycle cellulaire et de recruter des facteurs de réparation. Parmi ces initiateurs précoces citons la protéine ATM (ataxia telangectesia mutated) qui fait office de senseur des cassures double brin, la protéine p53 qui réalise l'arrêt du cycle en G1 et l'une des trois kinases géantes ATM, ATR (ataxia telangectesia related) ou DNA-PKcs impliquées dans la phosphorylation de l'histone  $\gamma$ -H2AX (Burma *et al.* 2001). Ce dernier évènement aurait pour but de générer un état de la chromatine propice au recrutement de facteurs de réparation.

### a) La recombinaison homologue (HR)

Après la détection d'une cassure double brin, les extrémités des deux brins tronqués doivent être nettoyées (figure 9). Grâce à son activité 5'-3' exonucléase, le complexe RMN (Rad50/MRE11/NBS1) génère les extrémités 3' requises pour la suite du processus (Petrini 2000) (figure 9). La protéine RPA, fixée quant à elle sur les extrémités 5', facilite l'assemblage d'un filament de nucléoprotéines RAD51. Les protéines RAD52 et RAD54 stimulent cet assemblage. RAD51 a la capacité de reconnaître une séquence identique à celle sur laquelle elle est fixée, au sein d'un double brin. Elle réalise une recherche d'homologie (chromatide sœur par exemple) et permet ensuite une invasion croisée de brins : l'un des deux brins tronqué s'apparie à l'un des deux brins intacts de séquence homologue, et le second brin intact s'apparie avec le second brin tronqué de la cassure double brin. Cet entremêlement coordonné de chromatides qui constitue une véritable gymnastique pour l'ADN, serait assuré par RAD54. Après l'identification et le positionnement correct des chromatides sœur, la séquence double-brin intacte est utilisée comme modèle pour réparer la séquence doublement tronquée, via une synthèse d'ADN. A la fin de cette étape, on est donc face à une jonction mobile entre quatre brins d'ADN, la jonction de Holliday (Liu *et al.* 2004b). Ce type de structure particulière est finalement résolu par des enzymes nommées résolvasés (San Filippo *et al.* 2008). La HR permet donc la réparation des cassures double-brin par l'utilisation des chromatides sœurs comme modèles et permet une resynthèse fidèle des brins endommagés. Les chromatides sœurs ne sont cependant disponibles qu'en phase G2 et S du cycle cellulaire. En phase G1, seul le chromosome homologue est disponible et cette solution présente de nombreux inconvénients. Premièrement, compte tenu de la taille et de la complexité du génome, il est assez difficile de le retrouver. De plus, se servir du chromosome homologue engendre une homozygotie qui n'était pas forcément présente au départ et qui peut se révéler

dangereuse, dans l'éventualité où le chromosome homologue est le seul porteur d'une mutation récessive.

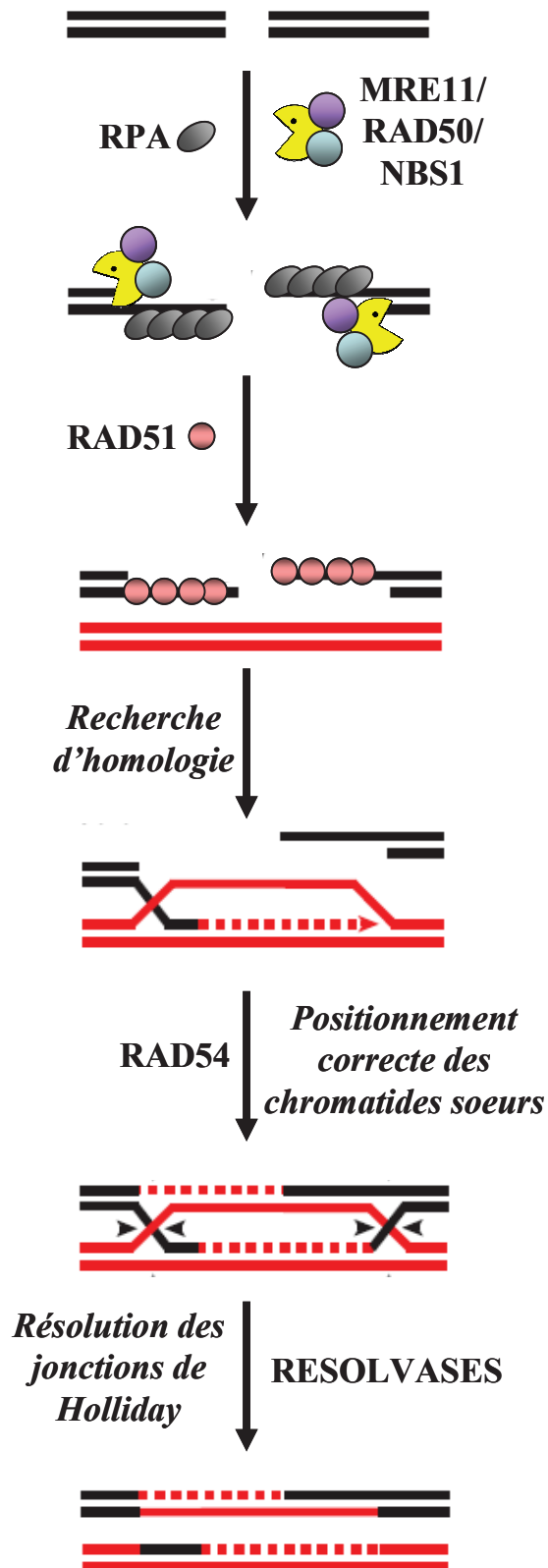


Figure 9 : Mécanismes de la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue.

### b) La suture non homologue des extrêmités (NHEJ)

Le NHEJ (figure 10) intervient notamment en G1 et n'utilise pas de brin modèle d'ADN : il se « contente » de lier les extrêmités d'une cassure double-brin. Ce sont d'abord les protéines Ku70 et Ku80 qui se fixent sur les extrêmités tronquées. Cette fixation assure la protection des extrêmités et joue un rôle de signalisation pour le recrutement de la kinase DNA-PKcs. On assiste finalement à une étape de ligation à l'aide des protéines XRCC4 et de la ligase IV (Lig4). Le NHEJ est la voie privilégiée lorsque les extrêmités restent proches, dans les structures telles que les nucléosomes. Cette voie est souvent associée à un gain ou à une perte de nucléotides (Shrivastav *et al.* 2008).

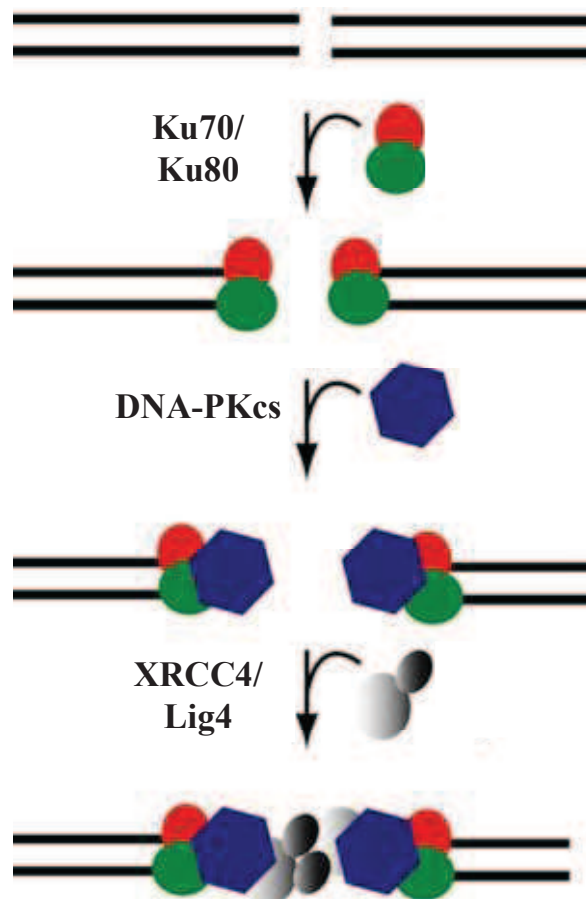


Figure 10 : Mécanisme de réparation des cassures double brin via le NHEJ.

#### 4. La réparation des mésappariements (MMR)

Lors de la réplication, sous l'action des ADN polymérase répliquatives, un certain taux d'erreur se produit (1 erreur sur  $10^6$ - $10^7$  bases néosynthétisées). Le MMR se charge des nucléotides mal appariés par les ADN polymérase et réduit le taux d'erreurs à 1 erreur sur  $10^9$ - $10^{10}$  bases. Le MMR s'occupe également des boucles d'insertions ou délétions, pouvant comprendre un à dix nucléotides. Ces boucles résultent d'un décalage de séquences répétitives qui se produisent au cours de la réplication ou de la recombinaison (Hoeijmakers 2001). Le MMR se déroule en quatre étapes. On assiste d'abord à la reconnaissance du mésappariement, puis au recrutement d'autres facteurs du MMR. Vient ensuite la recherche d'un signal qui identifie le brin porteur du mésappariement et qui permet sa dégradation ainsi que celles des quelques nucléotides qui lui succèdent. La resynthèse du passage excisé met fin au processus de MMR.

Le MMR implique la famille des facteurs de type MutS et MutL d'*Escherichia Coli*. L'hétérodimère hMSH2/hMSH6 se concentre sur les mésappariement et les boucles à base unique. L'hétérodimère hMSH2/hMSH3 quant à lui reconnaît les boucles d'insertion ou de délétion. Ensuite, les complexes hétérodimériques hMLH1/hMPS2 et hMLH1/hMPS1 interagissent avec les complexes hétérodimériques hMSH ainsi qu'avec les facteurs de réplication. On pense d'ailleurs que la discrimination du « mauvais brin », porteur du mésappariement pourrait être facilitée par la proximité de la machinerie de réplication. La méthylation du brin parental, plus ancien, est supposée constituer un atout de discrimination, mais une publication réfute cette hypothèse (Drummond *et al.* 2001) De nombreuses protéines interviennent dans la dégradation du brin néosynthétisé, en commençant par le mésappariement, ainsi que dans les étapes de resynthèse. Citons donc pol $\delta/\epsilon$ , RPA, PCNA, RFC, l'exonucléase 1 et FEN-1.



## 5. La réparation par réversion directe (DDR)

Ce type de système de réparation n'implique pas de clivage du lien phosphodiester et ne nécessite pas non plus de modèle pour réparer le brin endommagé. Les enzymes impliquées dans ce processus sont spécifiques d'un type de dommage et ont donc la capacité de le reconvertir directement en la base initiale. La photolyase est en charge des dimères de pyrimidine (chez les bactéries et les plantes) et la MGMT de l'*O*<sup>6</sup>-méthyl-guanine. Chez les bactéries, citons encore les protéines de la famille des alkB, qui réalisent une déméthylation directe de la base par un processus oxydatif qui nécessite la présence de cations Fer.

## 6. Les pathologies associées à une déficience des systèmes de réparation de l'ADN

Les acteurs protéiques des systèmes de réparation présentent souvent une multiplicité fonctionnelle : leur action ne se limite pas à la réparation de l'ADN. En effet, certains d'entre eux jouent également un rôle dans des processus biologiques majeurs comme la réplication ou la transcription. Dans le paragraphe suivant, nous nous intéresserons donc à l'étendue des conséquences phénotypiques résultant d'une déficience génétique au niveau de l'un de ces acteurs. Nous procéderons système par système, et tacherons de mettre l'accent sur les cas qui engendrent des troubles neurologiques ou neurodégénérescences (tableau 2).

### a) Déficiences du BER

Peu de pathologies n'ont été aujourd'hui associées à une déficience héréditaire dans les *N*-glycosylases du BER. L'extinction individuelle de chaque *N*-glycosylase ne cause pas non plus de phénotype caractéristique. Chez l'animal, ceci peut s'expliquer par le recouvrement du BER et de la TC-NER pour les lésions qui bloquent la transcription et aussi par la redondance partielle qui existe entre les différentes *N*-glycosylases.

Cependant, une étude menée sur des souris âgées déficientes pour OGG1 a révélé une augmentation de l'incidence du cancer du poumon, corrélée à l'accumulation de 8oxoG dans les cellules pulmonaires (Sakumi *et al.* 2003).

L'inactivation des autres protéines qui interviennent dans la voie courte ou la voie longue du BER, conduit à une létalité au stade embryonnaire (Hoeijmakers 2001). Soulignons cependant que la plupart des protéines de terminaison du BER comme les polymérase  $\delta$  ou  $\epsilon$ , PCNA ou la ligase I sont parties intégrantes de la machinerie répllicationnelle : sans elles, la division cellulaire est irréalisable ce qui empêche le développement embryonnaire.

Une mutation dans le gène codant pour APTX est responsable de la maladie neurodégénérative Ataxia with Oculomotor Apraxia 1 (AOA1), caractérisée par une atrophie du cervelet ainsi qu'une neuropathie sensori-motrice (Rass *et al.* 2008).

Notons qu'un polymorphisme dans la séquence du gène d'OGG1 a été associé à la maladie d'Alzheimer (Mao *et al.* 2007).

### **b) Déficiences associées au NER**

Au moins trois maladies sont associées à des déficiences du NER. Il s'agit du *Xeroderma Pigmentosum* (XP), du syndrome de Cockayne (CS) et de la trichothiodystrophie (TTD). Comparé à un individu sain, le patient XP présente une incidence mille fois supérieure des cancers de la peau induits par le soleil. Cette maladie provient de mutations dans l'un des sept gènes XPA à XPG. En plus de l'hypersensibilité aux UV des zones exposées, 30% des patients XP présentent des troubles neurologiques (Kraemer *et al.* 2007) si bien que Robbins *et al.* (Robbins *et al.* 1991) ont introduit le terme de « patients XP atteints de troubles neurologiques » pour les distinguer des patients XP. L'autopsie des patients XP atteints de troubles neurologiques révèle une perte de neurones dans toutes les zones du cerveau (Brooks 2002).

Le mécanisme à l'origine de cette neurodégénérescence reste à définir. Partant du principe que les UV ne traversent pas le crâne, et ne pouvaient donc pas être responsables de dommages occasionnés au niveau de l'ADN, Robbins *et al.* ont émis l'hypothèse qu'il devait y avoir un autre type de dommage, produit de manière endogène, mis en jeu (Robbins *et al.* 1983). En absence de NER, ces dommages hypothétiques non réparés s'accumuleraient et conduiraient à la mort neuronale. Les cyclopurines ou les lésions tandem pourraient être de bonnes candidates pour participer à ce processus.

Le CS est dû à des mutations dans les gènes CSA ou CSB, et correspond à une maladie caractéristique de la TC-NER. Aucune prédisposition au cancer n'a été observée, mais le développement physique et neurologique est sévèrement perturbé. Les patients CS sont victimes de nanisme, de microcéphalie, d'un retard mental important et subissent un vieillissement prématuré. Ce phénotype s'explique partiellement par le fait qu'une déficience du TC-NER engendre une hypersensibilité aux lésions qui bloquent la transcription et favorisent l'apoptose (Hamdi *et al.* 2005). Les conséquences phénotypiques du CS ne s'expliquent cependant pas uniquement par les défauts de réparation d'un certain type de lésion. Il s'avère qu'en plus d'être causé par des mutations au niveau des gènes CSA ou CSB, des mutations au niveau d'XPD peuvent également provoquer une pathologie combinée de type XP/CS. Or le gène XPD constitue l'une des deux sous-unités du complexe TFIIH, impliqué dans le NER mais aussi dans la transcription (Drapkin *et al.* 1994).

TTD partage de nombreux symptômes avec CS mais les patients présentent en plus des caractéristiques physiques telles que des cheveux et des ongles cassants ainsi qu'une peau squameuse (Kraemer *et al.* 2007).

### c) Déficiences associées à l'HR et au NHEJ

Les défauts génétiques associés aux systèmes de réparation des cassures double-brin impliquent ATM, MRE11 et NBS1 (Petrini 2000). Les symptômes résultant d'une mutation dans l'un de ces trois gènes entraînent une prédisposition au cancer, une immunodéficience, une hypersensibilité aux rayons X ainsi qu'une instabilité chromosomique. L'Ataxia Telangiectasia ainsi qu'une forme qui lui est reliée, causées respectivement par une mutation au sein d'ATM ou de MRE11, entraînent en plus une ataxie\*, une dégénérescence du cervelet ainsi qu'une telangiectasie† oculaire. Une mutation dans le gène codant pour la protéine NBS1 est à l'origine du Nijmegen Break Syndrom, avec pour caractéristique une microcéphalie et un retard de croissance (Borges *et al.* 2008).

### d) Déficiences associées au MMR

Les mutations au niveau des gènes hMLH1 et hMSH2 se retrouvent dans 50% cancers colorectaux sans polypose. La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative causée par l'expansion d'une séquence répétée de CAG dans le gène codant pour la huntingtine dont l'une des principales fonctions est sa propriété anti-apoptotique. Les insertions de séquences répétées étant normalement réparé par le MMR, une déficience de ce dernier pourrait participer à la mise en place de la maladie (Dragileva *et al.* 2008).

---

\* Ataxie : manque de coordination fine des mouvements volontaires.

† Telangiectasie : dilatation de petits vaisseaux cutanés, formant de fines lignes rouges.

Chapitre I : Etude bibliographique

Syndrome	Gène concerné	Implications neurologiques
<i>BER</i>		
Ataxia with oculomotor apraxia 1 (AOA1)	APTX	Ataxie, neurodégénérescence progressive, apraxie oculo-motrice
<i>NER</i>		
Xeroderma Pigmentosum (XP)	XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG	Micro-céphalie, neurodégénérescence progressive
Cockayne Syndrome (CS)	XPB, XPD, XPG, CSA, CSB	Micro-céphalie, neurodégénérescence progressive
Trichothiodystrophie (TTD)	XPB, XPD	Micro-céphalie
<i>HR</i>		
Ataxia Telangectasia	ATM	Ataxie, neurodégénérescence progressive
Maladie associée à Ataxia Telangectasia	MRE11	Ataxie, neurodégénérescence progressive
Nijmegen Breakage Syndrome	NBS1	Micro-céphalie

Tableau 2 : Syndromes associés à une déficience génétique de l'un des nombreux acteurs de la réparation de l'ADN. Adapté de (Rass et al. 2007b)

En conclusion, nous avons pu voir dans cette première partie que les défauts de réparation de l'ADN étaient à l'origine de nombreuses pathologies héréditaires, dont certaines évoluent vers une neurodégénérescence. Il paraît alors judicieux de s'intéresser au statut des dommages et à leur réparation dans l'Alzheimer, maladie neurodégénérative que certains envisagent déjà comme la peste du XXIème siècle.

## **II. La maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui affecte préférentiellement certaines zones cérébrales et occasionne ainsi les troubles spécifiques à cette forme de démence. Dans cette deuxième partie, nous nous attacherons d'abord à décrire la morphologie du cerveau et des cellules qui le constituent. Nous nous orienterons ensuite vers les signes cliniques qui caractérisent la maladie d'Alzheimer et tenterons d'en expliquer les causes neuropathologiques. Enfin, nous mettrons l'accent sur le taux de dommages à l'ADN dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et leur implication dans l'étiologie complexe de la maladie. Finalement, la condition des systèmes de réparation dans la maladie sera abordée.

### **A. L'organe touché par la maladie d'Alzheimer**

#### **1. Le cerveau : organisation et fonctions**

S'il ne représente qu'environ 2% du poids total de notre corps, le cerveau est selon Voltaire, le « siège de la matière pensante ». Pour aller plus loin que cette définition du XVIIIème siècle, il est en fait le siège de toutes les fonctions supérieures (cognitives, sens, réponses nerveuses) et végétatives. Il agit également sur les muscles et les glandes pour réguler les autres organes du corps et assurer le contrôle des fonctions vitales. Via les nerfs dits afférents, le cerveau reçoit des informations provenant de l'ensemble du corps humain, les intègre et les analyse puis répond en émettant de nouveaux signaux qui redescendent vers les parties du corps concernées, par les nerfs efférents. Le cerveau est ainsi responsable du rythme cardiaque et respiratoire, des fonctions qui nous sont inconscientes. Mais il est aussi impliqué dans la prise de décision, dans la motricité du corps, le comportement, la mémoire, la conscience.

On parle souvent du cerveau au sens large du terme pour désigner tout ce qui se trouve dans la boîte crânienne. En réalité, le **cerveau** est une des trois parties, la plus

complexe et la plus volumineuse, qui avec le **cervelet** et le **tronc cérébral** (partie supérieure de la moelle épinière), composent l'**encéphale**. Ce dernier et son prolongement naturel, la moelle épinière contenue dans la colonne vertébrale, composent le **système nerveux central** (figure 11.a). L'encéphale a été cartographié et certaines zones semblent associées à des fonctions précises (aire(s) de la parole), alors que les fonctions plus complexes (la mémoire, la conscience) semblent être beaucoup plus réparties. On peut observer et analyser la répartition des zones du cerveau de plusieurs façons : anatomiquement, fonctionnellement ou particulièrement au niveau des cellules qui le compose, chimiquement. Au premier abord, l'anatomie du cerveau présente deux hémisphères, chacun d'eux contrôlant une partie du corps de manière croisée : l'hémisphère droit contrôle le côté gauche et inversement. Les deux hémisphères sont reliés entre eux par le corps calleux, composé de substance blanche. Indépendamment de ses deux hémisphères, l'encéphale est divisé en plusieurs parties, déterminées en fonction de leur(s) origine(s) embryonnaire(s) (figure 11.b) :

- le télencéphale, la partie supérieure, composé du **cortex cérébral** et du système limbique et des ganglions de la base.
- le diencéphale qui contient le thalamus et l'hypothalamus.
- le mésencéphale (région du tronc cérébral, maintient de posture, mouvement volontaire).
- le bulbe rachidien (contrôle des mouvements réflexes et végétatifs : respiration, modulation du rythme cardiaque, régulation des muscles lisses artériels) qui communique avec la moelle épinière.
- le pont de Varole ou pont ou encore protubérance annulaire (partie centrale du tronc cérébral, relai entre cerveau et cervelet, motricité).
- le cervelet (coordination motrice et apprentissage des mouvements routiniers).



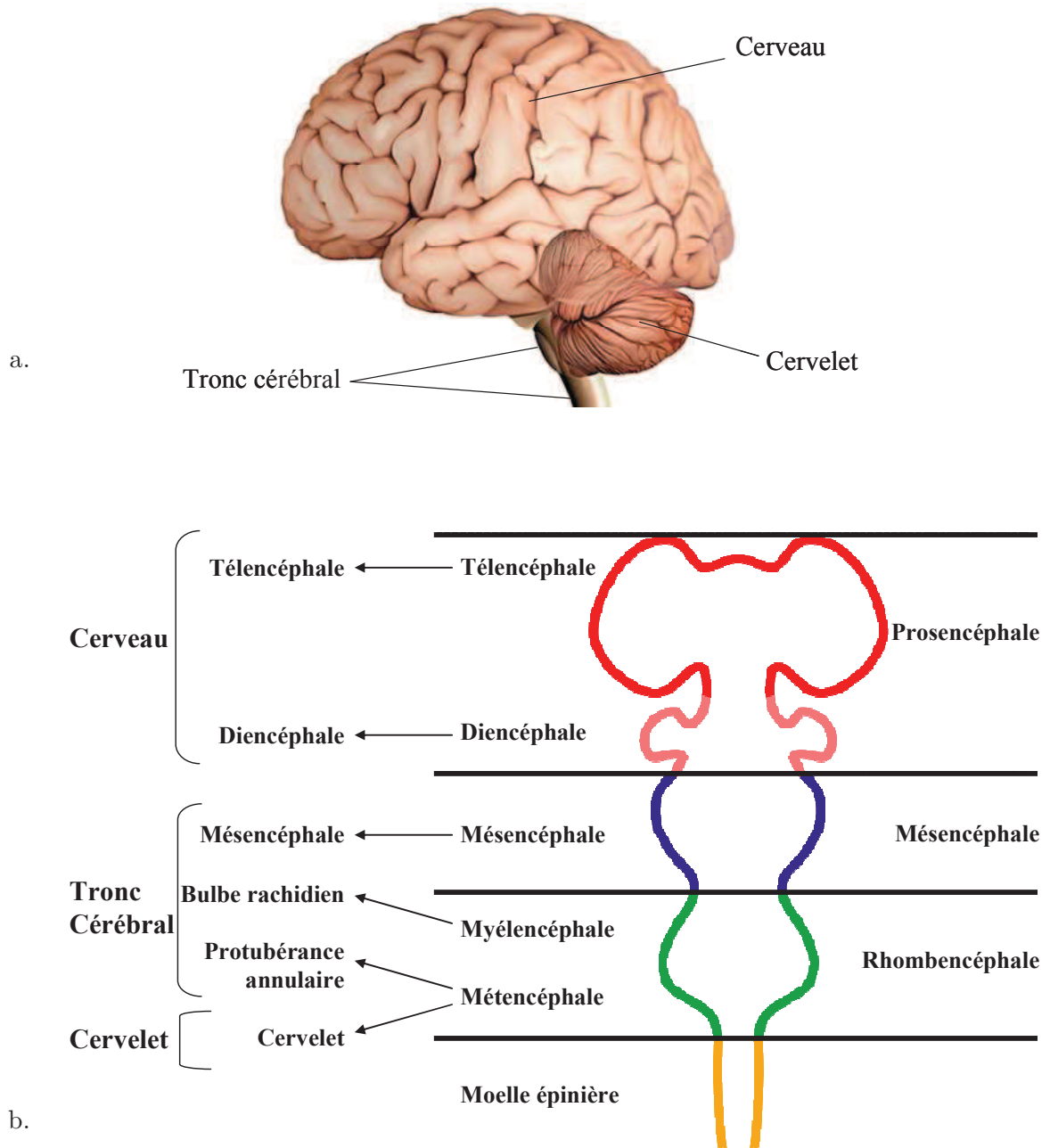


Figure 11 : Principales divisions de l'encéphale.

(a) L'encéphale vu de côté et les trois zones qui le composent : le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral.

(b) Représentation schématique des divisions au stade embryonnaire de l'encéphale (à droite) et leur évolution vers les divisions anatomiques d'un cerveau adulte (à gauche).

Le cortex cérébral (figure 12) constitue la couche externe du cerveau et comporte la majorité des neurones (substance grise). Les méninges sont des enveloppes protectrices entre le cortex et l'os du crâne. Le cortex cérébral est subdivisé en quatre lobes cérébraux, par rapport à leur position anatomique mais aussi à leurs fonctions, et qui sont présents sur chacun des deux hémisphères :

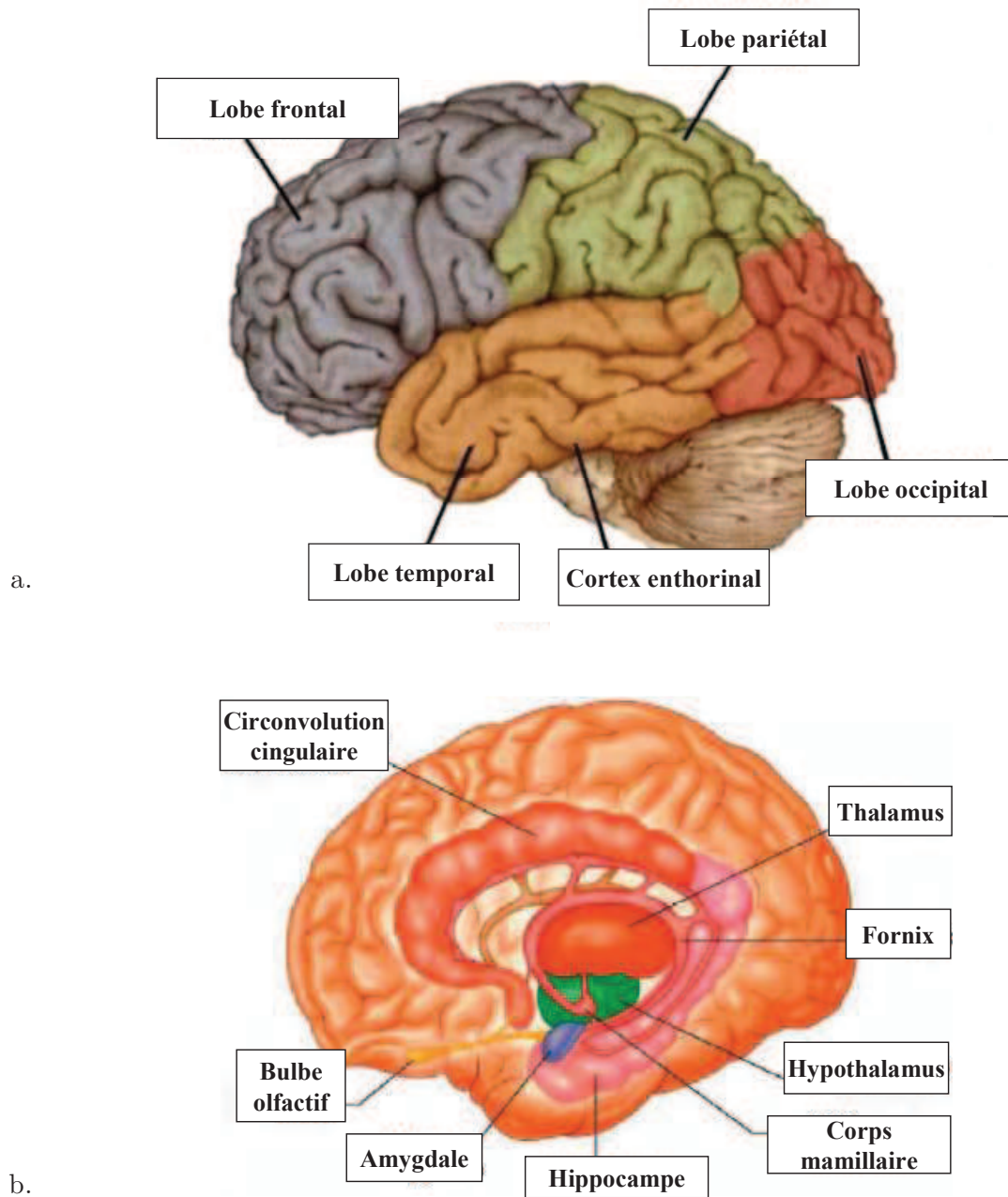
- les lobes frontaux : en plus du raisonnement et de la planification, les lobes frontaux modulent nos émotions et sont impliqués dans ce qui fait notre personnalité. Les mouvements volontaires de notre corps sont initiés dans les lobes frontaux, mais dans la partie postérieure. Enfin, une petite partie du lobe frontal gauche est très importante car elle permet de transformer nos pensées en mots.

- les lobes pariétaux : ils sont consacrés aux différentes perceptions sensorielles telles le goût, le toucher, la température ou la douleur. Ils intègrent aussi des signaux auditifs et visuels qu'ils mettent en relation avec nos souvenirs, leur donnant ainsi un sens.

- les lobes temporaux : ils permettent de distinguer l'intensité et la tonalité des sons. Ils permettent également de comprendre le sens des mots. Les lobes temporaux sont également impliqués dans la formation et la remémoration des souvenirs, le lobe temporal droit étant plutôt impliqué dans la mémoire visuelle et le lobe temporal gauche dans la mémoire verbale.

- les lobes occipitaux : ils sont principalement consacrés au décodage de l'information visuelle. La forme, la couleur, le mouvement, tout cela est analysé dans cette région. En reliant ces perceptions visuelles aux images mémorisées, cette partie du cerveau, aussi appelée cortex visuel, nous permet de reconnaître et d'identifier les choses.

Un cinquième lobe n'est visible que si l'on pénètre à l'intérieur du cerveau. Il s'agit du lobe limbique. Egalement désigné comme le système limbique, il joue un rôle très important dans la formation de la mémoire et l'apprentissage mais aussi dans l'olfaction. Il est impliqué dans le comportement et en particulier, dans diverses



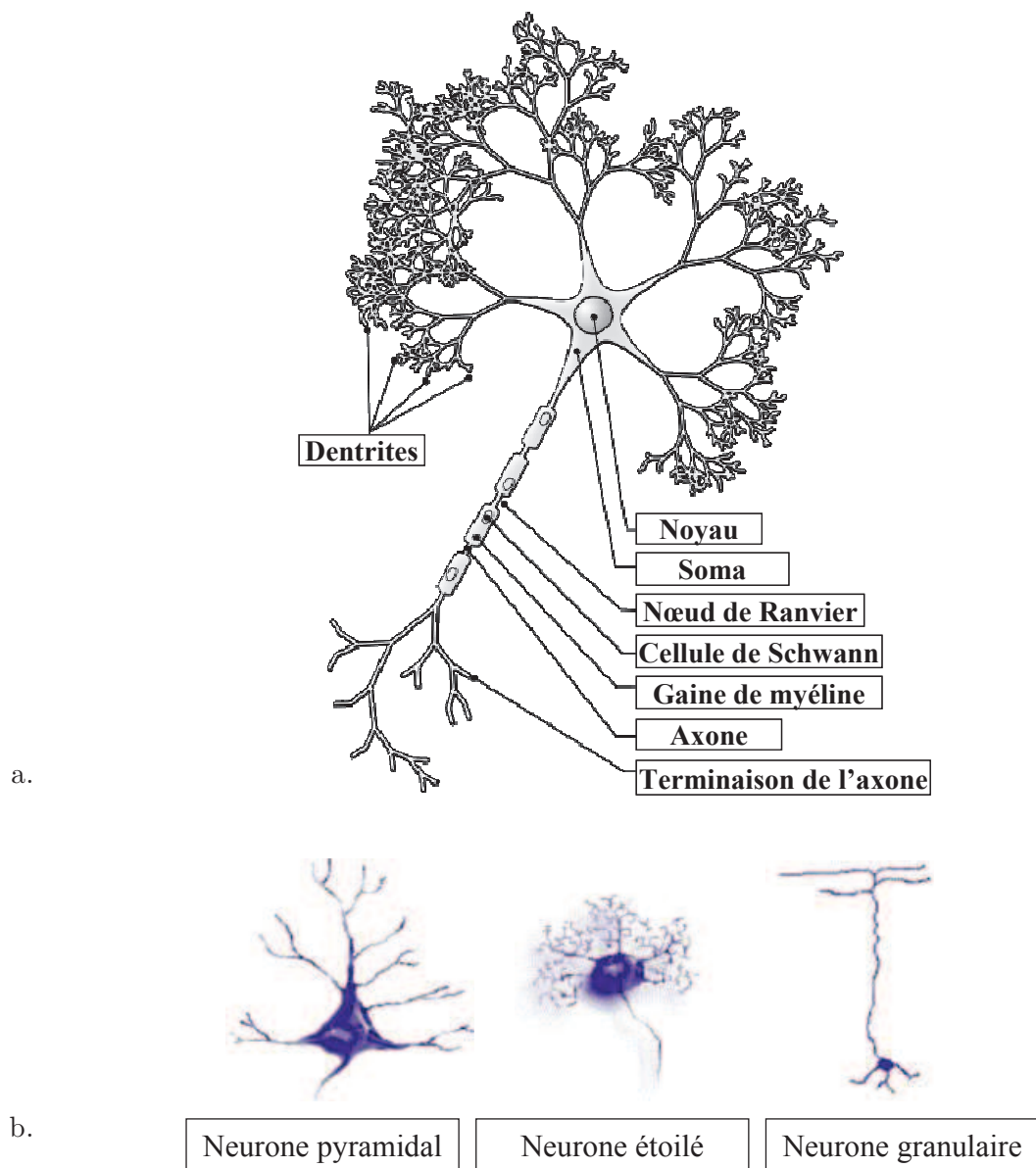
**Figure 12 : Divisions anatomiques du cerveau.**

(a) Répartition des lobes cérébraux. Le cortex entorhinal constitue la porte d'entrée vers le système limbique. (b) Coupe sagittale du cerveau et localisation des principales structures du système limbique.

émotions comme l'agressivité, la peur ou le plaisir. Parmi les composantes du système limbique, citons l'hippocampe, impliqué notamment dans la formation de la mémoire à long terme (Leuner *et al.* 2010).

## 2. Les cellules du cerveau

Le tissu cérébral est constitué de deux types de cellules : les neurones et les cellules gliales. Le nombre de neurones chez l'humain s'élève à environ 100 milliards (Williams *et al.* 1988). La principale fonction du neurone est de propager de l'information. Pour cela, les neurones ont deux propriétés majeures : l'**excitabilité**, qui leur permet de recevoir et répondre aux stimulations pour les convertir en impulsions nerveuses et la **conductivité**, qui leur permet de transmettre ces impulsions. Les fonctions caractéristiques du neurone lui confèrent une physionomie et une morphologie bien particulières. Il possède un corps cellulaire, encore appelé soma ou péricaryon, ainsi que deux types de ramifications : un seul axone et parfois plusieurs dendrites (figure 13.a). On peut classer les neurones en fonction des variations dans leur nombre de prolongements. Il existe des neurones **pseudo-unipolaires**, où la dendrite et l'axone sont accolés près du soma. Ce sont des neurones sensitifs. Les neurones **bipolaires** possèdent une dendrite et un axone et sont des neurones sensoriels, au niveau de la rétine ou de l'oreille interne. Finalement les neurones **multipolaires** ont toujours un seul axone, mais plusieurs dendrites. Il existe trois classes des neurones multipolaires, qui diffèrent par la forme du soma. Les neurones pyramidaux, les neurones en étoiles et les neurones granulaires (figure 13.b).



**Figure 13 : Morphologie du neurone.**

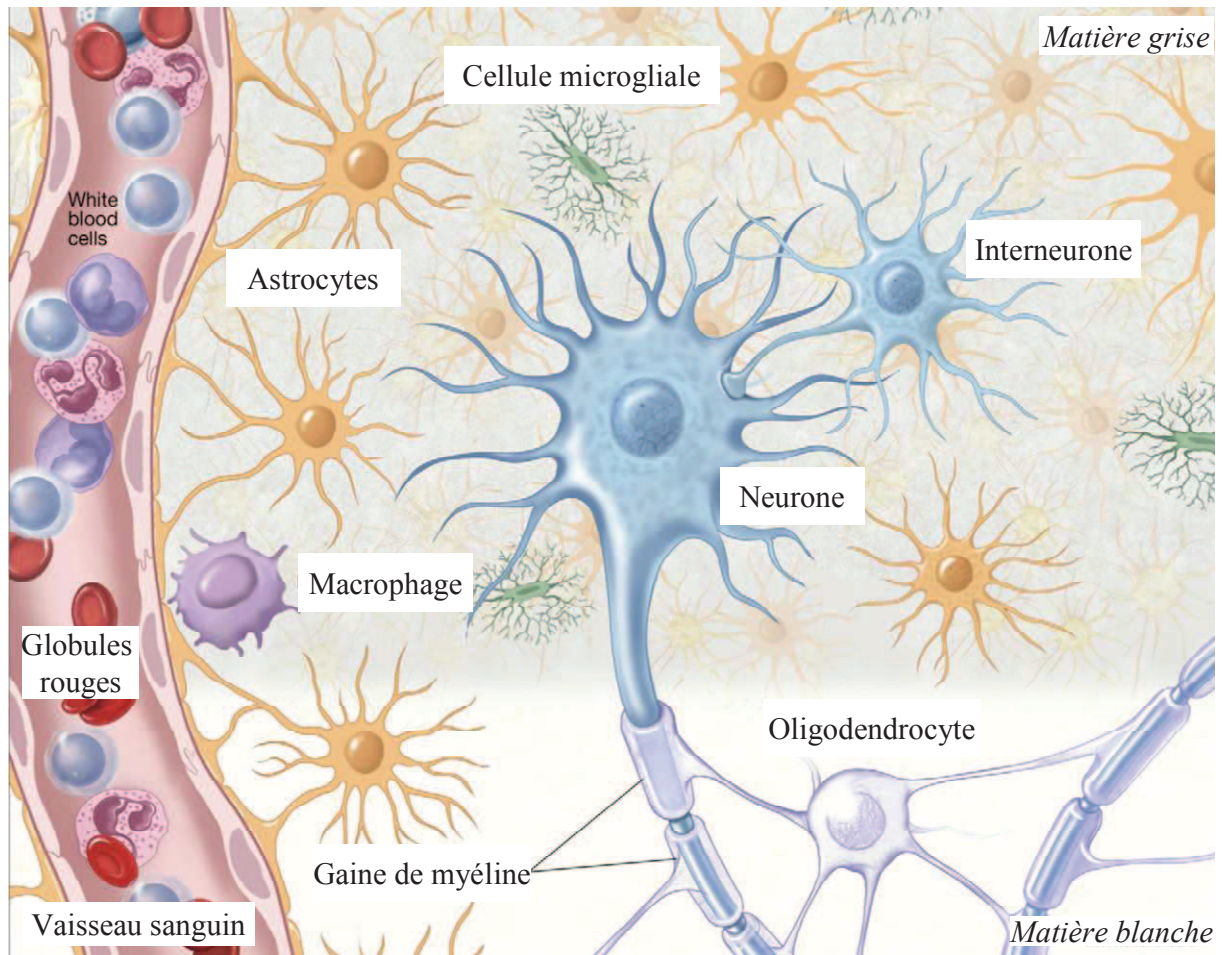
(a) Le neurone est composé d'un corps cellulaire ou soma, qui se prolonge en diverses ramifications. L'axone est une zone riche en microtubules. Il représente une zone « gachette », génératrice d'un potentiel d'action, qui présente une arborisation terminale. Cette arborisation se termine par un renflement appelé bouton synaptique. Une gaine de myéline recouvre certains axones. La myéline est synthétisée par les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique et par les oligodendrocytes dans le système nerveux central. La myélinisation n'est pas continue le long de l'axone, les nœuds de Ranvier en constituent la séparation. Les dendrites sont nombreuses et très ramifiées. Elles reçoivent l'influx nerveux et le conduisent jusqu'au soma.

(b) Les neurones pyramidaux sont présents dans l'hippocampe et le cortex. Les neurones étoilés peuvent être des motoneurones ou des neurones de Purkinje. Les motoneurones relient le cortex cérébral et la moelle épinière et mesurent jusqu'à 1 mètre. Les neurones de Purkinje sont présents exclusivement dans le cervelet. Les neurones granulaires sont également présents dans le cervelet, mais aussi dans l'hippocampe. Ce sont les plus petits neurones, et leur taille ne dépasse pas 10  $\mu\text{m}$ .

Les neurones constituent un réseau très sophistiqué de connections. L'information sous forme d'influx nerveux qu'ils doivent relayer, transite de deux manières différentes : électriquement à l'intérieur de l'axone, grâce à la génération d'un potentiel d'action, et chimiquement d'un neurone à l'autre, via les systèmes de neurotransmission synaptique. En plus de sa morphologie le neurone peut donc être classifié en fonction du type de neurotransmetteur(s) qu'il libère. Selon le principe de Dale, chaque neurone libère toujours le même neurotransmetteur chimique, ou alors la même combinaison de neurotransmetteurs. Parmi les neurotransmetteurs les plus fréquents, on trouve le glutamate (excitatoire) et le GABA (inhibiteur). Ces derniers présentent une localisation ubiquitaire dans le cerveau. La sérotonine et la noradrénaline sont en revanche assez localisées. On retrouve par exemple la sérotonine uniquement au sein du bulbe rachidien, du pont et du mésencéphale. Enfin, l'acétylcholine ou la dopamine sont plus diffuses, mais tout de même moins ubiquitaires que le glutamate ou le GABA.

Les neurones ne sont pas les seules cellules du système nerveux central. Ils ne représentent en fait que 10% de la population cellulaire (Brooks 2002), le reste correspondant aux cellules gliales (figure 14).





**Figure 14 : Représentation d'un neurone et de son entourage.**

La majorité des cellules du cerveau est représentée par les cellules gliales. Il en existe trois types qui diffèrent par leurs fonctions. Les astrocytes contrôlent l'environnement extracellulaire pour faciliter la communication neuronale. Les oligodendrocytes sont les cellules formatrices de la gaine de myéline. Les cellules microgliales sont apparentées aux macrophages, et sont activées suite à une infection ou inflammation (Brooks 2002).

L'absence de division cellulaire a été longtemps admise comme une caractéristique majeure de l'identité neuronale. En effet la cascade de cyclines, kinases et facteurs de transcription qui régule le cycle cellulaire de n'importe quel autre type de cellule semble avoir été effacée de la biochimie quotidienne des neurones, qu'on qualifie de post-mitotiques. Ce n'est pas réellement le cas (Herrup *et al.* 2007b), les neurones sont loin d'être post-mitotiques de manière permanente, et la régulation du cycle cellulaire en leur sein est capitale. Ce contrôle assidu qui empêche la ré-entrée dans un processus de division neuronale est susceptible d'échouer. Cette échec se révèle avoir des conséquences dramatiques, comme le démontre la mort excessive de neurones ayant tenté une ré-initiation du cycle cellulaire dans certaines maladies (Herrup *et al.* 2004).

### **B. La maladie d'Alzheimer : signes cliniques et prévalence**

La maladie d'Alzheimer est souvent décrite comme la perte des qualités qui forment l'essence même de l'existence humaine. Les fonctions cognitives propres à l'homme telles que le langage, l'accès à la conscience, la capacité au raisonnement et au calcul (Kanwisher 2010), se dégradent progressivement au fur et à mesure de l'avancement de la maladie, jusqu'à une disparition totale de ces capacités en phase terminale.

Les symptômes précoces les plus courants de la maladie d'Alzheimer comprennent la confusion, les perturbations de la mémoire à court-terme, les problèmes d'attention et d'orientation, les changements au niveau de la personnalité, les difficultés à s'exprimer et les sautes d'humeurs intempestives (Papassotiropoulos *et al.* 2006; Fernandez *et al.*). La plupart du temps, ces symptômes sont assez légers et la présence de la maladie peut passer inaperçue pour la personne traversant ces symptômes, les proches ou même les professionnels de santé. La maladie d'Alzheimer n'affecte pas chaque personne de la même façon. Ses symptômes peuvent évidemment varier en termes de sévérité ou de chronologie, se recouvrir et fluctuer d'un individu à l'autre. Cependant, la progression générale de la maladie est assez prévisible (figure 15).



Le risque de développer la maladie augmente considérablement avec l'âge, affectant 1% des individus entre 65 et 69 ans, 20% entre 85 et 89 ans et enfin 38% entre 90 et 95 ans (Ferreira et al. 2008). A l'heure actuelle, le nombre de personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer dans le monde est de 36 millions (Alzheimer's 2010). Compte tenu d'une population vieillissante et du passage de la génération des baby-boomers au dessus de la barre des 65 ans, ce nombre est estimé à 66 millions en 2030 et jusqu'à 115 millions en 2050.

En moyenne, l'espérance de vie suivant le diagnostic est de 8 à 10 ans, mais il arrive que cette maladie dure jusqu'à 20 ans. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer s'avère difficile.

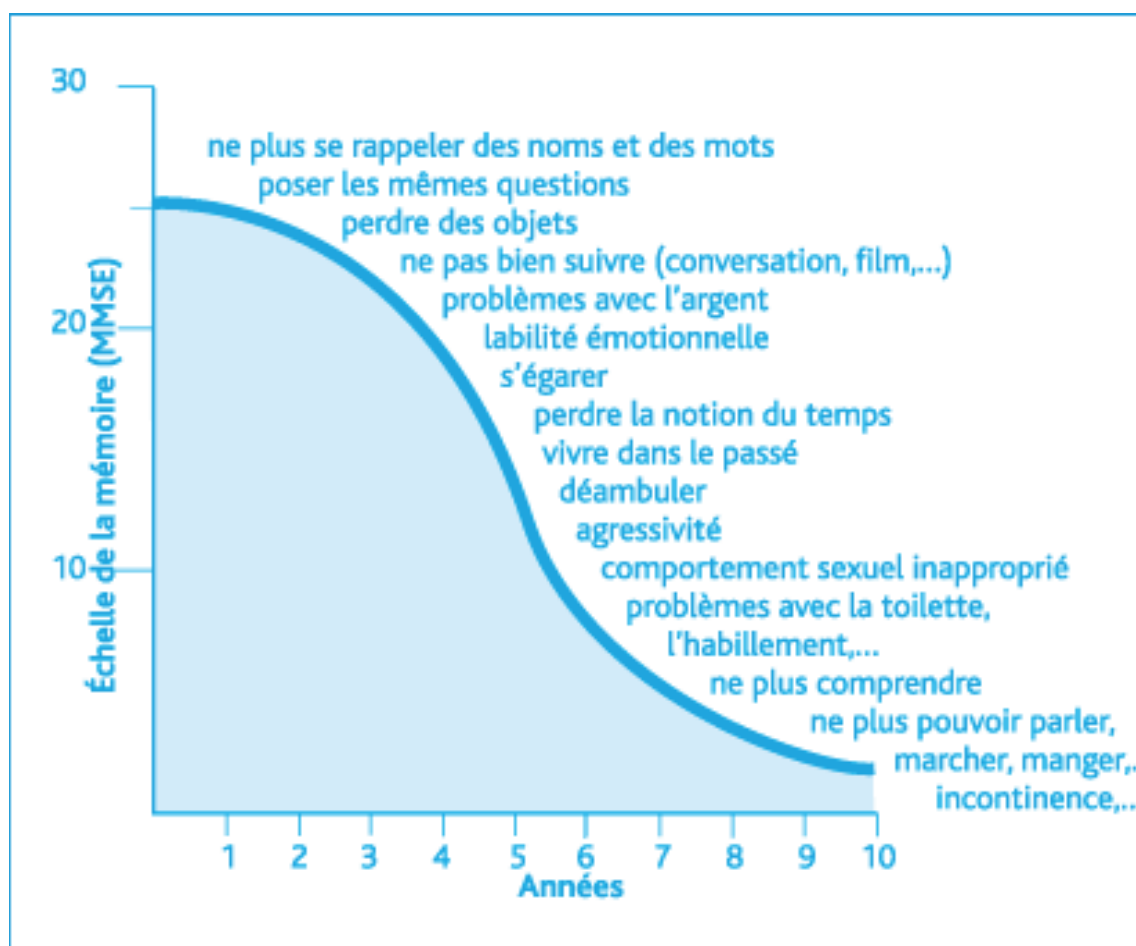


Figure 15 : Représentation schématique de l'évolution naturelle de la maladie d'Alzheimer, basée sur le test MMSE<sup>‡</sup>.

(Source : <http://www.gagnerdutempsuralzheimer.be/bienvenue.php>)

<sup>‡</sup> MMSE : « mini mental state examination » ou test de Folstein, questionnaire bref comportant 30 questions, utilisé pour détecter les perturbations cognitives.

### C. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Il n'existe à l'heure actuelle aucun diagnostic définitif de la maladie d'Alzheimer. Le diagnostic présomptif ne peut se faire que face à une démence, dont voici la définition selon l'Organisation Mondiale de la Santé (moins dramatique que la définition entendue dans le langage commun) : « *Altération progressive de la mémoire et de l'idéation, suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie de tous les jours, apparue depuis au moins six mois, et un trouble d'au moins une des fonctions suivantes : langage, calcul, jugement, altération de la pensée abstraite, praxies, gnosies ou modifications de la personnalité* ».

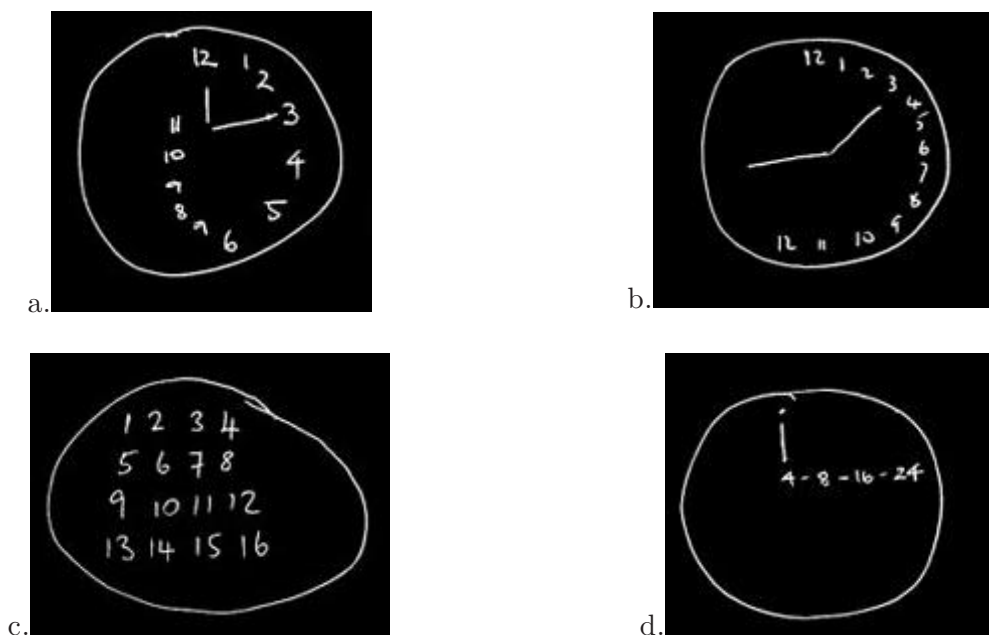
Cependant, lorsqu'il est confronté à un syndrome démentiel, la tâche du neurologue n'est pas simple. Il doit d'abord s'assurer qu'il n'existe pas de cause curable, comme une tumeur ou une carence vitaminique. Si les examens permettent d'exclure cette possibilité, il orientera son diagnostic vers une maladie neurodégénérative à perte neuronale diffuse, puisque les fonctions affectées sont variées et indiquent que plusieurs zones cérébrales sont touchées. Or, la maladie d'Alzheimer est loin d'être la seule forme de démence dans cette catégorie. De nombreuses affections associées à une neurodégénérescence ont été décrites et partagent souvent de nombreux symptômes. L'un des tests classiques de la mémoire épisodique ne permet par exemple pas d'identifier les mécanismes à l'origine des déficits de la récupération de l'information : i) trouble de l'attention et donc de l'encodage, comme dans la dépression ? ii) trouble de la récupération des informations encodées, comme dans la démence fronto-temporale ? iii) ou trouble de la consolidation de la trace mnésique, comme dans la maladie d'Alzheimer ? Un autre test (Grober *et al.* 1988), le FCSRT (Free and Crued Selective Recall Reminding Test) permet en revanche d'identifier un syndrome amnésique de type hippocampique, le déficit du rappel libre<sup>§§</sup>, qui est déjà très sévère au début de la

---

<sup>§§</sup> Test du rappel libre : donner à individu âgé une liste de noms à apprendre et lui demander ensuite ceux qu'il a retenus, sans l'orienter.

démence alzheimerienne. Il a été montré que les sujets présentant un trouble du rappel libre avaient un risque important de développer la maladie d'Alzheimer (Sarazin *et al.* 2007).

Le trouble de la mémoire est l'évènement le plus précoce dans la maladie d'Alzheimer mais constitue un signe isolé. Des consultations spécialisées impliquant des tests neuropsychologiques plus étendus vont contribuer à établir un diagnostic plus « probable ». Ces tests incluent l'évaluation d'autres fonctions cognitives comme les facultés de calcul, certaines praxies, comme de savoir dessiner, ou certaines gnosies, comme de savoir lire l'heure. Le test de l'horloge (figure 16), évaluant la capacité d'un individu à placer 12h15 sur une horloge que lui-même a dessinée, réunit par exemple les deux derniers éléments de ces tests neuropsychologiques.



**Figure 16 : Test de l'horloge.** (a) L'individu a réussi le test avec succès. Pour les dessins (b), (c) et (d), les résultats sont anormaux et témoignent d'un stade prédéméntiel voire d'une démence avérée.

Les résultats des tests neuropsychologiques sont d'autant plus valables qu'ils sont corrélés à des données paracliniques comme les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien ou l'imagerie. Un groupe de travail portant sur les marqueurs moléculaires et biochimiques de la maladie d'Alzheimer a défini qu'un marqueur devait témoigner de lésions définissant la maladie avec une spécificité et une sensibilité d'au moins 80% (Group 1998). Citons dans cette catégorie les biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR) que sont le peptide A $\beta$ 42 (constituant majeur des plaques séniles) et la protéine tau (constituant majeur des enchevêtrements neurofibrillaires). Dans le LCR de patients atteints d'Alzheimer, on a observé une augmentation de la protéine Tau totale, qui différencie les malades des individus sains avec une sensibilité de 81% et une spécificité de 90%. En parallèle, une diminution de la concentration du peptide A $\beta$ 42 a été observée, avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 90% (Blennow *et al.* 2003). Les techniques d'imagerie en résonance magnétique (IRM) ont montré qu'une atrophie du lobe temporal était fréquente chez les patients atteints d'Alzheimer et les différencierait des sujets sains avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 85% (De Leon *et al.* 1997; Jack *et al.* 2002). La neuroimagerie fonctionnelle par les techniques de TEP (tomographie par émission de positons) ou TEMP (tomographie par émission monophotonique) ont montré respectivement que la maladie d'Alzheimer s'accompagnait d'une réduction du métabolisme glucidique et d'une diminution du flux sanguin dans le cortex cingulaire postérieur (Scheltens *et al.* 2002) .

Ces biomarqueurs sont prometteurs mais ne fournissent qu'un diagnostic différentiel et certaines de ces études ont été réalisées *post mortem*. A l'heure actuelle, il n'existe pas de diagnostic biologique définitif, utilisable du vivant de l'individu.

La confirmation du diagnostic ne peut se faire que *post mortem* et l'autopsie doit révéler la présence de deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires. Certains auteurs ont pu corréler l'étendue de ces lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer au degré de sévérité

de la démence encourue par les patients. Pour Braak et Braak par exemple, les enchevêtrements neurofibrillaires évoluent selon six stades qui correspondent à l'extension progressive des lésions et suivent une chronologie parallèle à l'évolution des troubles cliniques (Braak *et al.* 1991). L'autopsie n'est malheureusement pas une pratique culturelle courante en France (1 cas de démence sur 3000) (Camu *et al.* 2003) mais pourrait permettre de mieux comprendre l'étiologie complexe de la maladie d'Alzheimer.

## **D. Etiologie de la maladie d'Alzheimer**

### **1. Découverte de la maladie et première mise en évidence de lésions cérébrales spécifiques.**

En 1907, Alois Alzheimer décrit pour la première fois la démence qui porte désormais son nom (Alzheimer 1907). Lors de l'autopsie de la patiente, dont il a suivi l'évolution symptomatique, il note la présence de « nombreux foci, causés par le dépôt d'une substance **curieuse** dans le cortex » (maintenant connus comme les plaques amyloïdes ou plaques séniles). Il reporte également des « changements très **curieux** au niveau des neurofibrilles » (à présent établis comme les enchevêtrements neurofibrillaires). On sait aujourd'hui que cette patiente, touchée par la maladie autour de sa cinquantième année, était atteinte d'une forme familiale (génétique) d'Alzheimer. On sait également que toutes les formes génétiques sont liées au clivage protéique anormal de la protéine APP (amyloid precursor protein).

### **2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer**

La maladie d'Alzheimer se développe lentement et occasionne des changements dans le cerveau bien avant qu'il n'y ait des changements évidents dans la mémoire, la pensée, la parole ou le comportement d'une personne. Le cortex cérébral d'un individu atteint de la maladie d'Alzheimer présente une taille réduite comparé au cerveau d'un individu sain du

même âge. Une publication récente indique que le cerveau commence à rétrécir dix ans avant le diagnostic de la maladie (Dickerson *et al.* 2011). Cette réduction cérébrale des régions impliquées dans les processus de mémoire et d'apprentissage est due à une mort massive des neurones, essentiellement corticaux et hippocampaux (Shackelford 2006) et à une dégénérescence des synapses (Mattson 2004). Nous venons d'évoquer le fait que le diagnostic biologique définitif de la maladie d'Alzheimer par une analyse *post-mortem* des cerveaux de patients, requérait la détection de deux lésions histopathologiques caractéristiques, les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles (Braak *et al.* 1991). Les enchevêtrements de neurofibrilles sont liés à l'accumulation de la protéine Tau, hyperphosphorylée dans son état pathologique. Les plaques séniles ou amyloïdes sont situées dans l'environnement extracellulaire des neurones et constituées du peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ). Chacune de ces lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer fera l'objet d'un paragraphe détaillé.

#### **a) De la protéine Tau aux enchevêtrements neurofibrillaires**

La protéine Tau est une protéine hydrophile associée aux microtubules. Il en existe six isoformes dans le cerveau adulte humain, chacune comportant trois ou quatre domaines de liaison aux microtubules. La protéine Tau positivement chargée se lie à la tubuline négativement chargée. Ceci a pour effet de stabiliser les microtubules et de faciliter le transport axonal de nutriments et neurotransmetteurs. L'interaction entre Tau et les microtubules est régulée par l'action conjointe des kinases et des phosphatases, qui conditionnent l'état de phosphorylation de Tau (Edelberg *et al.* 1996).

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est anormalement phosphorylée, ce qui diminue considérablement son affinité pour les microtubules. A l'issue de cette hyperphosphorylation pathologique, la protéine Tau se dissocie des microtubules, compromettant alors leur stabilisation et leur fonctionnement (Bramblett *et al.* 1993). Ainsi libérée, la protéine Tau hyperphosphorylée présente une solubilité beaucoup plus

faible et s'avère plus sensible aux modifications chimiques induites par le stress oxydant, qui lui occasionnent des changements conformationnels. On assiste à l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée, sous forme de paires hélicoïdales de filaments (PHF : paired-helical filaments). Les PHF s'associent à leur tour pour former les enchevêtrements neurofibrillaires (NFT : Neuro-Fibrillary Tangles) (Barghorn *et al.* 2002). Le nombre et la localisation de ces structures sont étroitement corrélées avec le niveau de démence observé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

### **b) De l'APP aux plaques séniles**

L'APP (Amyloid Precursor Protein) est une protéine transmembranaire, codée par un gène situé sur le chromosome 21. Son épissage alternatif conduit à la production de plusieurs isoformes, dont la taille varie de 695 à 770 acides aminés. L'APP est constituée d'un long domaine N-terminal du côté extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et finalement d'une courte partie C-terminale cytoplasmique. Les fonctions physiologiques de l'APP sont encore peu connues mais pourraient jouer un rôle important dans la survie neuronale, la croissance des dendrites et la plasticité synaptique (Mattson 1997). L'APP présente plusieurs sites enzymatiques de clivage pour les sécrétases  $\alpha$ ,  $\beta$  (BACE) et  $\gamma$ . Suivant l'enzyme mise en jeu, les produits de clivage de l'APP ainsi que leurs fonctions seront différents. Dans les paragraphes suivants, nous distinguerons le processus physiologique non-amyloïdogène de l'APP de son processus pathologique amyloïdogène, pour en détailler les conséquences intra et extra-neuronales (figure 17).

#### ***(1) Le processus de clivage non-amyloïdogène de l'APP***

Le clivage d'APP par la  $\alpha$ -sécrétase aboutit au relargage d'une entité sAPP- $\alpha$  dans l'environnement extraneuronal, ainsi qu'un fragment carboxy-terminal de 83 acides aminés (C83) dans le cytoplasme. La production de la sous-unité sAPP- $\alpha$  augmente sous

l'influence d'une stimulation électrique, suggérant que l'activité neuronale favorise le clivage de l'APP par l' $\alpha$ -sécrétase et protège les neurones du processus amyloïdogène pathologique (Mattson 1997). De plus, l'entité sAPP- $\alpha$  améliorerait la plasticité synaptique dans les processus de mémorisation et d'apprentissage, en modulant l'activité de certains canaux ioniques ou facteurs de transcription (Scheuner *et al.* 1996).

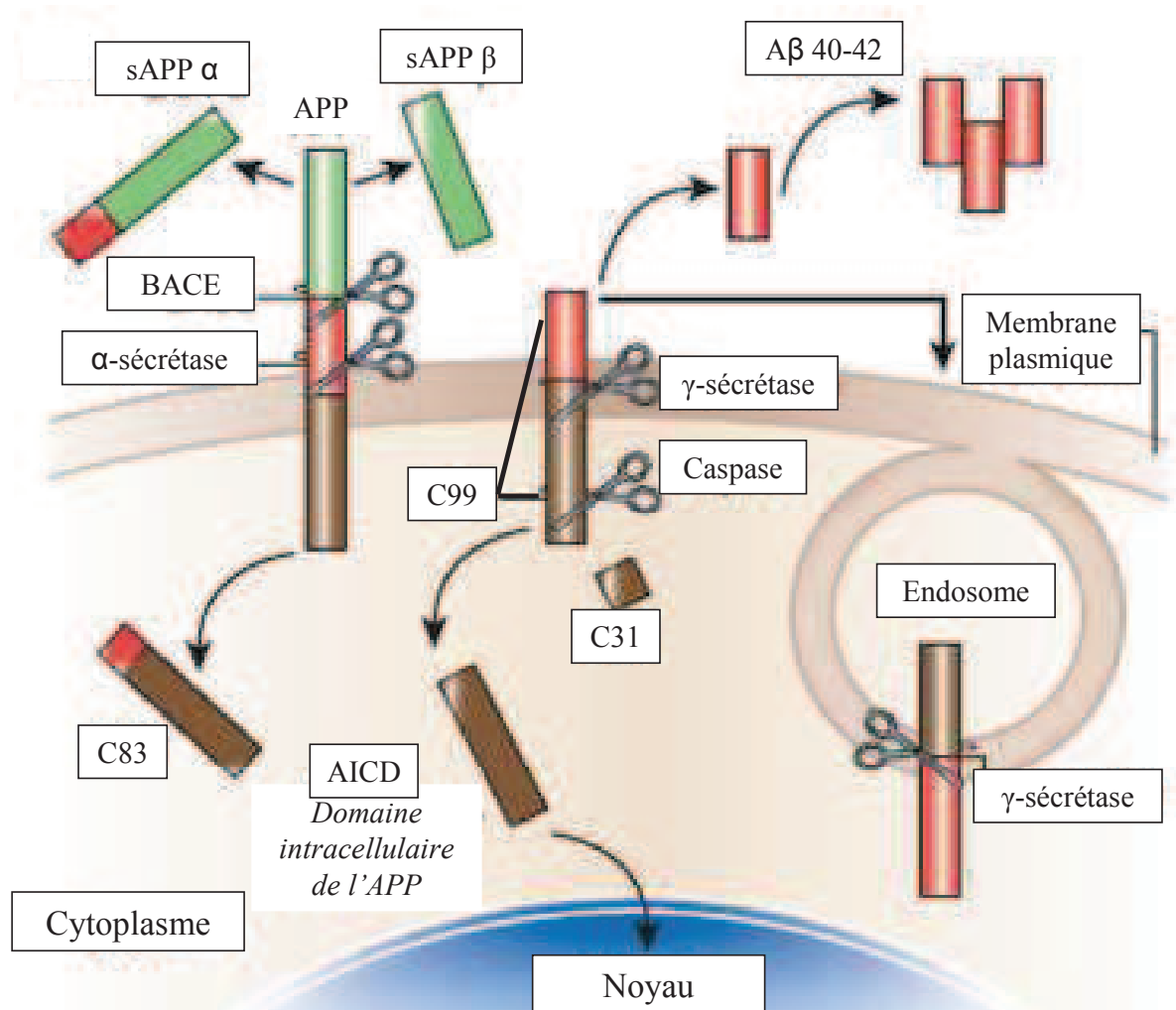


Figure 17 : Différents processus protéolytiques de la protéine APP et les fragments générés. Adapté de (Mattson 2004)



**(2) Le processus de clivage amyloïdogène de l'APP  
et la cascade amyloïde**

Le processus amyloïdogène de l'APP implique un clivage séquentiel par les sécrétases BACE et  $\gamma$  (Selkoe 2001). BACE entraîne le relargage d'une entité sAPP- $\beta$  en N-terminal de l'APP. Du côté C-terminal, un second fragment de 99 acides aminés est généré à partir de la coupure de l'APP par la BACE. Ce fragment est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase, conduit au relargage d'A $\beta$  dans l'environnement extracellulaire et libère l'AICD (APP intracellular domain) à l'intérieur de la cellule. L'activité  $\gamma$ -sécrétase est dépendante d'autres protéines, parmi lesquelles les présénilines (PS1 et PS2) (De Strooper *et al.* 2003). Un dernier clivage d'APP/C99 par les caspases conduit à la génération d'un peptide neurotoxique, C31 (Lu *et al.* 2000).

Différentes isoformes du peptide A $\beta$  peuvent être générées à l'issue du processus amyloïdogène, allant de 39 à 43 acides aminés. Les formes prépondérantes sont A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 et toutes deux sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Hautement insoluble et oligomérisante, l'isoforme A $\beta$ 42 est considérée comme la plus neurotoxique et s'avère être le constituant majeur des plaques séniles (Jarrett *et al.* 1993).

Une fois sécrétés, les oligomères d'A $\beta$  exercent leur neurotoxicité par la génération d'un stress oxydant, la dérégulation des systèmes de neurotransmissions, la perte de l'homéostasie du calcium, le déclenchement d'une réponse inflammatoire et l'activation de voies de signalisation qui conduisent à la mort neuronale (Mattson 2004) (Suh *et al.* 2002).

Les peptides A $\beta$ , et spécialement l'isoforme A $\beta$ 42, sont propices à l'agrégation. Les peptides A $\beta$  commencent par s'accumuler en amas fibrillaires diffus et évoluent vers la formation des plaques amyloïdes en présence d'autres éléments (protéines ou métaux) dans les retranchements de la maladie (Clippingdale *et al.* 2001). Si les plaques séniles constituent le processus final de l'agrégation d'A $\beta$ , de nombreuses études démontrent que les formes solubles intermédiaires sont plus dangereuses pour les neurones, par leur

association aux troubles cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer (McLean *et al.* 1999; Hoshi *et al.* 2003).

Si l'origine de la toxicité exercée par A $\beta$  (oligomères, amas diffus, plaques) reste discutée (Klein *et al.* 2001; Hardy *et al.* 2002) le rôle fondamental joué par le processus amyloïdogène dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer est indéniable et repose sur l'implication de l'APP dans toutes les formes génétiques de la maladie d'Alzheimer.

Dans les formes d'Alzheimer à **transmission autosomique dominante familiale**, les mutations se retrouvent au niveau du gène codant pour l'APP elle-même, mais également au niveau des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2). Une autre forme familiale, réside en un polymorphisme observé au niveau de l'Apolipoprotéine E (APOE), impliquée dans la clairance d'A $\beta$  (Deane *et al.* 2008). Cette forme familiale est qualifiée d'**agrégation familiale**, car elle ne suit pas un schéma classique d'hérédité mendélienne. Il existe trois allèles de l'APOE :  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ . Posséder un allèle  $\epsilon 2$  ou  $\epsilon 4$  suggèrent respectivement un risque moindre ou plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer. Cependant, tous les malades d'Alzheimer ne possèdent pas l'allèle  $\epsilon 4$  et tous ceux qui la possèdent ne développent pas forcément la maladie.

Si l'origine génétique ne représente que 5 à 10% des cas (Migliore *et al.* 2008), et ne permet pas à elle seule d'expliquer la complexe étiologie de cette pathologie multifactorielle qu'est la maladie d'Alzheimer, il s'avère que les **formes sporadiques** présentent aussi le peptide A $\beta$  et l'accumulation de plaques séniles.

Ce sont toutes ces observations autour d'A $\beta$  qui ont conduit à l'élaboration de la théorie de la cascade amyloïde (figure 18).

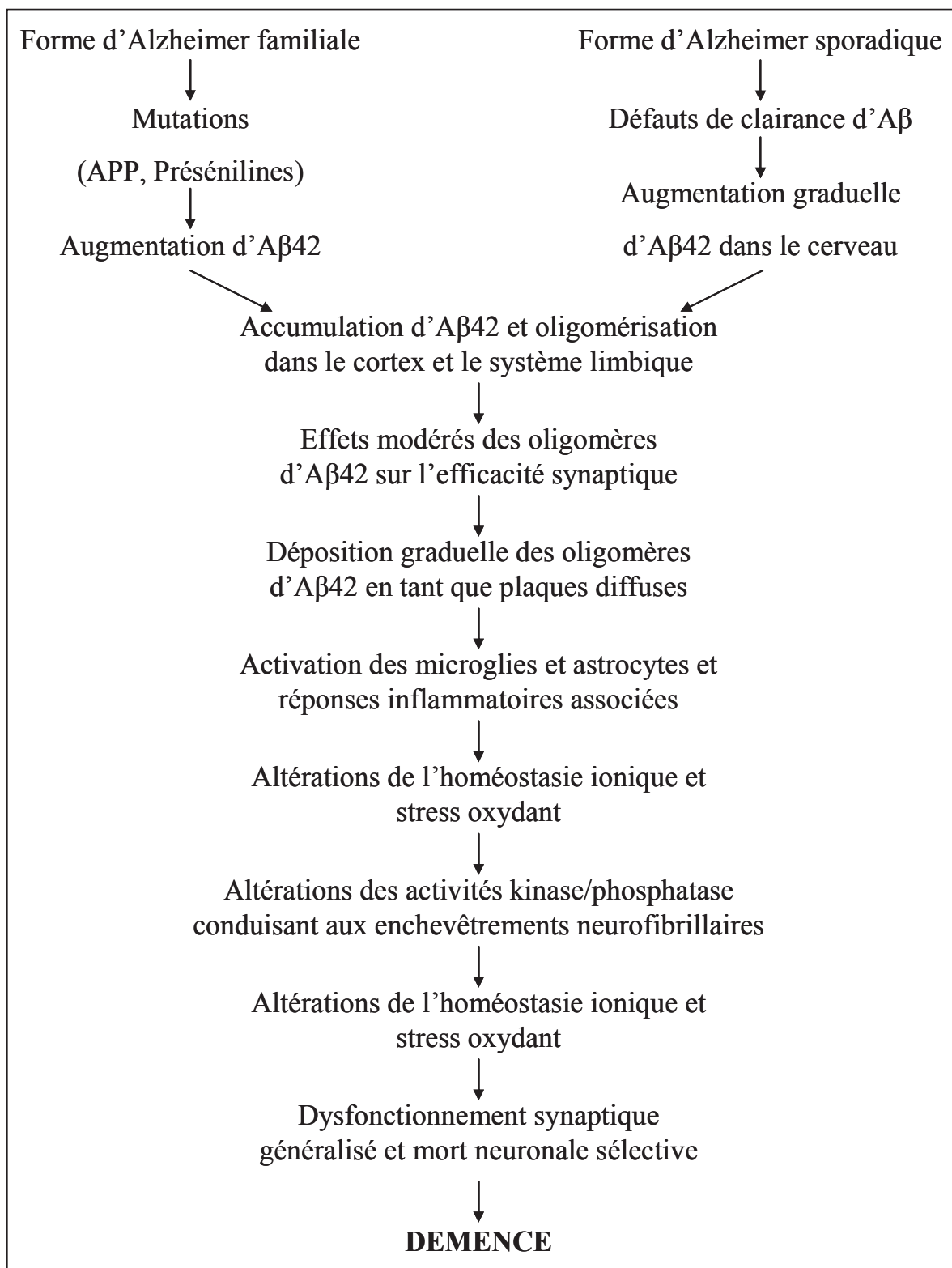


Figure 18 : L'hypothèse de la cascade amyloïde de la maladie d'Alzheimer.

(3) La cascade amyloïde revisitée

Très récemment, Karl Herrup a revisité l'hypothèse de la cascade amyloïde, qu'il ne présente d'ailleurs plus en tant que cascade, mais en tant que cycle (Herrup 2010) (figure 19). Pour lui, l'augmentation d'A $\beta$  n'est plus le point de départ de la maladie. Il part du principe bien établi que la principale cause de la maladie d'Alzheimer est l'âge. Le fait de vieillir induit naturellement un déclin cognitif, qui n'évoluera en maladie d'Alzheimer que sous l'effet d'un déclencheur additionnel : il introduit alors le terme de « AD specific injury ». Il peut s'agir d'un traumatisme crânien, d'un arrêt vasculaire cérébral, du diabète, d'un événement de stress mais aussi de facteurs de risque génétiques. Cet événement déclencheur induit alors l'activation des microglies et les réponses inflammatoires. Cette étape s'intègre dans le cycle amyloïde. Ainsi, les réponses immunes stimulent la production d'A $\beta$ , et la production d'A $\beta$  stimule les réponses immunes. Ces dernières sont, indépendamment du cycle amyloïde, à l'origine d'une physiologie altérée des cellules nerveuses, qui inclut entre autre l'augmentation du stress oxydant.

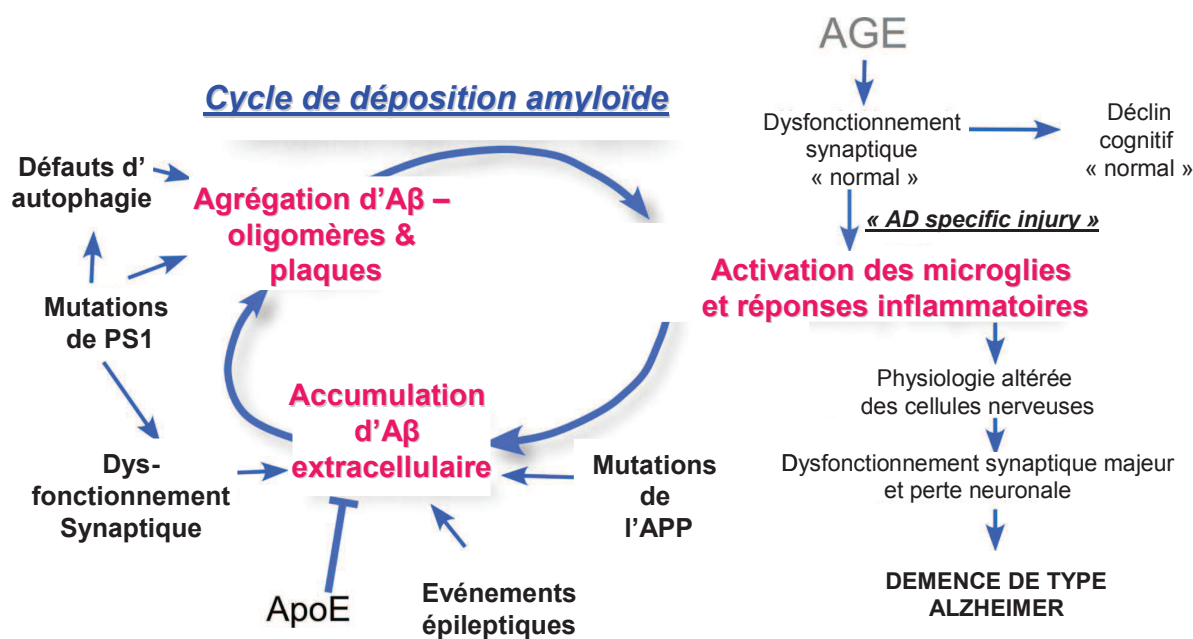


Figure 19 : le cycle de déposition amyloïde (Herrup 2010).

### 3. Le rôle du stress oxydant dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

Le terme stress oxydant définit un état pathologique de la cellule, où le taux de ROS dépasse le taux d'enzymes et vitamines antioxydantes. La balance physiologique entre ces deux composantes n'est plus respectée. Le cerveau est un organe spécialement sensible au stress oxydant. Il possède relativement peu d'enzymes antioxydantes en comparaison à d'autres organes (Markesbery 1997) et montre une consommation d'oxygène élevée. En effet, les neurones ont un faible pouvoir glycolytique (Moreira *et al.* 2008) et sont donc extrêmement dépendants de la phosphorylation oxydative pour générer de l'énergie. La disponibilité du glucose est d'autant plus réduite dans la maladie d'Alzheimer dans les régions cérébrales riches en plaques amyloïdes (Beal 1995). Comme nous l'avons déjà mentionné, la chaîne respiratoire au sein des mitochondries est souvent à l'origine du relargage intempestif de ROS. Des déficiences au niveau des mitochondries et dans les complexes intervenant dans la phosphorylation oxydative ont été reportées dans la maladie d'Alzheimer (Shoffner 1997) et pourraient augmenter la quantité de ROS libérée. La perte de l'homéostasie des métaux constitue après la mitochondrie, une seconde source de ROS. Les métaux de transition comme le fer et le cuivre sont à l'origine d'un stress oxydant via la réaction de Fenton. Dans le cortex et l'hippocampe des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une accumulation notable de Fer est retrouvée de manière concomitante avec les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires (Smith *et al.* 1997). L'APP possède un site de liaison au cuivre, et il a été établi que la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par l'APP conduisait à la génération d' $\bullet\text{OH}$ . Il a également été montré que le clivage d'APP en  $\text{A}\beta$  était promu en présence de Fer (Tamagno *et al.* 2005). Or  $\text{A}\beta$  constitue une troisième source probable de ROS. En effet, il a été montré qu' $\text{A}\beta$  était à l'origine d'une accumulation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans des cultures de neuroblastomes (Behl *et al.* 1994) et aussi de neurones hippocampaux (Mattson *et al.* 1995).

L'hypothèse du stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer est donc soutenue par les vastes sources de ROS que l'on retrouve dans l'environnement neuronal. Les ROS sont susceptibles d'endommager toutes les macromolécules biologiques et la détection des lésions oxydatives correspondantes est fréquente. Les protéines subissent des réactions de carbonylation et de nitration ainsi que des glycations et glycoxydations au niveau de leurs résidus lysine (Smith *et al.* 1995) (Lyras *et al.* 1997; Shackelford 2006). Les lipides formés d'acides gras insaturés, comme ceux présents dans les membranes cellulaires sont particulièrement sensibles au stress oxydant et subissent la peroxydation lipidique (Subbarao *et al.* 1990) (Davydov *et al.* 2003). Enfin, l'augmentation des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN mitochondrial et nucléaire traduit un environnement riche en ROS (Kadioglu *et al.* 2004) (Mecocci *et al.* 1998) (Lovell *et al.* 2007). Gabbita (Gabbita *et al.* 1998) a montré une augmentation du taux de pyrimidines ou purines oxydées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, avec une proportion de 8oxoG élevée. Une autre étude par Lovell *et al.* (Lovell *et al.* 1999) rapporte la présence de 8oxoG dans le liquide céphalo-rachidien de patients. L'augmentation de la 8oxoG a été retrouvée jusque dans les lymphocytes (Morocz *et al.* 2002) et plus généralement les leukocytes (Migliore *et al.* 2005) de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Situé au cœur de la mitochondrie et donc de la chaîne de transport d'électron, l'ADN mitochondrial est une cible privilégiée pour les ROS. L'ADN mitochondrial est d'autant plus fragile qu'il ne dispose pas d'histones protectrices. Les dommages à l'ADN mitochondrial sont rapportés dans de nombreuses études de la maladie d'Alzheimer et se révèlent parfois plus importants que les dommages à l'ADN nucléaire (Wang *et al.* 2005).

L'augmentation des dommages à l'ADN semble être l'un des événements les plus précoces dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer (Nunomura *et al.* 2001) (Nunomura *et al.* 2006) (Nunomura *et al.* 2009) et pourraient à plus long terme entraîner la mort neuronale par apoptose (Wang *et al.* 2005) (Noussipikel *et al.* 2003).

#### 4. Lien entre dommages à l'ADN et apoptose dans les neurones

Les causes de la mort neuronale massive par apoptose, qui se produit dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, sont mal connues. Le cheminement complexe qui lie l'agrégation des plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires à cette issue fatale reste à définir. Cependant, il est aujourd'hui certain que cela implique des événements associés au cycle cellulaire (Herrup 2010). Il y a une quinzaine d'années, Vincent et Davies montrent pour la première fois que des composantes du cycle cellulaire sont présentes dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Vincent *et al.* 1996). Rapidement, d'autres publications relatèrent également la présence de protéines du cycle cellulaire après autopsie des cerveaux de patients (Arendt *et al.* 1996; McShea *et al.* 1997; Busser *et al.* 1998). Mais pourquoi ces neurones se remettent-ils en cycle ? L'une des explications probables est la présence de dommages oxydatifs, au niveau de la molécule d'ADN, souvent accumulés depuis de longues années. Kruman *et al.* (Kruman *et al.* 2004b) ont montré que le traitement par des agents génotoxiques de neurones post-mitotiques en culture engendrait une ré-entrée dans le cycle cellulaire abortive, suivie d'une mort cellulaire par apoptose. Une hypothèse pour expliquer le phénomène dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer est que les dommages oxydatifs de l'ADN ne sont pas assez réparés dans les neurones. Ces dommages non réparés seraient alors susceptibles d'interférer avec la transcription ou d'autres processus liés à l'ADN. Le contrôle crucial du cycle cellulaire, qui empêchait les neurones d'entamer un processus de division, serait alors perdu et entraînerait l'apoptose en contrepartie (Herrup *et al.* 2004).

### III. Déficience des systèmes de réparation et maladie

#### d'Alzheimer

L'implication de la réparation de l'ADN, bien admise dans la cancérogénèse, est en revanche moins évidente dans une pathologie telle que la maladie d'Alzheimer. En effet, les cellules touchées par la maladie d'Alzheimer, les neurones, sont considérées comme post-mitotiques. Certains soulèvent alors cette question : si elles ne se divisent pas, à quoi bon réparer leur ADN, puisqu'elles ne transmettront pas de mutations à la génération de cellules suivantes (Fishel *et al.* 2007). Cependant, l'ADN est nécessaire à la synthèse des protéines, et les dommages à l'ADN non réparés peuvent faire office de mutagènes transcriptionnelles. Il est d'ailleurs avéré que les neurones réparent préférentiellement les gènes transcrits (Nospikel *et al.* 2003). Mais nous avons vu que si un défaut de réparation de l'ADN est susceptible d'engendrer des mutations, l'autre conséquence d'un dommage à l'ADN non pris en charge est à terme de déclencher l'apoptose. Or, l'apoptose neuronale est au cœur de la maladie d'Alzheimer, puisque la mort des neurones entraîne une réduction de la masse cérébrale, une perte de connections entre les différentes structures et donc la perte progressive des fonctions cognitives qui leur sont associées.

Par ailleurs, le nombre de maladies héréditaires dues à une mutation dans l'un des gènes codant pour une protéine de réparation, qui présentent ou évoluent en une neurodégénérescence (Brooks 2002; Brasnjevic *et al.* 2008; Brooks *et al.* 2008; Martin 2008), souligne la nécessité de réparer les dommages des cellules neuronales.

On ne peut donc pas négliger l'importance de la réparation de l'ADN dans le cerveau, organe de nature spécialement sensible au stress oxydant. Les sources de ROS sont nombreuses et les dommages oxydatifs au niveau de la molécule d'ADN s'accumulent



sans être éliminés. C'est cette persistance (et non une augmentation temporaire) qui suggère un défaut dans les systèmes de réparation associés.

Il se trouve que les exemples de diminution ou plus globalement de dérégulation de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN sont de plus en plus nombreux.

Weissman *et al.* ont par exemple rapporté des défauts dans le système de réparation par excision de base (BER). Dans leur étude, les capacités d'excision de certaines lésions (8oxoG, site AP) ainsi que l'activité de gap-filling de la pol $\beta$  s'avèrent réduites dans des extraits cellulaires réalisés à partir de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, en comparaison à ceux de personnes du même âge non atteintes (Weissman *et al.* 2007). Des résultats similaires concernant plus particulièrement l'activité d'OGG1 ont été obtenus par Shao *et al.* (Shao *et al.* 2008). Outre le BER, une diminution de la quantité de protéines du complexe RMN participant à la réparation des cassures double brin a également été établie (Jacobsen *et al.* 2004). Une autre équipe a montré que la capacité de liaison à l'ADN des protéines Ku70 et Ku80 du NHEJ était diminuée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Davydov *et al.* 2003). Dans cette étude, une diminution de la quantité des protéines DNA-PKcs et Ku est également rapportée.

Enfin, Lu *et al.* ont montré que de nombreux gènes de réparation sont surexprimés chez des sujets âgés, mais sains (Lu *et al.* 2004). Les observations autour d'une diminution des capacités de réparation pourraient donc être spécifiques à la maladie d'Alzheimer et non au vieillissement naturel.



## Objectifs

L'implication des lésions et de la réparation de l'ADN dans la maladie d'Alzheimer fait l'objet de beaucoup moins d'études que dans la cancérogénèse (24100 résultats sur PubMed pour les mots clés *cancer+DNA repair* contre 277 pour les mots clés *neurodegeneration+DNA repair*). Pourtant, de nombreuses pathologies impliquant une déficience génétique au niveau d'acteurs de la réparation de l'ADN évoluent vers des phénomènes de neurodégénérescence, suggérant un rôle possible d'une perturbation des systèmes de réparation dans la maladie d'Alzheimer. Certaines études, portant sur les capacités de réparation d'extraits protéiques issus de cerveaux de patients, soulignent notamment une diminution globale du système BER. Les données présentées dans ce genre de travail sont obtenus à partir d'échantillons récoltés *post-mortem* et dépeignent les caractéristiques tardives de la maladie multifactorielle qu'est l'Alzheimer. Dans le but de mieux comprendre l'étiologie **précoce** de cette forme de démence, nous avons choisi de nous concentrer sur un seul des facteurs spécifiques de la maladie, le peptide neurotoxique A $\beta$ . Ce dernier est en effet connu pour générer un stress oxydant, susceptible d'endommager toutes les macromolécules biologiques, parmi lesquelles l'ADN. Afin d'analyser la réponse cellulaire face aux dommages potentiellement engendrés par A $\beta$ , nous nous proposons de préciser les effets de ce peptide neurotoxique, d'un point de vue mécanistique, sur les systèmes de réparation d'une lignée de neuroblastome humain. Cette lignée porteuse de la mutation suédoise de la protéine APP, favorisant un clivage amyloïdogène par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases, possède la caractéristique de sécréter le peptide A $\beta$  à des concentrations très physiologiques. Afin d'évaluer la pertinence de ce modèle dans l'étude de la maladie d'Alzheimer, nous réaliserons dans un premier temps des tests permettant de déceler des caractéristiques communes entre l'environnement des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et notre lignée. La cytotoxicité de certains agents de stress largement impliqués dans cette pathologie, sera donc analysée : le peroxyde d'hydrogène sera utilisé pour reproduire un stress

## *Objectifs*

oxydant et le sulfate de cuivre pour mimer la perte d'homéostasie des métaux. L'augmentation du taux de ROS et des dommages oxydatifs à l'ADN étant bien documentée dans les études traitant de la maladie d'Alzheimer, nous nous attacherons à mesurer ces deux paramètres au sein de notre lignée, en couplant ou non A $\beta$  à un stress oxydant ou métallique. Après la caractérisation de notre modèle, nous analyserons la réponse cellulaire à l'issue d'un stress oxydant ou métallique, combiné ou non à la présence d'A $\beta$ , à travers le système associé à la réparation des lésions oxydatives, le BER. L'expression des gènes du BER sera évaluée et confrontée à l'expression protéique. Deux tests de mesure des activités d'excision de petites lésions caractéristiques du BER seront utilisés en parallèle pour obtenir des résultats complémentaires.

A l'issue de cette étude approfondie sur le BER, un autre système de réparation sera observé. En effet, si le BER est par excellence le système de réparation des petites lésions oxydatives, il existe un autre type de lésions susceptibles d'être engendrées par un stress oxydant, qui sont en conséquences prises en charges par d'autres systèmes de réparation, comme le NER, ou les systèmes de réparation des cassures double brin (HR ou NHEJ). Ce sont d'ailleurs des déficiences génétiques au niveau d'acteur de ces systèmes de réparation qui sont à l'origine de pathologies évoluant vers des phénomènes de neurodégénérescence (XP, CS, ATM, ...). D'autre part, la compartimentation conceptuelle des systèmes de réparation semble de moins en moins stricte. Il existe en effet un recouvrement partiel entre les voies de réparation et même avec d'autres fonctions cellulaires (apoptose, contrôle du cycle cellulaire). Nous nous intéresserons donc dans la deuxième partie de notre travail, à étudier les effets du peptide A $\beta$  combiné à un stress oxydant sur le système NER, aux niveaux transcriptomique et des activités protéiques. Nous comparerons finalement les résultats à ceux obtenus à l'issue d'un stress plus caractéristique du NER, comme les UVC.

Enfin, la mesure de l'expression des gènes de réparation d'autres systèmes (NHEJ, HR et MMR) sera réalisée.

## Chapitre II : Résultats

### I. La lignée APP751, représentative de la maladie d'Alzheimer ?

#### A. Introduction

La maladie d'Alzheimer est une maladie propre à l'homme, et la grande majorité des cas sont sporadiques : l'établissement de modèles animaux transgéniques s'avère donc particulièrement difficile. Les formes génétiques de la maladie d'Alzheimer ont cependant permis la conception de modèles surexprimant les mutations humaines de l'APP ou des présénilines. Certains modèles murins surexpriment une protéine Tau mutée, bien qu'aucune de ses mutations n'ait été impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Camu *et al.* 2003). Une revue de Spires (Spires *et al.* 2005) référence les principaux modèles de rongeurs mimant la pathologie de la maladie d'Alzheimer (tableau 3). Sur la base de cinq critères analysés pour évaluer la pertinence des différents modèles, aucun ne semble entièrement pertinent. De plus, les critères pris en compte comme par exemple la formation de plaques amyloïdes ou la perte neuronale, sont des événements tardifs dans l'étiologie de la maladie. Dans notre étude, nous avons décidé de nous concentrer sur les effets **précoces** de la sécrétion du peptide A $\beta$ , connu pour générer un stress oxydant, sur les dommages et les systèmes de réparation de l'ADN. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur culture cellulaire et d'utiliser un modèle simple, mettant en jeu une mutation récurrente de l'isoforme à 751 acides aminés de l'APP (APP751). Cette mutation a été mise en évidence pour la première fois au sein d'une famille suédoise et est de ce fait identifiée comme l'APP swedish (APP<sup>sw</sup>). Il s'agit d'une double mutation faux-sens qui engendre le remplacement en position 670/671 des codons Lysine/Méthionine par des codons Asparagine/Leucine : ceci a pour effet de favoriser le clivage amyloïdogène de l'APP par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases. Cette double mutation a été clonée au sein d'un plasmide, lui-même transfecté au sein d'une lignée de neuroblastome humain SH SY5Y.

Nom souris	Gènes surexprimés	Plaques	Tau-P	NFT	Perte Cellulaire	Déficits de la mémoire
PDAPP	APP minigene, mutation V717F	Oui	Oui	Non	Non	Oui
Tg2576	APP Swe cDNA (695)	Oui	Oui	Non	Non	Oui
APP23	APP Swe cDNA (751)	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
TgCRND8	APP cDNA Swe et mutations V717F	Oui	Nr	Non	Nr	Oui
APPSwe TgC3-3	APP cDNA (695) Swe	Oui	Nr	Nr	Nr	Nr
PSAPP	Tg2576 et PSI M146L	Oui	Oui	Nr	Mineur	Oui
ALZ7	4RTau	Non	Oui	Non	Non	Nr
ALZ17	4RTau	Non	Oui	Non	Non	Nr
7TauTg	3RTau	Non	Oui	Oui	Nr	Nr
JNPL3	4R tau P301L	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
TAPP	Tg2576x JNPL3	Oui	Oui	Oui	Nr	Nr
3xTg-AD	APP (Swe), PS1 (M146V), tau (P301L)	Oui	Oui	Oui	Nr	Nr

**Tableau 3 : Modèles de souris transgéniques pour la pathologie d'Alzheimer (adapté de (Spire et al. 2005)).** Tau-P : Tau phosphorylée ; Swe : mutation Swedish ; Nr : non reporté

Le neuroblastome est un cancer infantile se développant à son origine *in utero*, au niveau des cellules qui constituent la crête neurale, donnant naissance au système nerveux sympathique au cours de l'embryogénèse. Il correspond à une tumeur solide, qui s'est développée à partir de n'importe quelle partie du système nerveux sympathique, le plus souvent au niveau abdominal. La lignée de neuroblastome SH SY5Y est une lignée faiblement différenciée et qui présente comme avantage pour notre étude, outre son origine neuronale, un génotype sauvage pour le gène codant pour *p53* (Goldschneider *et al.* 2004), protéine aux multiples fonctions, impliquée notamment dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose.

Les transfections de la lignée SH SY5Y par un plasmide portant la forme mutée suédoise de l'APP751, ou par ce même plasmide mais vide, ont été réalisées au sein du laboratoire du Dr Luc Buée (INSERM U837 à Lille), qui a généreusement accepté de nous en faire don (Vingtdeux *et al.* 2005). Nous les avons respectivement identifiées en tant que lignée APP751 et lignée mock. De par sa transfection, la lignée APP751 possède la capacité de sécréter de façon constitutive les deux isoformes majeures du peptide A $\beta$ , soit A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42. Ces deux isoformes jouent un rôle important dans la maladie d'Alzheimer, la forme A $\beta$ 42 étant considérée comme la plus neurotoxique par ses propriétés oligomérisantes et insolubles (Jarrett *et al.* 1993).

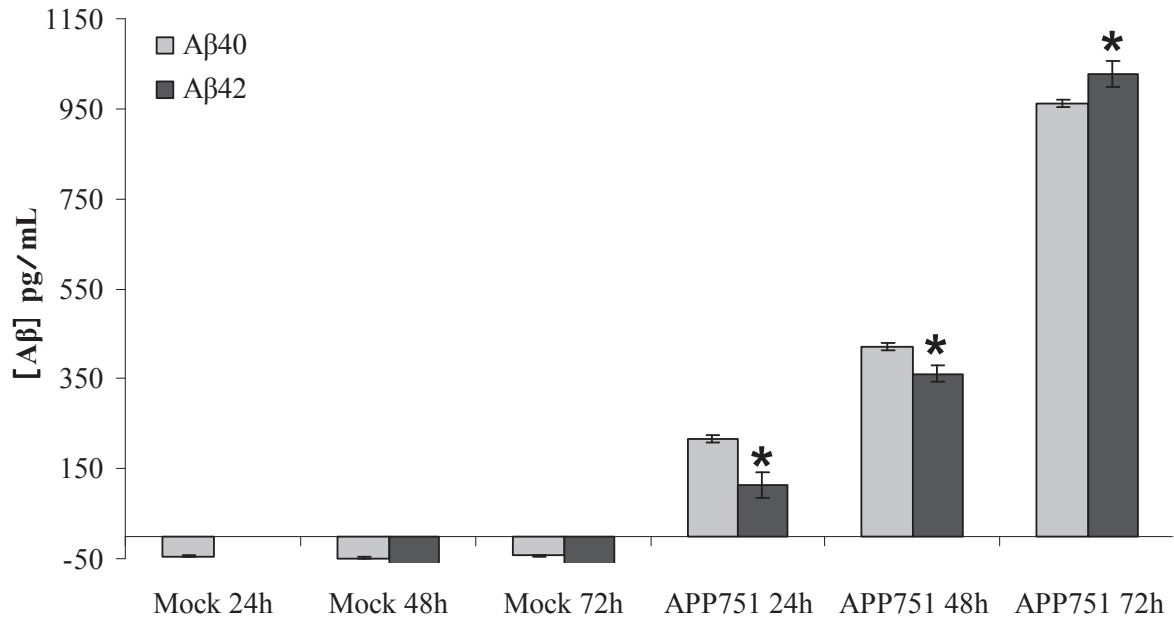
Avant d'étudier les effets du peptide A $\beta$  sur les systèmes de réparation de l'ADN, nous avons voulu procéder à quelques vérifications concernant la validité de notre modèle. Premièrement, nous avons mesuré les concentrations des deux isoformes d'A $\beta$  secrétées par la lignée APP751 et nous nous sommes assurés que la lignée mock n'en produisait pas. Ensuite, nous avons voulu établir si la seule sécrétion du peptide A $\beta$  engendrait au sein de la lignée APP751 des caractéristiques typiques de la maladie d'Alzheimer, telles la présence de ROS, un niveau élevé de dommages à l'ADN ou encore une potentialisation de la cytotoxicité à l'issue de stress oxydants ou métalliques. Les résultats obtenus seront détaillés dans les paragraphes suivants.

## B. Résultats

### 1. Cinétique de production d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 par la lignée APP751

Deux kits distincts reposant sur la technique ELISA ont été utilisés pour mesurer les concentrations de chaque isoforme du peptide A $\beta$ , après 24, 48 et 72 heures d'ensemencement des lignées mock et APP751 (figure 20). Aucune détection d'A $\beta$ 40 ou A $\beta$ 42 n'a été possible au sein de la lignée mock, quelle que soit la durée d'ensemencement. Au contraire, pour la lignée APP751, une sécrétion graduelle des deux isoformes a été observée au cours du temps. Au bout de 24 heures d'ensemencement, la concentration de l'isoforme A $\beta$ 40 était de 216,5 pg/mL et celle de l'isoforme A $\beta$ 42 de 113,5 pg/mL. Après 48h, les concentrations des isoformes A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 étaient respectivement de 420,3 et 360,3 pg/mL. Enfin, à l'issue de 72h d'ensemencement la concentration d'A $\beta$ 40 sécrétée dans le milieu de culture était de 962,1 pg/mL et celle de l'isoforme A $\beta$ 42 de 1026,7 pg/mL. Notons qu'à 24h, la concentration d'A $\beta$ 40 était deux fois plus élevée que celle d'A $\beta$ 42 ( $p=0,0006$ ) et légèrement plus élevée à 48h ( $p=0,004$ ). A 72h cependant, la concentration de l'isoforme A $\beta$ 42 était plus élevée que celle d'A $\beta$ 40 ( $p=0,004$ ).





**Figure 20 : Quantités des isoformes d'Aβ 40 et Aβ 42 sécrétées dans le milieu de culture par les lignées mock et APP751.**

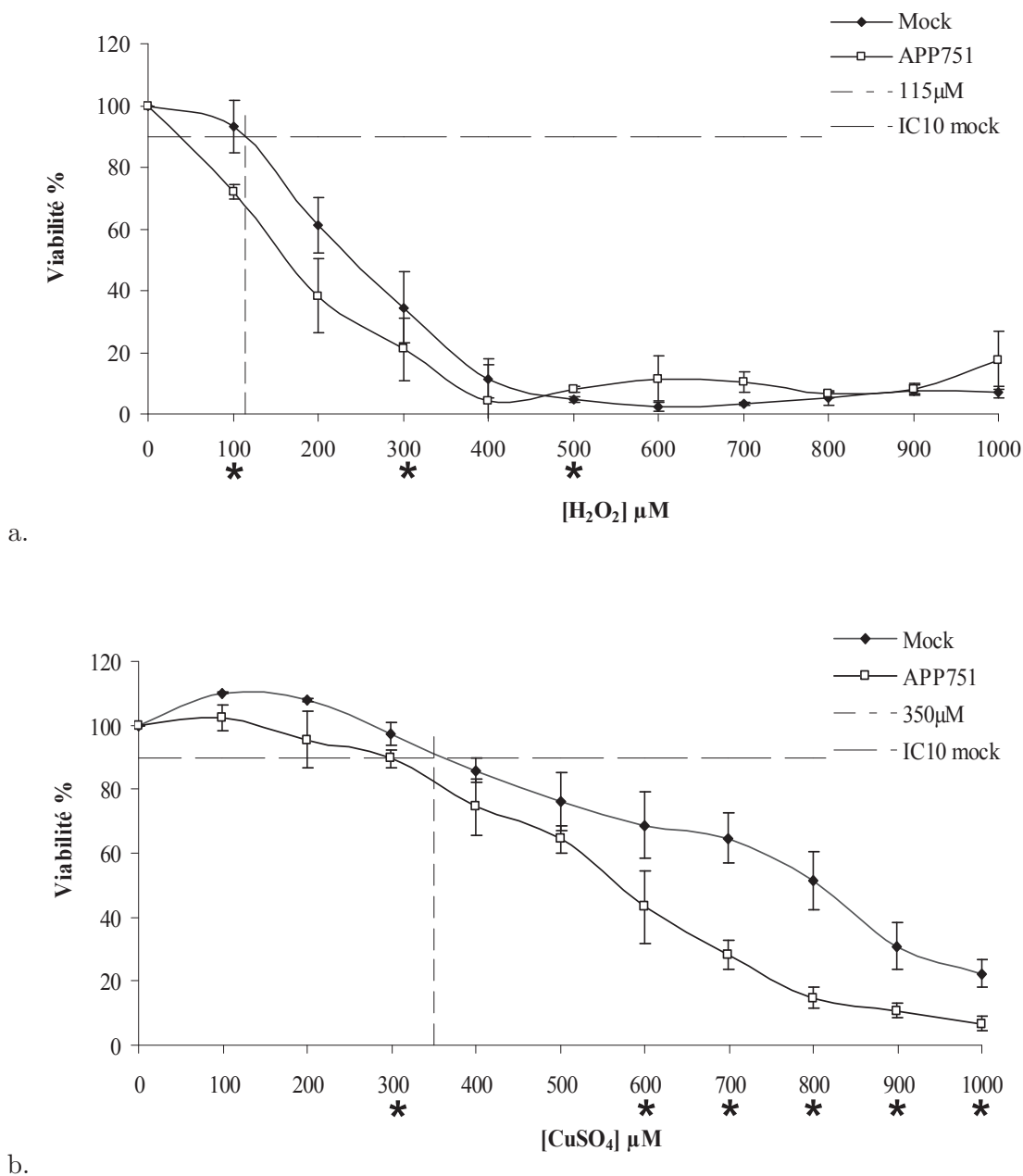
Les lignées mock et APP751 sontensemencées 72, 48 et 24h avant le test, en triplicat pour chaque temps et chaque lignée. A l'issue de ces incubations, les milieux de cultures sont récupérés et les tests Colorimetric BetaMark™ x-40 et INNOTEST™ beta-Amyloid (1-42), permettant la détection des isoformes Aβ40 et Aβ42 respectivement sont réalisés. Ces deux tests reposent sur le principe de la technique ELISA et permettent la quantification d'un peptide cible, pris au piège entre un anticorps de capture greffé sur une plaque 96 puits et un anticorps de détection couplé à la HRP (Horse Raddish Peroxidase). La réaction de la HRP et de son substrat TMB conduit à la formation d'un produit coloré, dont l'absorbance est mesurée et ramenée à une concentration grâce à l'utilisation d'une gamme étalon. Les résultats présentés ci-dessus témoignent de 3 expériences indépendantes (n=3). Les peptides Aβ40 et Aβ42 ne sont détectés pour aucun des trois temps chez la lignée mock, alors que leur expression est graduelle au sein de la lignée APP751.

\* : la concentration de l'isoforme Aβ42 pour un temps donné est significativement différente ( $p < 0,05$ , test de Student) de la concentration du peptide de l'isoforme Aβ40 à ce même temps.

## 2. Evaluation de la cytotoxicité engendrée par un stress oxydant ou métallique

Afin de mimer l'environnement pro-oxydant des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, nous avons choisi de tester deux agents typiques : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) caractéristique d'un stress oxydant et le sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ ) représentatif d'un stress métallique (figure 21). Quarante-huit heures après l'ensemencement, des concentrations croissantes (0 à 1 mM) de ces deux agents ont été appliquées pour une durée de 24 heures en parallèle aux lignées mock et APP751. Il est important de noter que le milieu de croissance des lignées mock et APP751 n'a pas été ôté au moment du stress, afin de préserver les quantités de peptide  $A\beta$  sécrétées depuis l'ensemencement. Ainsi, plutôt que d'utiliser du milieu neuf contenant les agents oxydants et métalliques à leur concentration finale, une solution concentrée de ces agents a été rajoutée au milieu initialement présent. A l'issue des 24h de stress, une période de récupération additionnelle de 24 heures a été allouée aux deux lignées, puis l'évaluation de la cytotoxicité de chacun des deux composés a été effectuée par un test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). Le MTT est un sel de tétrazolium jaune, réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan insolubles dans l'eau de couleur violette. Dans ce test, l'activité métabolique liée à la respiration des cellules permet d'évaluer leur viabilité.

L'allure des courbes obtenues à l'issue d'un stress par  $H_2O_2$  indique une plus grande sensibilité à cet agent au sein de la lignée APP751, par rapport à la lignée mock, de manière significative pour quelques concentrations seulement (100  $\mu M$ , 300  $\mu M$  et 500  $\mu M$ ). Nous avons déterminé graphiquement la concentration qui conduisait à 10% de mortalité (IC10) pour la lignée mock soit 115  $\mu M$  d'  $H_2O_2$  et choisi d'utiliser cette concentration en tant que concentration de travail pour les expériences futures. Au niveau du stress au cuivre, les courbes de viabilité ont encore une fois démontré une plus grande sensibilité de la lignée APP751 par rapport à la lignée mock.



**Figure 21 : Courbes de survie des lignées mock et APP751 à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  (a) et  $CuSO_4$  (b).**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées dans des plaques 96 puits et incubées pendant 48h. A l'issue de ces 48h, des concentrations graduelles d' $H_2O_2$  ou  $CuSO_4$  (gamme de 100  $\mu M$  à 1 mM finaux dans les puits) sont ajoutées au milieu initialement présent, pour une durée de 24h. Chaque concentration est testée en heptaplicat. Après une période de récupération additionnelle de 24h, le test MTT est réalisé. (a) Les courbes de survie des deux lignées présentent une allure semblable, mais la lignée APP751 s'avère plus sensible que la lignée mock pour des doses d' $H_2O_2$  correspondant à 100, 300 et 500  $\mu M$ . Les résultats ci-dessus ont fait l'objet de 3 expériences indépendantes ( $n=3$ ). (b) La lignée APP751 s'avère plus sensible que la lignée mock pour des doses de  $CuSO_4$  de 300  $\mu M$  et de 600 à 1 mM.

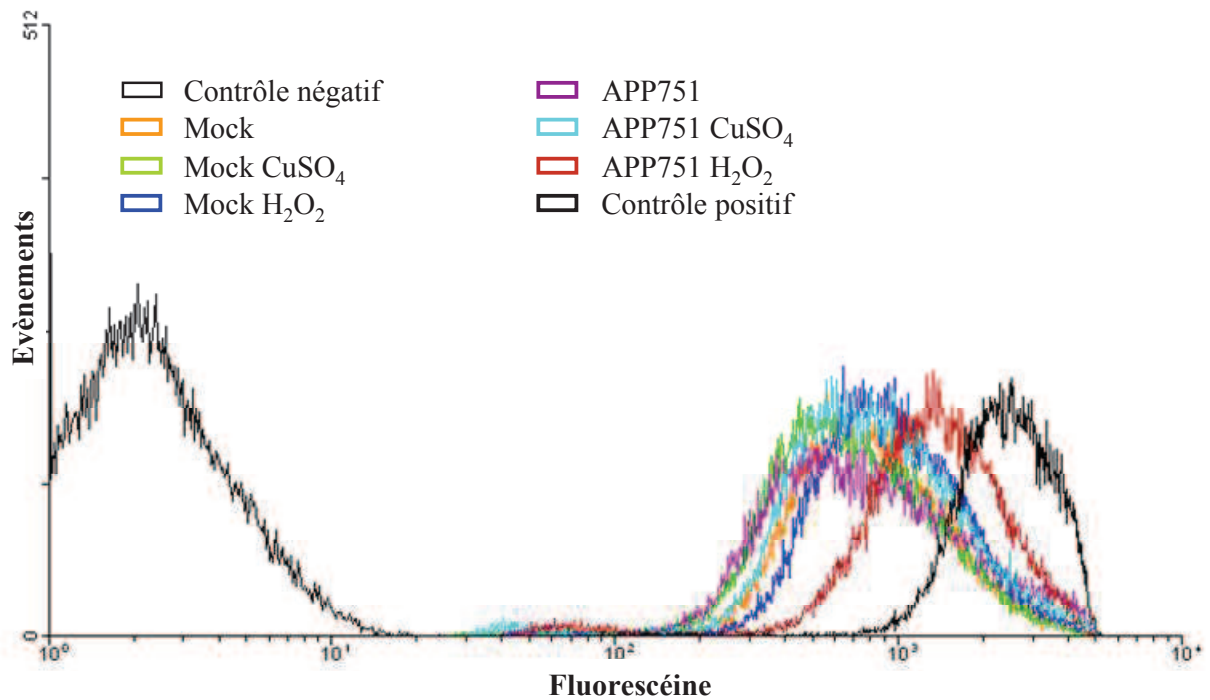
\* : les pourcentages de viabilité correspondant aux concentrations marquées d'une étoile sont significativement différents entre la lignée mock et la lignée APP751 ( $p < 0,05$ , test de Student).

Cette fois, six concentrations présentent une différence de viabilité significative entre les deux lignées, toujours en faveur de la lignée mock (300, 600, 700, 800, 900 et 1000  $\mu\text{M}$ ). Graphiquement, nous avons déterminé l'IC10 de la lignée mock pour le  $\text{CuSO}_4$ , soit 350  $\mu\text{M}$ . C'est cette concentration qui sera utilisée pour les prochaines expériences.

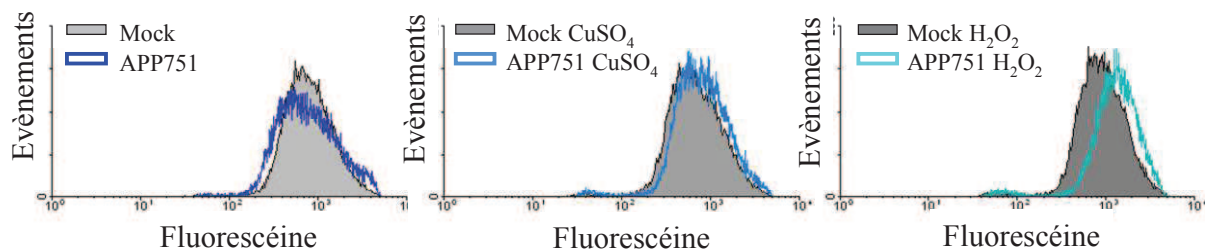
### **3. Mesure du niveau de ROS au sein des deux lignées**

L'augmentation des ROS est une caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Certaines études ont même établi un lien direct entre  $\text{A}\beta$  et génération de ROS. Nous avons donc voulu vérifier si la sécrétion du peptide  $\text{A}\beta$  par la lignée APP751 conduisait à une production plus élevée de ROS que dans la lignée mock (figure 22). Pour cela nous avons utilisé les propriétés d'une sonde perméabilisante analogue à la fluorescéine (CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ). Cette sonde n'est pas fluorescente jusqu'à ce que son groupement acétate soit oxydé par les estérases cellulaires, en présence de ROS, auquel cas elle constitue un indicateur global de stress oxydant. La fluorescence ainsi occasionnée est mesurée à l'aide d'un cytomètre de flux et assimilée à un taux de ROS dans notre analyse. A l'état basal, le niveau de ROS est plus élevé au sein de la lignée APP751 (44% de la fluorescence moyenne du contrôle positif) qu'au sein de la lignée mock (31%). A l'issue d'un stress au  $\text{CuSO}_4$ , le niveau de ROS était également plus élevé au sein de la lignée APP751 : 37% contre 27% pour la lignée mock. Pour finir, après un stress  $\text{H}_2\text{O}_2$  le niveau de ROS au sein de la lignée APP751 avait atteint 52% de la fluorescence moyenne du contrôle positif pour n'en représenter que 35% au sein de la lignée mock.

a.



b.

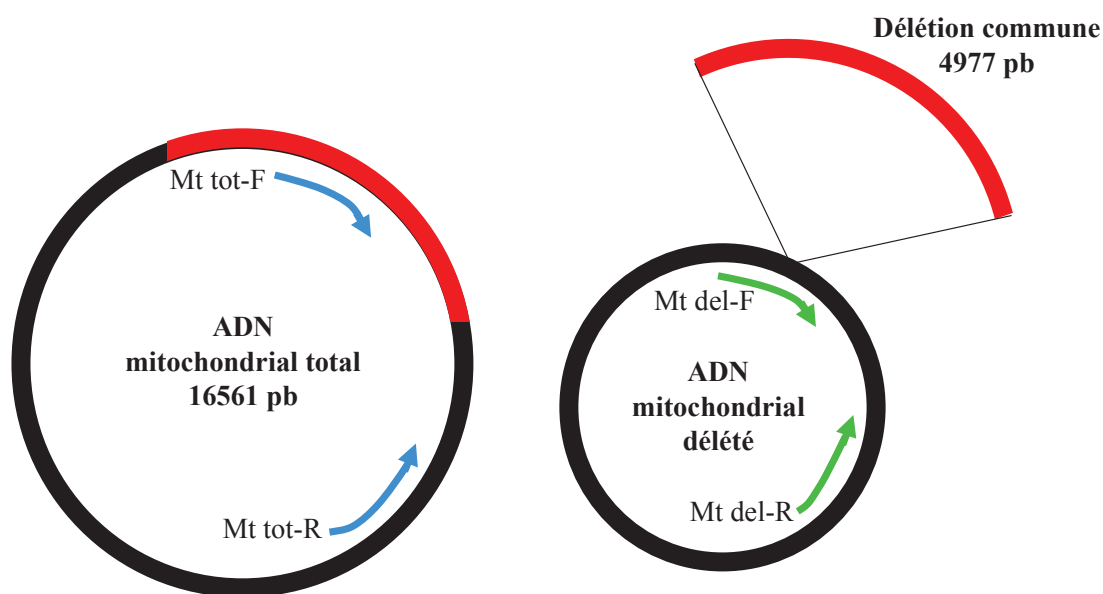


**Figure 22 : Détection de la présence de ROS au sein des lignées mock et APP751.**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées pendant 48h, à l'issue desquelles un stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (115  $\mu\text{M}$ ) ou au  $\text{CuSO}_4$  (350  $\mu\text{M}$ ) est réalisé pour une durée de 24h. Les cellules sont alors collectées et mises en présence de la sonde analogue de la fluorescéine (1  $\mu\text{M}$ ) pour une durée de 30 minutes. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un cytomètre en flux pour chaque condition, incluant un contrôle négatif (cellules sans fluorescéine) et un contrôle positif (cellules ayant reçu une dose d' $\text{H}_2\text{O}_2$  juste avant l'incubation avec la fluorescéine). (a) Des histogrammes représentant le nombre d'évènements en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée sont représentées. (b) En comparant les lignées mock et APP751 pour chaque condition (état basal, stress au  $\text{CuSO}_4$  ou stress à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on s'aperçoit que le taux de ROS est toujours plus élevé au sein de la lignée APP751.

#### 4. Quantification de la délétion commune de l'ADN mitochondrial des lignées mock et APP751

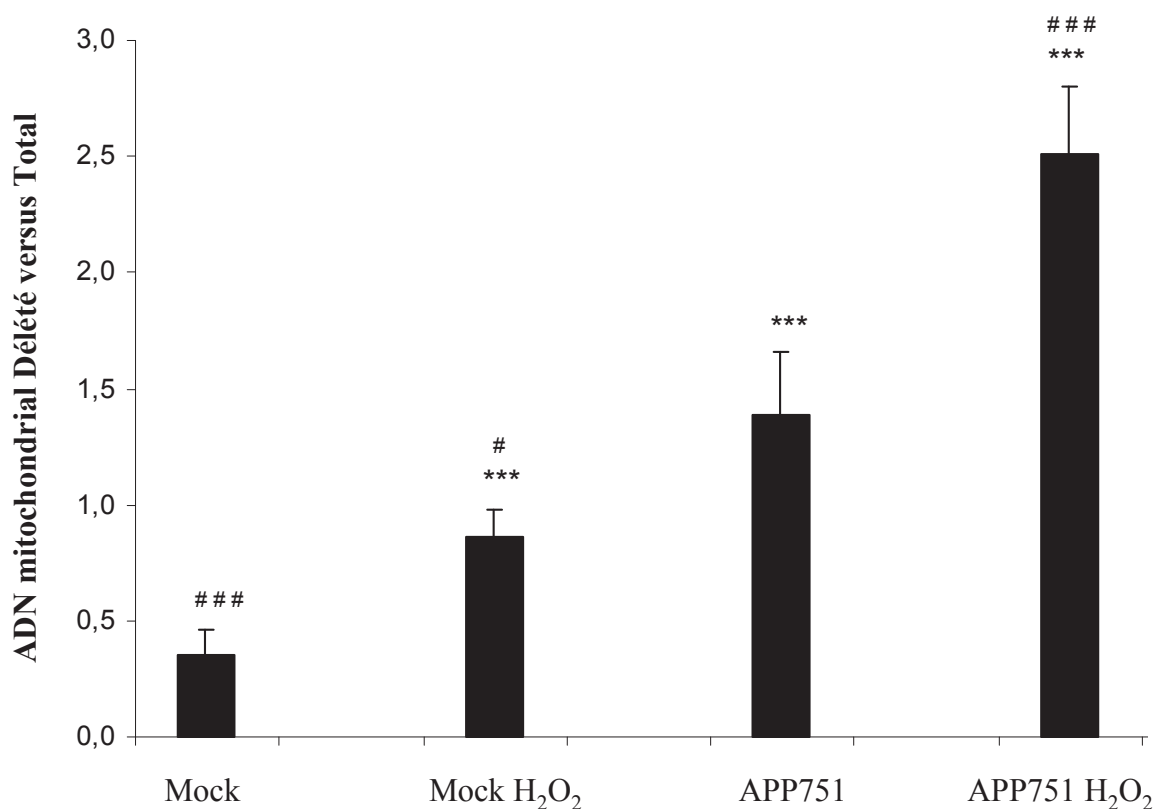
Le génome mitochondrial humain est une molécule d'ADN double brin et circulaire, de 16569 paires de bases (pb) (Sato *et al.* 1991). L'ADN mitochondrial est très sensible au stress oxydant, de par sa proximité aux ROS relarguées par la chaîne de transport des électrons. Les oxydations de bases et la délétion de larges portions d'ADN mitochondrial sont d'ailleurs corrélées au stress oxydant (Lezza *et al.* 1999) et supposées jouer un rôle important dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives, et notamment la maladie d'Alzheimer. Le marqueur le plus couramment reporté comme mutation de l'ADN mitochondrial correspond à un fragment délété de 4977 pb, appelé délétion commune (Koch *et al.* 2001). Il se distingue aisément de l'ADN mitochondrial total par qPCR en temps réel, grâce à l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques (figure 23).



**Figure 23 : Représentation schématique de l'ADN mitochondrial total et déléte.**

Le positionnement des amorces oligonucléotidiques est crucial pour distinguer l'ADN mitochondrial total du déléte par la technique de qPCR. Pour l'ADN mitochondrial total, l'amorce « forward » (mt tot F, en bleu) est placée au sein de la région correspondant à la délétion commune, région évidemment absente de l'ADN mitochondrial déléte. Pour l'ADN mitochondrial déléte, l'amorce « forward » (mt del-F, en vert) est placée à cheval sur la région néoformée à l'issue de la délétion commune, dont la séquence est spécifique à l'ADN mitochondrial. Les amorces « reverse » pour l'ADN mitochondrial total (mt tot-R, en bleu) et déléte (mt del-R en vert) sont placées dans des régions communes aux deux formes d'ADN mitochondrial.

Ainsi, le rapport entre la quantité d'ADN mitochondrial délété et celle de l'ADN mitochondrial total a été calculé au sein des lignées mock et APP751, à l'état basal ou à l'issue d'un stress oxydant ( $H_2O_2$ ) (figure 24). Pour la lignée APP751 à l'état basal, ce rapport s'est avéré plus haut que celui de la lignée mock ( $1,39 \pm 0,27$  versus  $0,36 \pm 0,10$  ;  $p=0,0001$ ) et même plus haut que dans la lignée mock préalablement traitée à l'  $H_2O_2$  ( $1,39 \pm 0,27$  versus  $0,86 \pm 0,12$  ;  $p=0,01$ ), témoignant du niveau de stress apporté par la sécrétion du peptide  $A\beta$ . Le rapport ADN mitochondrial délété versus total était encore plus haut au sein de la lignée APP751 ayant subi un stress à l' $H_2O_2$  ( $2,51 \pm 0,29$  versus  $1,39 \pm 0,27$  ;  $p=0,0003$ ).



**Figure 24 : Quantification de la délétion commune de l'ADN mitochondrial.**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées pendant 48h, à l'issue desquelles un stress  $H_2O_2$  (115  $\mu M$ ) est appliqué pour une durée de 24h. Les cellules sont alors récoltées et lysées. Après purification du lysat, des expériences de qPCR en temps réel sont réalisées en parallèle pour amplifier dans chaque condition l'ADN mitochondrial délété et l'ADN mitochondrial total afin d'effectuer un rapport entre ces deux valeurs, représenté dans la figure ci-dessus. Trois expériences indépendantes ont été réalisées ( $n=3$ ). La proportion d'ADN mitochondrial est plus élevée au sein de chaque lignée à l'issue d'un stress oxydant. La proportion d'ADN mitochondrial délété est plus importante chez la lignée APP751 à l'état basal que chez la lignée mock ayant subi un stress oxydant.

\* : valeur significativement différente de la lignée mock ( $p<0,05$ , \*\*  $p<0,005$ , \*\*\*  $p<0,0005$ , test de Student)

# : valeur significativement différente de la lignée APP751 ( $p<0,05$ , ##  $p<0,005$ , ###  $p<0,0005$ , test de Student)

## 5. Détection des lésions oxydatives au niveau de l'ADN nucléaire des deux lignées

L'augmentation des dommages à l'ADN dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer mais aussi dans leurs fluides biologiques (plasma, liquide céphalo-rachidien) est vastement documentée (Markesbery 1997; Wang *et al.* 2005; Moreira *et al.* 2008; Sonnen *et al.* 2008). Pour évaluer la présence de cette caractéristique dans la lignée APP751 traitée ou non par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la proportion de dommages à l'ADN a été quantifiée et comparée à la lignée mock en utilisant le test des comètes en conditions alcalines (figure 25). Le test des comètes met en jeu une étape de lyse cellulaire sur gel, permettant d'isoler l'ADN nucléaire, sous sa forme initiale de pelote. S'en suit une migration électrophorétique et un marquage de l'ADN au Bromure d'étidium (BEt), dont l'analyse permettra de distinguer l'ADN intact de l'ADN endommagé. L'ADN intact est contenu dans la tête de la comète, de forme circulaire, alors que l'ADN endommagé se déroule et se détache de cette structure compacte au cours de l'électrophorèse pour former un prolongement ou queue de la comète. De manière classique, ce test permet donc la détection des cassures simple brin (SSB) et des sites alcali-labiles (ALS), comme par exemple les sites abasiques. En outre, l'utilisation de l'enzyme « formamidopyrimidine DNA *N*-glycosylase » (fpg) octroie la possibilité de mesurer la présence de dommages supplémentaires. En effet, la fpg reconnaît et génère une cassure supplémentaire de l'ADN, au niveau de lésions telles que la 8oxoG ou d'autres purines oxydées. La proportion de SSB et d'ALS a été obtenue en quantifiant la proportion d'ADN dans la queue des comètes dans les lames non traitées préalablement par la fpg. Le niveau de purines oxydées a été obtenu en soustrayant la valeur correspondant aux SSB et ALS à la valeur obtenue après quantification de la proportion d'ADN dans la queue des comètes des lames ayant été incubées par l'enzyme fpg au préalable.



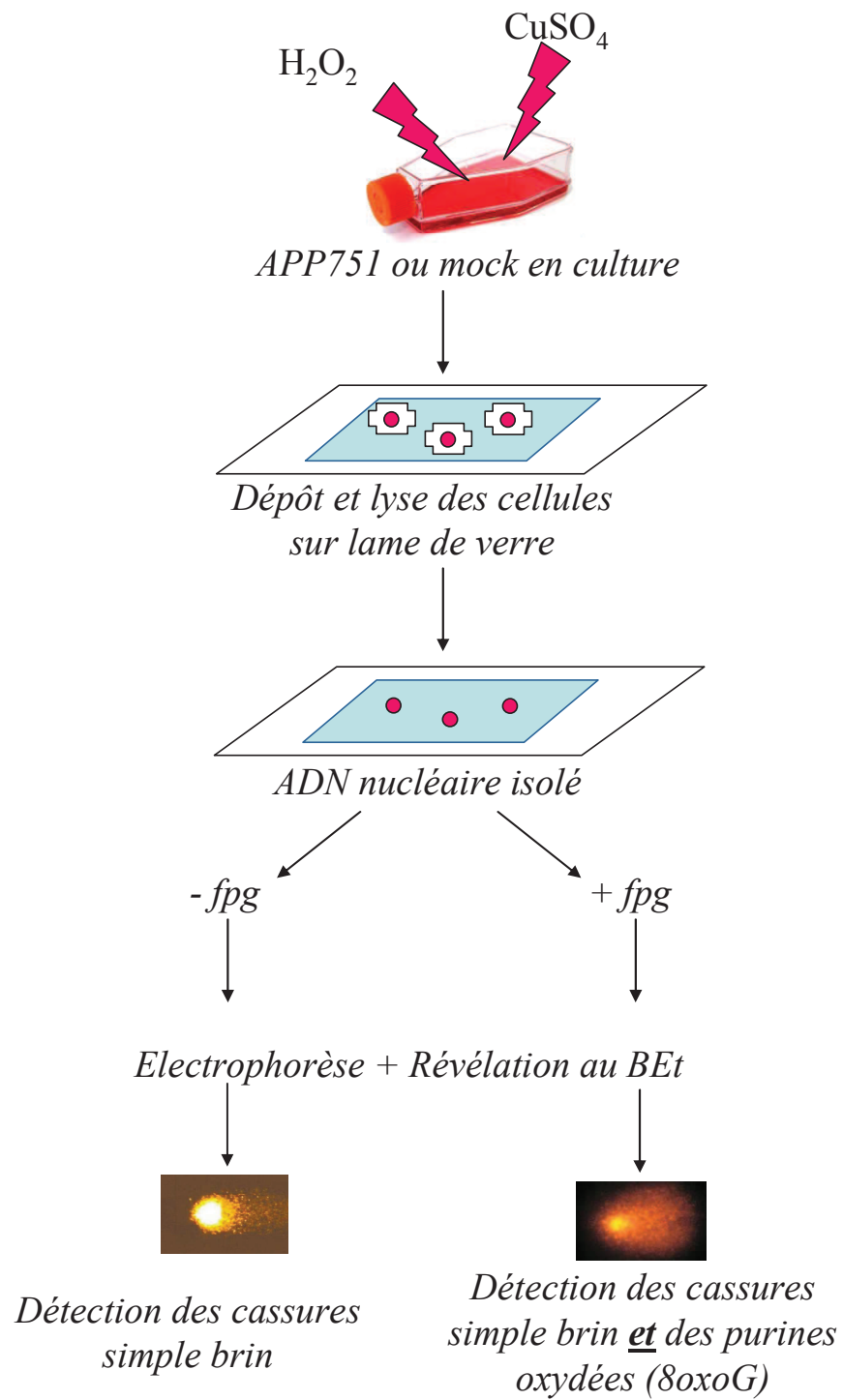
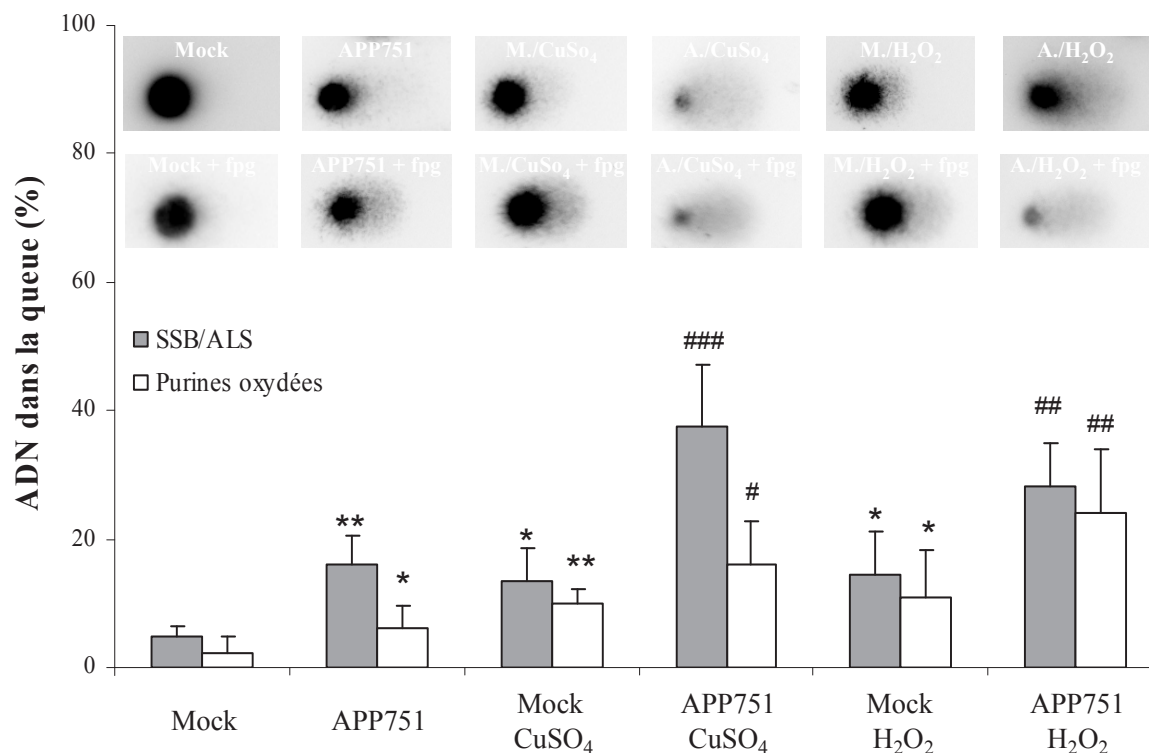


Figure 25 : Principes de la technique des comètes en conditions alcalines.

A l'état basal (figure 26), le niveau de SSB et ALS était significativement plus élevé au sein de la lignée APP751 qu'au sein de la lignée mock (16,1% d'ADN dans la queue  $\pm$  4,4 versus  $4,8 \pm 1,5$  ;  $p=0,0004$ ). Après un stress au  $\text{CuSO}_4$ , la proportion d'ADN dans la queue de la comète a subi une augmentation de 8,6% dans la lignée mock ( $13,3\% \pm 5,1$  versus  $4,8\% \pm 1,5$  ;  $p=0,005$ ) et de 21,3% dans la lignée APP751 ( $37,4\% \pm 9,9$  versus  $16,1\% \pm 4,4$  ;  $p=0,0004$ ). Après exposition à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la proportion d'ADN dans la queue de comète a subi une augmentation de 9,7% pour la lignée mock ( $14,5\% \pm 6,6$  versus  $4,8 \pm 1,5$  ;  $p=0,01$ ) et de 12,1% pour la lignée APP751 ( $28,1\% \pm 6,6$  versus  $16,1\% \pm 4,4$  ;  $p=0,0008$ ). L'induction des SSB et ALS s'est donc avérée plus efficace par la lignée APP751 que par la lignée mock.

Le taux de purines oxydées était également plus élevé à l'état basal, au sein de la lignée mock qu'au sein de la lignée APP751 ( $6,1\% \pm 3,5$  versus  $2,4\% \pm 2,4$  ;  $p=0,03$ ). Après un stress au  $\text{CuSO}_4$ , l'augmentation de la proportion d'ADN dans la queue de la comète (révélée par fpg) a été de 7,7% dans la lignée mock ( $10,1\% \pm 2,3$  versus  $2,4\% \pm 2,4$  ;  $p=0,004$ ) et de 9,9% dans la lignée APP751 ( $16,1\% \pm 6,6$  versus  $6,2\% \pm 3,6$  ;  $p=0,03$ ). A l'issue d'un stress  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la proportion d'ADN dans la queue de la comète, due au traitement par fpg, a augmenté de 8,4% pour la lignée mock ( $10,8\% \pm 7,6$  versus  $2,4\% \pm 2,4$  ;  $p=0,04$ ) et de 17,9% pour la lignée APP751 ( $24,1\% \pm 9,8$  versus  $6,2\% \pm 3,6$  ;  $p=0,002$ ). L'induction du niveau de purines oxydées s'est donc avérée plus important au sein de la lignée APP751 que de la lignée mock.



**Figure 26 : Evaluation de la quantité de dommages oxydatifs.**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées pendant 48h puis traitées ou non au CuSO<sub>4</sub> (350 µM) et à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 µM). A l'issue de ces traitements, le test des comètes est réalisé en conditions alcalines pour détecter les cassures simple brin (single strand break SSB) et les sites alkali-labiles (ALS). L'enzyme fpg est également utilisée pour quantifier le niveau de purines oxydées (sites sensibles à la fpg). La première ligne d'images représente les lames non-traitées à la fpg, avec une image caractéristique du débobinage de l'ADN correspondant aux SSBs et ALS pour chaque échantillon. La seconde ligne d'images représente les lames traitées par la fpg, avec une image caractéristique du débobinage de l'ADN correspondant aux SSBs et ALS et aussi aux purines oxydées (sites sensibles au traitement par la fpg). La proportion d'ADN dans la queue de la comète a été quantifiée et moyennée à partir de 50 cellules analysées par lame, en utilisant 3 lames pour chaque échantillon. Le taux de purines oxydées pour un échantillon est obtenu en soustrayant les valeurs obtenues pour les lames non-traitées par la fpg aux valeurs obtenues pour les lames traitées par la fpg. Une représentation graphique est ainsi donnée pour le taux de SSB/ALS (en gris) et pour le taux de purines oxydées seules (en blanc). Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n=3). Les taux d'SSB/ALS et de purines oxydées toujours plus élevés au sein de la lignée APP751 que de la lignée mock, à l'état basal ou à l'issue d'un stress métallique ou oxydant.

\* : valeur significativement différente de la lignée mock (p<0,05, \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,0005, test de Student)

# : valeur significativement différente de la lignée APP751 (p<0,05, ## p<0,005, ### p<0,0005, test de Student)

### C. Conclusion

Par l'intermédiaire de cette première partie de résultats, nous avons cherché à établir la pertinence de la lignée APP751, en tant que modèle de la maladie d'Alzheimer, ou plutôt de certaines caractéristiques de la maladie, reliant la sécrétion endogène du peptide A $\beta$  par une lignée de neuroblastome humain et le stress oxydant. Nous avons pu valider que la lignée APP751, porteuse du transgène lui permettant de surexprimer une version mutée de l'APP, favorisant le processus amyloïdogénique, sécrétait les deux isoformes du peptide A $\beta$  de manière graduelle au cours du temps, alors que la détection de ce même peptide n'a pas été possible au sein de lignée contrôle mock. Nous avons également observé un début d'inversion dans les proportions des deux isoformes, A $\beta$ 40 étant plus élevé qu'A $\beta$ 42 à 24 et 48h et moins élevé à 72h. Dans la littérature, certaines études témoignent d'une plus forte concentration d'A $\beta$ 42 dans les amas amyloïdes diffus, une des caractéristiques précoces de la maladie d'Alzheimer, alors que dans les phases plus avancées de la maladie, la déposition d'A $\beta$ 40 est favorisée et cette isoforme est le constituant majeur des plaques séniles (Walker *et al.* 2000) (Tamaoka 1998). Il est cependant difficile de corrélérer nos résultats aux données de la littérature puisque nous nous basons sur une cinétique de 72h alors que l'inversion du rapport A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 dans les cerveaux de patients prend plusieurs années. Il est toutefois possible d'imaginer que très tôt, les propriétés fibrillogéniques de l'isoforme A $\beta$ 42 elle-même puissent influencer en retour un clivage plus important de l'isoforme A $\beta$ 42 que celui de l'isoforme A $\beta$ 40, et expliquer ainsi les résultats que nous observons.

Dans un second temps, nous avons mesuré et comparé la quantité de ROS au sein des deux lignées, et montré qu'à l'état basal comme à l'issue d'un stress métallique ou oxydant, la proportion de ROS était toujours plus élevée chez la lignée APP751 que chez la lignée mock. Ces résultats viennent confirmer ceux des quelques études de la littérature qui démontrent la capacité du peptide A $\beta$  à générer un stress oxydant, comme l'étude de Behl (Behl *et al.* 1994) qui démontre que le traitement par A $\beta$  des lignées neuronales B12 et PC12 génère de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Comme la notre, cette étude ne précise pas le mécanisme qui conduit à la génération de ROS. En revanche, des précisions sont disponibles quant à ce phénomène en présence de métaux : Bush décrit par exemple qu'A $\beta$  conduit à la réduction du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> dans un cycle de réaction catalytique pour générer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bush *et al.* 2003).

Finalement, nous nous sommes intéressés aux dommages induits par les ROS au niveau de la molécule d'ADN. Nous nous sommes d'abord intéressés à quantifier la délétion commune, au sein de l'ADN mitochondrial. La délétion commune représente l'un des marqueurs précoces de l'exposition des mitochondries à un stress oxydant. Nous avons montré que la fréquence de la délétion commune chez la lignée APP751 à l'état basal était non seulement plus élevée que chez la lignée mock non traitée, mais aussi plus élevée que chez la lignée mock ayant subi un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette dernière observation est capitale, puisqu'elle témoigne que la seule présence d'A $\beta$  au sein de la lignée APP751 est capable d'endommager l'ADN mitochondrial plus fortement qu'un traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la lignée mock. Le taux d'ADN mitochondrial délété chez la lignée APP751 à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était encore plus élevé que dans cette même lignée à l'état basal. Situé au cœur de la mitochondrie et donc de la chaîne de transport d'électron, l'ADN mitochondrial est une cible privilégiée pour les ROS. L'ADN mitochondrial est d'autant plus fragile qu'il ne dispose pas d'histones protectrices. Les dommages à l'ADN mitochondrial sont démontrés dans de nombreuses études de la maladie d'Alzheimer et se révèlent parfois plus importants que les dommages à l'ADN nucléaire (Wang *et al.* 2005). Dans notre travail, nous établissons un lien fort entre la sécrétion d'A $\beta$  par la lignée APP751 et les dommages à l'ADN mitochondrial.

Au niveau de l'ADN nucléaire, le test des comètes nous a permis de quantifier les dommages à l'ADN de type oxydatifs, parmi lesquels les cassures simple brin (SSB), les sites alkali-labile (ALS) ou encore les purines oxydées. La fréquence de chacun de ces dommages était plus élevée au sein de la lignée APP751 que de la lignée mock. Notons que la quantité importante de cassures simple brin par rapport à la 8oxoG suggère un rôle majeur du radical hydroxyl

•OH, seule ROS capable d'attaquer le squelette de l'ADN. Ces résultats corroborent les données de la littérature qui témoignent d'une augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN dans la maladie mais en plus démontrent la capacité du peptide A $\beta$  sécrété par la lignée APP751 à induire des dommages à l'ADN, seul ou couplé à un stress oxydant ou métallique.

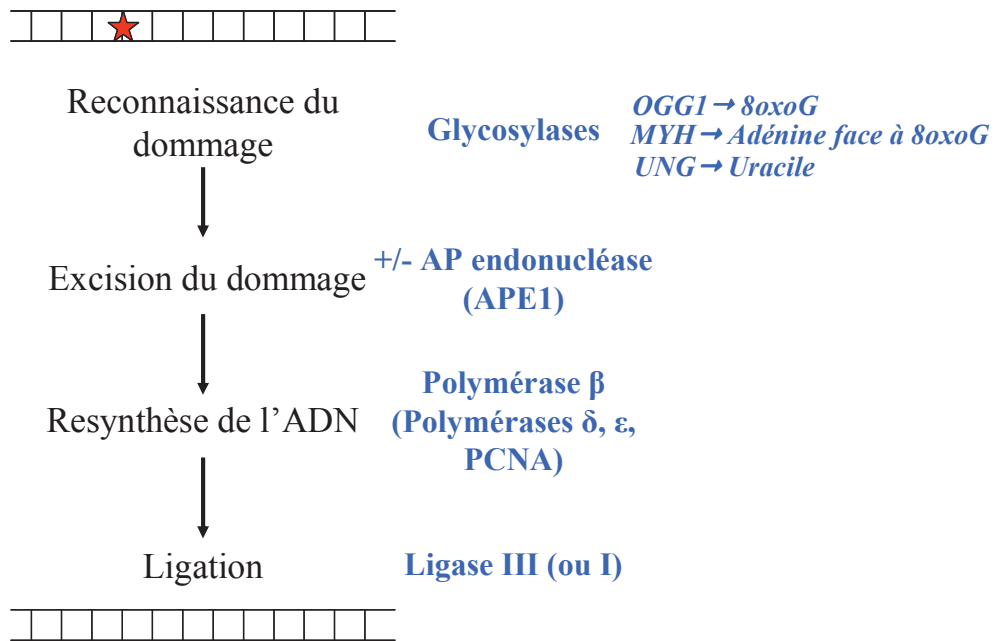
Les caractéristiques retrouvées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie, telles que la production d'A $\beta$ , l'augmentation du stress oxydant et des dommages qu'il occasionne au niveau de l'ADN nucléaire, mais aussi mitochondrial, sont donc présentes chez la lignée APP751 et en font un modèle valide pour poursuivre des expériences autour de la réparation de l'ADN dans la suite de ce travail.

## II. La sécrétion du peptide A $\beta$ entraîne une dérégulation du BER

### A. Introduction

L'observation d'une augmentation des dommages oxydatifs au niveau de la molécule d'ADN dans la lignée APP751 nous a conduits à vérifier l'état du système de réparation en charge des petites bases endommagées et des cassures simple brin, le BER, dont les principes généraux et les acteurs principaux sont rappelés en figure 27.

En effet, dans certaines études, il a été montré que le BER était modulé à différents niveaux, dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, présentant le plus souvent une baisse d'activité. La glycosylase OGG1, en charge de la reconnaissance et de l'excision de la 8oxoG paraît particulièrement affectée, tant au niveau de son expression que de son activité (Jones *et al.* 1989; Boerrigter *et al.* 1991; Boerrigter *et al.* 1992; Iida *et al.* 2002). Des mutations dans la séquence du gène codant pour cette protéine ont même pu être identifiées, et associées à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Mao *et al.* 2007). Dans cette seconde partie, nous nous sommes donc intéressés à préciser l'implication du peptide A $\beta$  dans cette modulation du BER. Nous avons ainsi comparé la réparation dans la lignée APP751 à celle de la lignée mock, à l'état basal ainsi qu'à l'issue d'un stress de type métallique ou oxydant. Nous avons donc étudié le niveau d'expression génique et protéique des acteurs majoritaires du BER et aussi mesuré les activités de réparation, en utilisant deux tests distincts.



**Autres intervenants notoires du BER :**

- PARP 1 : liaison et signalisation des cassures simple brin
- XRCC1 : interaction avec de nombreuses protéines du BER (PARP1, polβ)
- APTX : nettoyage des extrêmités pour la répartition des cassures simple brin

Figure 27 : Principales étapes du BER et place de protéines étudiées dans ce travail.



## B. Résultats

### 1. Effets du peptide A $\beta$ sur l'expression des gènes du BER

Nous avons utilisé la technique de qPCR en temps réel qui permet la quantification relative d'un gène cible, d'une condition par rapport à une autre, via une étape de normalisation utilisant un ou plusieurs gènes de références, dont l'expression ne varie pas d'une condition à l'autre. Dans notre étude nous avons choisi de normaliser l'expression des gènes du BER entre nos différentes conditions par l'utilisation systématique de 3 gènes de référence (S18, GAPDH et CycloB), validés à l'aide du logiciel BestKeeper (Pfaffl *et al.* 2004) à chaque expérience pour n'être pas modulés d'une condition à l'autre. Les rapports d'expression des gènes cibles entre deux échantillons ont été ensuite normalisés par rapports aux trois gènes de référence, en utilisant le logiciel REST (Pfaffl *et al.* 2002).

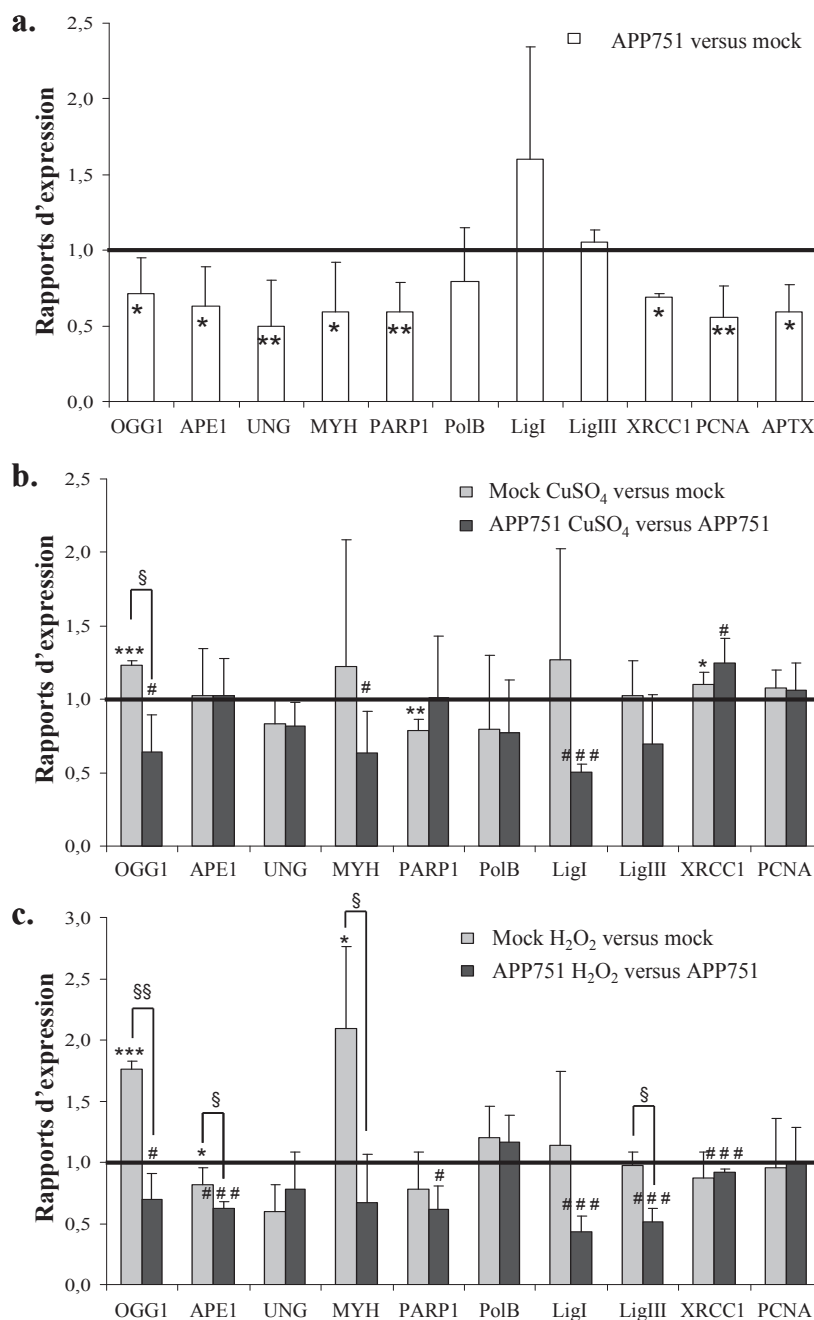
Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression des gènes du BER entre la lignée APP751 et la lignée mock à l'état basal, 48h après l'ensemencement (figure 28.a). De manière étonnante, de nombreux gènes associés au BER apparurent sous-régulés en présence d'A $\beta$  malgré le stress oxydant et l'augmentation des dommages oxydatifs engendrés par le peptide. Pour OGG1, la glycosylase spécialisée dans la reconnaissance et l'excision de la 8oxoG, le rapport d'expression dans la lignée APP751 comparée à la lignée mock était de  $0,71 \pm 0,23$  ( $p=0,0175$ ). L'expression de MYH, une autre glycosylase du BER, impliquée dans le retrait d'une Adénine mal appariée face à une 8oxoG, s'avéra également diminuée, avec un rapport de  $0,59 \pm 0,33$  ( $p=0,0168$ ) dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock. L'expression d'UNG dans la lignée APP751 subit une modulation de  $0,50 \pm 0,31$ ,  $p=0,0047$  en comparaison avec la lignée mock. Le niveau d'ARNm d'APE1 était aussi réduit dans la lignée APP751 ( $0,63 \pm 0,26$  ;  $p=0,0088$ ). D'autres gènes du BER, plus précisément impliqués dans la réparation des cassures simple brin furent sous-régulés dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock : les rapports d'expression de PARP1 XRCC1 et APTX furent respectivement  $0,59 \pm 0,20$  ( $p=0,0016$ ) ;  $0,69 \pm 0,02$  ( $p=0,0283$ ) and  $0,59 \pm 0,18$  ( $p=0,0072$ ).

Des protéines impliquées dans les étapes finales de la BER, comme par exemple PCNA pour la voie longue, apparaissent sous-exprimées chez la lignée APP751, avec un rapport d'expression de  $0,56 \pm 0,20$  comparé à la lignée mock ( $p=0,0012$ ). Cependant, les rapports d'expression de pol $\beta$ , Lig1 et Lig3 ne furent pas significativement différents entre les deux lignées.

Nous avons ensuite comparé l'évolution de l'expression des gènes du BER, au sein de chaque lignée, à l'issue de 24h d'un stress métallique ou oxydant. Après un stress au CuSO<sub>4</sub> (figure 28.b), OGG1 apparut surexprimé de manière significative au sein de la lignée mock ( $1,23 \pm 0,04$  ;  $p=0,0002$ ) alors qu'il était sous-régulé au sein de la lignée APP751 ( $0,64 \pm 0,25$  ;  $p=0,03$ ). Les profils d'expression des deux lignées comparées l'une à l'autre étaient également significativement différents ( $p=0,008$ ). Le taux d'expression d'MYH n'a pas été modulé dans la lignée mock après un stress au CuSO<sub>4</sub>, mais il fut sous-régulé dans la lignée APP751 ( $0,64 \pm 0,28$  ;  $p=0,0441$ ). L'expression de PARP1 après un stress au CuSO<sub>4</sub> fut significativement réduite au sein de la lignée mock ( $0,79 \pm 0,07$  ;  $p=0,0036$ ), alors qu'elle n'était pas modifiée au sein de la lignée APP751. L'expression de Lig1 n'était pas modulée dans la lignée mock, mais elle était fortement sous-régulée dans la lignée APP751 ( $0,50 \pm 0,05$  ;  $p=0,0002$ ). XRCC1 fut surexprimé dans les lignées mock ( $1,10 \pm 0,08$  ;  $p=0,0310$ ) et APP751 ( $1,10 \pm 0,08$ ,  $p=0,0310$ ) à l'issue d'un stress au CuSO<sub>4</sub>.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons comparé l'expression des gènes du BER à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, au sein des deux lignées cellulaires (figure 28.c). Le niveau d'expression d'OGG1 était significativement sur-régulé chez la lignée mock ( $1,76 \pm 0,07$  ;  $p=0,00002$ ), après traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors qu'il était sous-exprimé chez la lignée APP751 ( $0,70 \pm 0,21$  ;  $p=0,04$ ) et ces deux réponses étaient significativement différentes l'une de l'autre ( $p=0,0006$ ). APE1 fut sous-régulé dans la lignée mock ( $0,81 \pm 0,14$  ;  $p=0,04$ ) et encore plus sous-régulé dans la lignée APP751 ( $0,62 \pm 0,06$  ;  $p=0,0002$ ). Les deux rapports d'expression étaient significativement différents l'un de l'autre ( $p=0,05$ ). UNG était sous-

exprimé chez la lignée mock à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  ( $0,60 \pm 0,22$  ;  $p=0,02$ ) mais pas chez la lignée APP751. Cependant, ces deux profils d'expression n'étaient pas significativement différents l'un de l'autre. MYH apparut surexprimé dans la lignée mock après un stress  $H_2O_2$  ( $2,09 \pm 0,67$  ;  $p=0,0240$ ), mais il n'était pas modulé dans la lignée APP751. Les deux réponses étaient significativement différentes ( $p=0,0171$ ). PARP1 était significativement sous-régulé dans la lignée APP751 après exposition à  $H_2O_2$  ( $0,61 \pm 0,20$  ;  $p=0,0135$ ). L'expression de Lig1, Lig3 et XRCC1 n'était pas modifiée dans la lignée mock à l'issue d'un stress  $H_2O_2$ , mais elle était fortement sous-régulée dans la lignée APP751, avec des rapports d'expression de  $0,43 \pm 0,13$  ( $p=0,0017$ ),  $0,51 \pm 0,11$  ( $p=0,0018$ ) et  $0,92 \pm 0,02$  ( $p=0,0031$ ), respectivement. Seuls les profils d'expression de Lig3 étaient significativement différents entre les deux lignées ( $p=0,0282$ ).



**Figure 28 : Mesure de l'expression des gènes de réparation.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h et 115  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou 350  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  sont ajoutés au milieu de culture. L'ARN total est alors extrait et reverse-transcrit en ADN complémentaire (ADNc). Vingt ng d'ADNc sont utilisés pour détecter l'expression de gènes spécifique par qPCR. La comparaison de l'expression des gènes du BER entre la lignée APP751 et la lignée mock à l'état basal (a, n=7), entre la lignée mock traitée au  $\text{CuSO}_4$  et la lignée mock ou la lignée APP751 traitée au  $\text{CuSO}_4$  et la lignée APP751 (b, n=3) et entre la lignée mock traitée à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la lignée mock ou la lignée APP751 traitée à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et la lignée APP751 (c, n=3) est réalisée avec l'aide de la macro REST (Pfaffl *et al.* 2002), basée sur la méthode des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . La sécrétion du peptide A $\beta$  par la lignée APP751 engendre une sous-régulation de nombreux gènes (OGG1, MYH, UNG, PARP1, XRCC1, PCNA et APTX). Le profil d'expression à l'issue d'un stress au  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  est différent entre les lignées mock et APP751 (par exemple mock sur-exprime OGG1 alors qu'APP751 le sous-exprime).

\* valeur significativement différente ( $p < 0,05$ ) de la lignée mock, \*\* $p < 0,005$  ; \*\*\* $p < 0,0005$

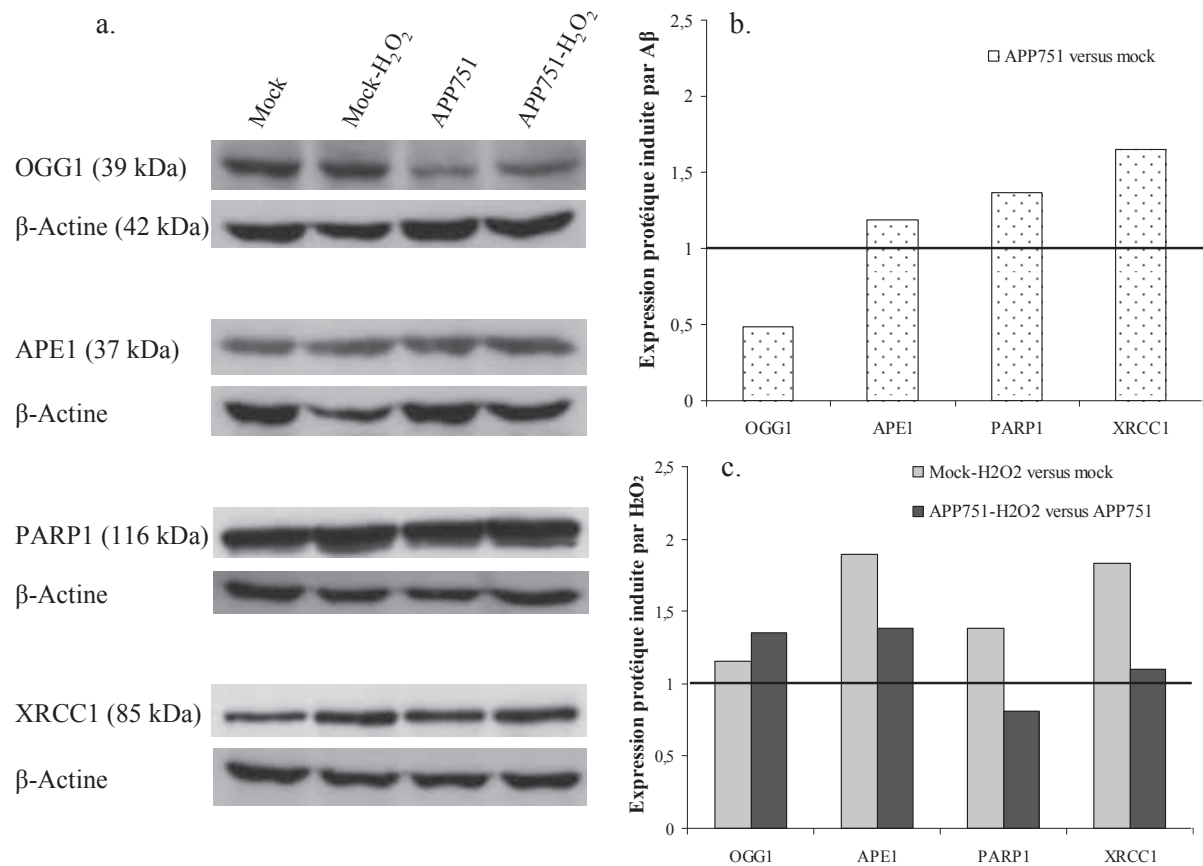
# valeur significativement différente ( $p < 0,05$ ) de la lignée APP751, ## $p < 0,005$  ; ### $p < 0,0005$

§ valeurs significativement différentes ( $p < 0,05$ ) l'une de l'autre, §§ $p < 0,005$  ; §§§ $p < 0,0005$

(Test statistique utilisé : test de Student)

## **2. Analyse de l'expression des protéines du BER**

Afin de déterminer si la modulation de l'expression génique de certains acteurs du BER se reflétait au niveau de l'expression des protéines, nous avons utilisé la technique de Western-Blot pour comparer la quantité de quelques protéines entre la lignée mock et la lignée APP751, ayant subi ou non un traitement  $H_2O_2$  (figure 29). Pour OGG1, à l'état basal, la quantité de protéines était deux fois plus basse au sein de la lignée APP751 (0,48) qu'au sein de la lignée mock. Par contre, pour APE1, PARP1 et XRCC1 le niveau de protéines était plus élevé chez la lignée APP751 que chez la lignée mock (1,19 ; 1,37 et 1,65 respectivement). L'induction du taux de protéines, à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  était plus importante chez la lignée mock que chez la lignée APP751 dans le cas d'APE1, PARP1 et XRCC1 mais pas OGG1.

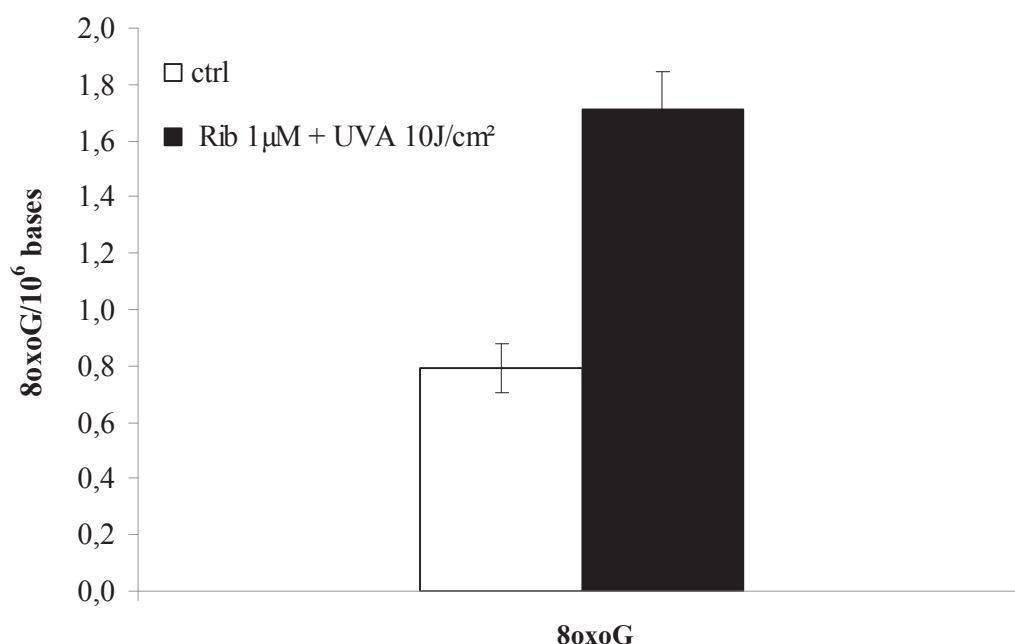


**Figure 29 : Comparaison de l'expression des gènes du BER.**

Le test de Western Blot a été réalisé sur des extraits cellulaires provenant des lignées mock et APP751, ensemencées pendant 48h et stressées ou non par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour une durée additionnelle de 24h. (a) Des images caractéristiques de l'abondance de chaque protéine testée, dans les différents échantillons et conditions, sont représentées avec leur contrôle β-actine associé. La quantification des différentes bandes et leur normalisation respectives par rapport aux bandes de la β-actine ont permis la comparaison entre la lignée mock et la lignée APP751 en conditions basales (b) et ont révélé que l'expression d'OGG1 était deux fois plus élevée dans la lignée mock que dans la lignée APP751 alors que l'expression des protéines APE1, PARP1 et XRCC1 apparut légèrement augmentée au sein de la lignée APP751. L'analyse des profils d'expression au sein de chaque lignée à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a permis de comparer la réponse de la lignée mock et de la lignée APP751(c). L'induction d'APE1, PARP1 et XRCC1 fut plus haute chez la lignée mock que chez la lignée APP751. Pour les deux lignées, l'expression d'OGG1 ne fut pas modulée après le stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3. Evaluation de la capacité d'excision de la 8oxoG dans un substrat d'ADN génomique

Jusqu'ici, nos résultats ont montré que le taux de dommages oxydatifs était plus élevé au sein de la lignée APP751 que de la lignée mock et que pourtant la plupart des gènes du BER étaient sous-exprimés au niveau transcriptomique, et parfois au niveau de l'expression des protéines, comme par exemple pour la glycosylase OGG1. Ainsi, nous avons voulu étudier la capacité d'excision de la lésion la plus représentative du stress oxydant, la 8oxoG. Pour cela, nous avons utilisé un test basé sur la technique des comètes, incluant une étape supplémentaire d'incubation d'un substrat génomique lésé, avec un extrait protéique. Le substrat génomique a été endommagé par une irradiation aux UVA, en présence de riboflavine. Ce traitement conduit majoritairement à la formation de 8oxoG, dont la présence a été vérifiée par HPLC/MS-MS (figure 30).



**Figure 30 : Analyse par HPLC-MS/MS du substrat endommagé par une exposition aux UVA et une incubation à la riboflavine.**

Les cellules LnCap sontensemencées pendant 72h avant d'être incubées pendant 20 minutes à 37°C en présence d'1 µM de riboflavine (Rib). Les cellules sont ensuite exposées à une dose de 10 J/cm<sup>2</sup> d'UVA et immédiatement récoltées. L'ADN est alors extrait et hydrolysé pour détecter les nucléosides par HPLC-MS/MS et quantifier le taux de 8oxoG par rapport aux nucléosides normaux.

Après incubation de ce substrat photo-oxydé avec les extraits protéiques issus de nos deux lignées, préalablement ou non traitées par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la quantité d'ADN dans la queue de la comète est proportionnelle à la quantité de dommages excisés par l'extrait cellulaire (figure 31).

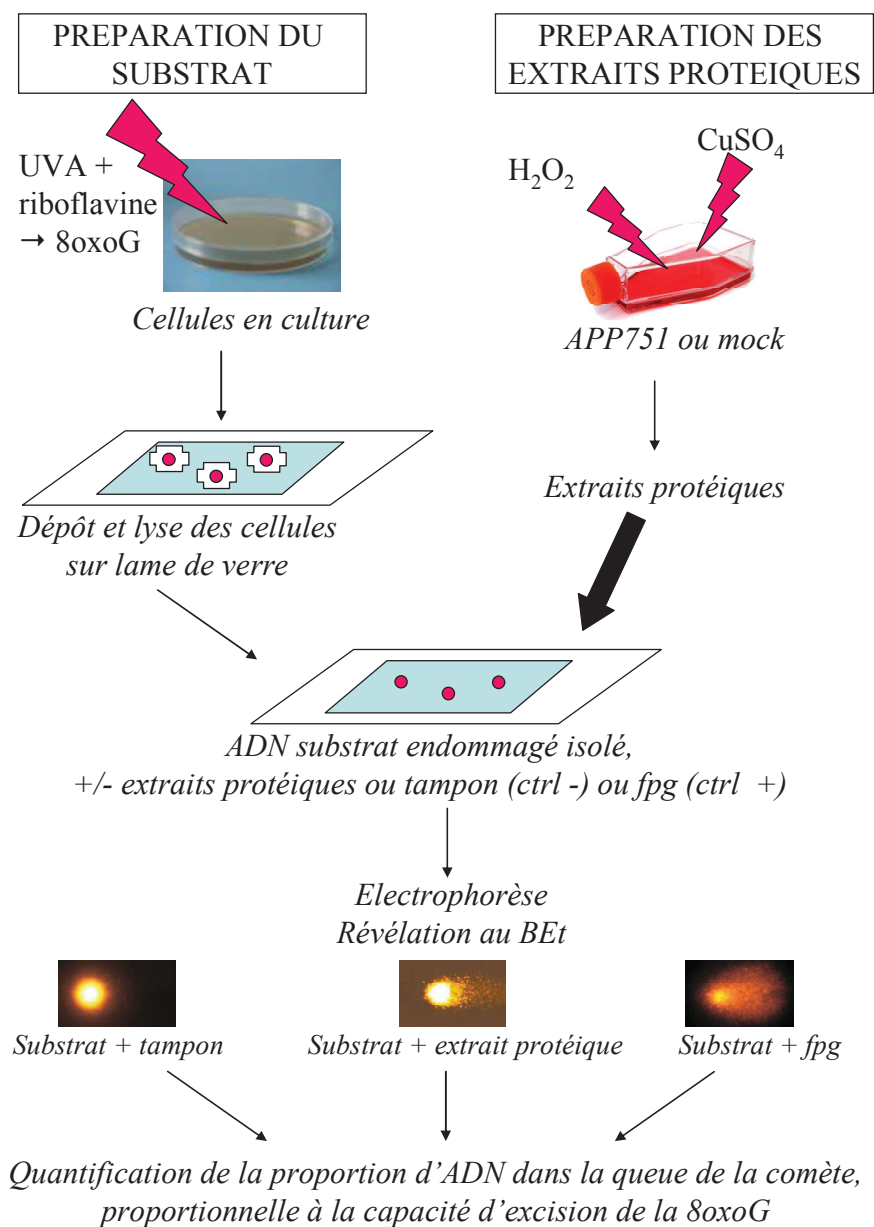
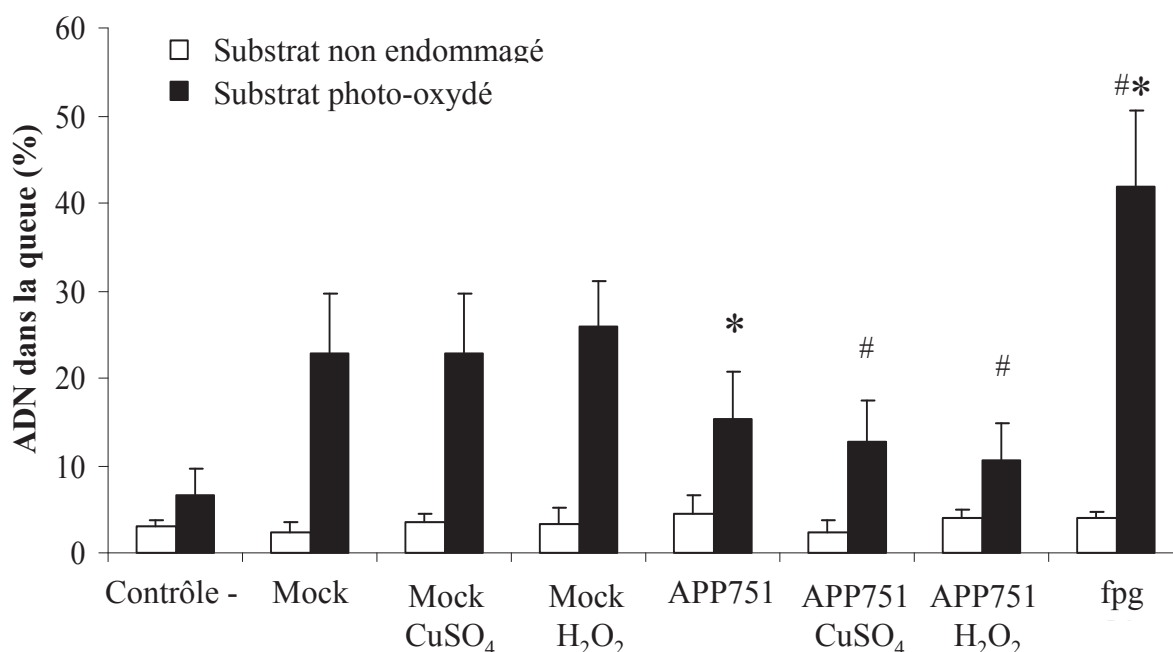


Figure 31 : principe du test de réparation basé sur la technique des comètes.



Nous avons montré (figure 32) que l'extrait protéique des cellules mock ( $22,9 \pm 6,7$ ) avait un potentiel d'excision plus élevé que celui de la lignée APP751 ( $15,4 \pm 5,4$  ;  $p=0,0009$ ) à l'état basal. Aucune induction du potentiel d'excision n'a pu être mise en évidence au sein de la lignée mock à l'issue d'un stress par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mais une inhibition significative ( $p=0,02$ ) fut montrée au sein de la lignée APP751 après un stress au  $\text{CuSO}_4$  ( $15,4 \pm 5,4$  versus  $12,7 \pm 4,6$ ) et encore plus après un stress par  $\text{H}_2\text{O}_2$ . ( $15,4 \pm 5,4$  versus  $10,5 \pm 4,4$  ;  $p=0,006$ ).



**Figure 32 : Evaluation de la capacité d'excision de 8oxoG par des extraits protéiques.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h à l'issue desquelles un stress au  $\text{CuSO}_4$  ( $350 \mu\text{M}$ ) ou à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $115 \mu\text{M}$ ) est appliqué. Des extraits protéiques totaux sont réalisés à partir des différents échantillons et différentes conditions. La capacité d'excision des ces différents extraits est mesurée sur un substrat génomique photo-oxydé (UVA + riboflavine), comportant une proportion élevée de 8oxoG. En tant que contrôle négatif nous avons utilisé le tampon d'extraction seul et en tant que contrôle positif nous avons utilisé la fpg. La capacité d'excision des différents extraits ou contrôle est définie par la quantité d'ADN dans la queue de la comète (%). Un substrat génomique non endommagé est utilisé pour infirmer la présence de nucléases aspécifiques et affirmer la reconnaissance spécifique des extraits protéiques envers les lésions générées dans le substrat endommagé. Trois expériences indépendantes ont été réalisées ( $n=3$ ). Aucune augmentation de la capacité d'excision ne fut détectée au sein de la lignée mock à l'issue d'un stress au  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , alors qu'une diminution de ces capacités fut observée au sein de la lignée APP751.

\* : valeur significativement différente de la lignée mock ( $p<0,05$ , test de Student)

# : valeur significativement différente de la lignée APP751 ( $p<0,05$ , test de Student)

#### **4. Mesure de la capacité d'excision de petites bases endommagées par l'utilisation d'un test multiplexé : la biopuce oligonucléotidique**

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la capacité d'excision de petites lésions associées au BER dans la lignée APP751 et les comparer à celles de la lignée mock, nous avons utilisé un test miniaturisé, la biopuce oligonucléotidique. Cette dernière permet la quantification du potentiel d'excision de nombreux dommages de base par des extraits protéiques nucléaires. Les principes de la biopuce sont schématisés en figure 33. Ce support permet donc d'analyser la capacité d'excision des lésions suivantes : 8oxoG en face d'une Cytosine (8oxoG-C) ; Adénine en face d'une 8oxoG (A-8oxoG) ; dihydrothymidine (dHT-A) ; ethénoadénine (EthA-T) ; hypoxanthine en face d'une Thymine (Hx-T) ; uracile en face d'une Adénine (U-A) ; Tg en face d'une Adénine (Tg-A) et enfin le tétrahydrofurane, (THF, analogue stable d'un site abasique) en face d'une Adénine (THF-A).

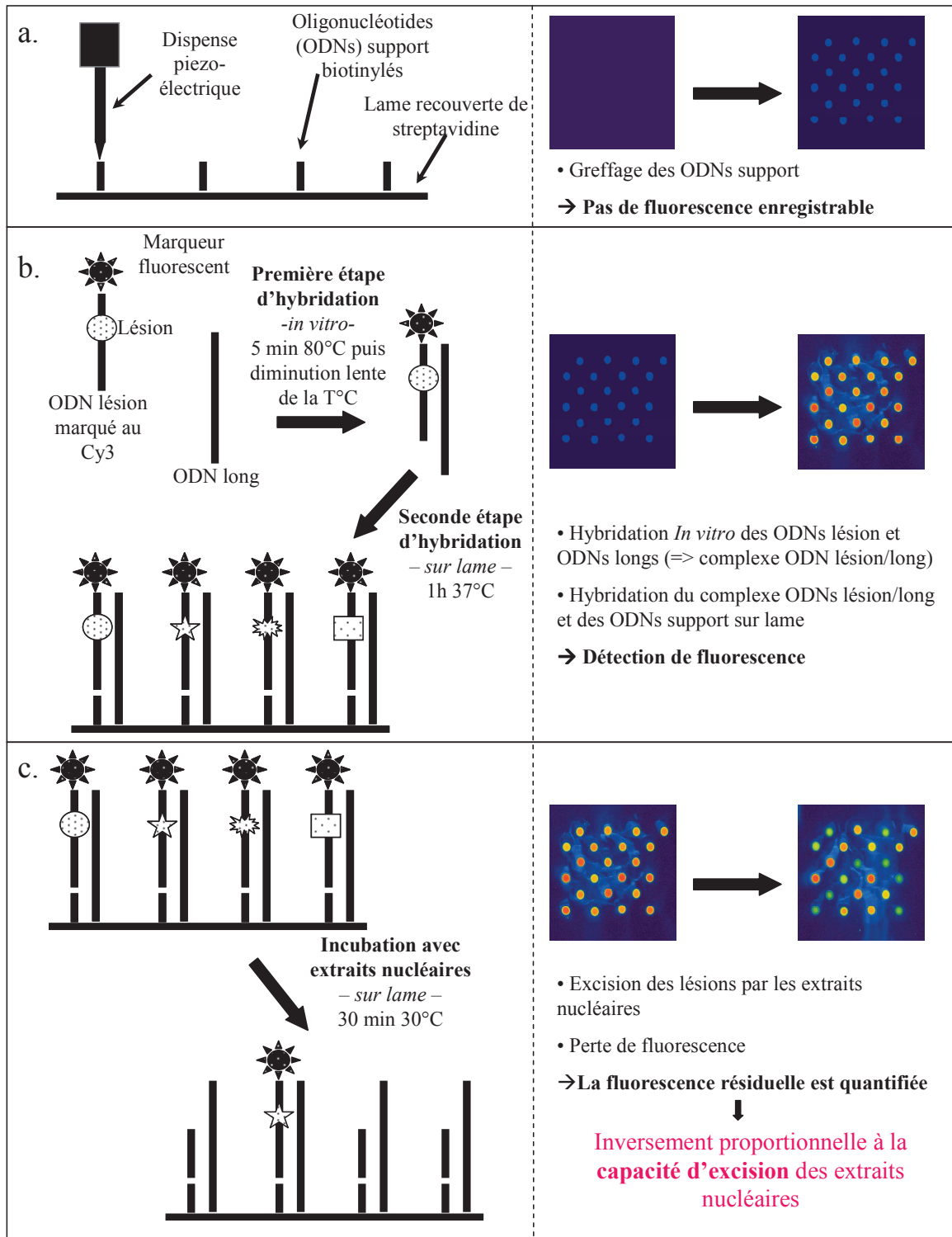
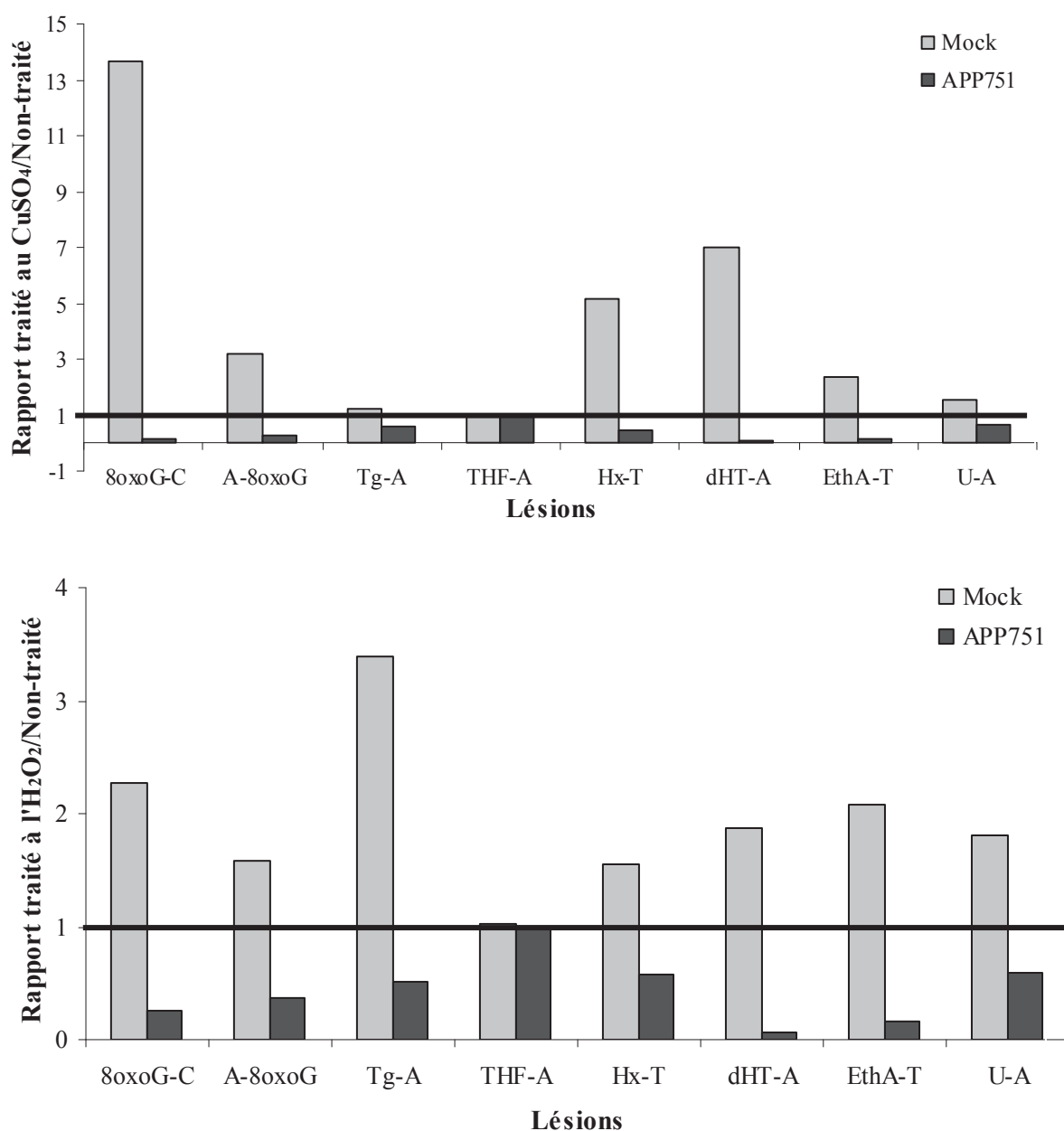


Figure 33 : principe de fonctionnement de la puce oligonucléotidique.

Nous avons quantifié la capacité d'excision de chaque lésion par des extraits protéiques nucléaires, issus de chaque lignée ayant été confrontée ou non à un stress par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figure 34). Afin de mettre en avant l'induction ou l'inhibition de la capacité d'excision à l'issue d'un traitement métallique ou oxydant, nous avons présenté nos résultats sous la forme d'un rapport traité/non-traité. La capacité d'excision de la 8oxoG-C apparut augmentée au sein de la lignée mock, avec des inductions de 13,2 et 2,3 fois après traitements par  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement. A l'inverse, la capacité d'excision était inhibée au sein de la lignée APP751, avec des rapports traité/non-traité de 0,1 et 0,3 fois respectivement après stress par  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reconnaissance de la lésion A-8oxoG fut induite de 3,2 fois pour  $\text{CuSO}_4$  et 1,58 fois pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  au sein de la lignée mock, et inhibée par 0,3 et 0,4 pour  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement, au sein de la lignée APP751. La capacité d'excision de la lésion Tg-A fut augmentée 1,3 et 3,4 chez la lignée mock après un stress par  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement. Au contraire, l'excision de la Tg-A fut diminuée 0,6 et 0,5 fois chez la lignée APP751 après un stress par  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement. La capacité d'excision de la lésion THF-A ne fut pas modifiée après un stress par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  : les rapports traité/non-traité furent 1,1 ; 0,99 ; 1,02 et 0,9 pour mock-  $\text{CuSO}_4$ /mock, mock-  $\text{H}_2\text{O}_2$ /mock, APP751-  $\text{CuSO}_4$ /APP751 et APP751-  $\text{H}_2\text{O}_2$ /APP751, respectivement. La capacité d'excision de la lésion Hx-T fut améliorée de 5,2 fois à l'issue d'un stress  $\text{CuSO}_4$  et 1,6 fois à l'issue d'un stress  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la lignée mock et diminuée de 0,5 et 0,6 fois dans la lignée APP751 à l'issue des mêmes traitements. La réparation de la lésion dHT-A fut multipliée par 7 après un stress  $\text{CuSO}_4$  et par 1,9 après un stress  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans la lignée mock, et inhibée par 0,1 et 0,07 dans la lignée APP751. La capacité d'excision de l'EthA-T fut augmentée de 2,4 et 2 fois chez la lignée mock après un stress par  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement, et diminuée 0,17 et 0,16 fois chez la lignée APP751. la capacité d'excision de U-A fut induite de 1,6 fois pour  $\text{CuSO}_4$  et 1,9 fois pour  $\text{H}_2\text{O}_2$  au sein de la lignée mock, et inhibée par 0,7 et 0,6 pour  $\text{CuSO}_4$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  respectivement, au sein de la lignée APP751.



**Figure 34 : Potentiel d'induction ou d'inhibition (par rapport à l'état basal) de l'excision de certaines lésions du BER par les extraits protéiques des cellules mock et APP751 ayant subi un stress.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h à l'issue desquelles 115  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou 350  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  sont ajoutés au milieu de culture. Des extraits protéiques nucléaires sont réalisés à partir des différents échantillons. Vingt  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  d'extrait nucléaire sont alors testés pendant 30 minutes pour leur capacité d'excision des différentes lésions portées par la biopuce oligonucléotidique. Les traitements au  $\text{CuSO}_4$  et à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ont induit le potentiel d'excision au sein de la lignée mock alors que ces mêmes traitements ont inhibé les capacités d'excision de la lignée APP751.

8oxoG-C: 8oxoG en face d'une Cytosine; A-8oxoG: Adénine en face d'une 8oxoG; dHT-A: dihydrothymidine; EthA-T: ethénoadénine; Hx-T: hypoxanthine en face d'une Thymine ; U-A: uracile en face d'une Adénine; Tg-A: Tg en face d'une Adénine; THF-A: THF en face d'une Adénine.

## **C. Conclusion**

Dans cette seconde partie, nous avons montré que malgré l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN, la lignée APP751 sous-exprimait de nombreux gènes du BER par rapport à la lignée mock, à l'état basal. A l'issue d'un stress, métallique ou oxydant, alors que la lignée mock surexprimait bon nombre des acteurs de la réparation, leur présence relative à l'échelle transcriptionnelle était encore plus réduite chez la lignée APP751, suggérant une incapacité de la lignée à répondre à une attaque extérieure. Pour explorer cette hypothèse, nous avons mesuré et comparé les capacités de réparation des deux lignées, à l'état basal et à la suite d'un stress, en utilisant deux tests différents notamment par le type d'extraits protéiques mis en jeu ainsi que par le type de substrat endommagé.

Le test de réparation basé sur la technique des comètes, permettant l'analyse de la capacité d'excision de la 8oxoG au sein d'ADN génomique, par des extraits totaux, a démontré un plus grand potentiel de réparation pour la lignée mock que pour la lignée APP751, à l'état basal. A l'issue d'un stress, aucune modulation n'a été établie chez la lignée mock, mais la capacité d'excision fut encore plus diminuée au sein de la lignée APP751. L'avantage majeur de ce test est le substrat utilisé. En effet, l'ADN génomique issue d'une lignée cellulaire humaine conserve son degré de compaction et permet de mimer l'action des protéines de réparation lors de leur recrutement aux abords d'un dommage au sein de la cellule. Le type d'extraits protéique utilisé est cependant susceptible d'induire quelques biais. Comme son nom l'indique, l'extrait total comporte à la fois les protéines nucléaires et les protéines cytoplasmiques. Or, à l'issue d'un stress, certaines protéines de réparation exprimées de manière constitutive dans le cytoplasme sont transloquées dans le noyau afin d'entamer le processus de réparation. L'extrait protéique total est donc susceptible de comporter des protéines de réparation cytoplasmiques qui vont agir sur le substrat endommagé alors qu'elles n'ont pas été véritablement induites à l'issue du stress. Il faut cependant rester modéré sur ce risque de « faux positif » en quelque sorte, puisque la translocation nucléaire des protéines de

réparation va souvent de paire avec leur activation. Pourtant, par le test de réparation basée sur la technique des comètes, nous ne détectons pas d'augmentation de la capacité d'excision de la 8oxoG chez la lignée mock à l'issue d'un stress, alors que cette induction est visible en utilisant la biopuce oligonucléotidique. Il pourrait s'avérer que « noyées » au milieu des protéines cytoplasmiques, la capacité d'excision des protéines de réparation stimulées par un stress ne soient pas détectable. De plus, la complexité du substrat (ADN génomique contre oligonucléotides lésés) pourrait rendre plus difficile ou plus lente l'accessibilité des lésions aux protéines de réparation.

Le test sur biopuce nous a en revanche révélé une forte induction des capacités d'excision par la lignée mock à l'issue d'un stress métallique ou oxydant. Chez la lignée APP751, l'inhibition de la capacité d'excision de la 8oxoG, également observée par le test de réparation basé sur la technique des comètes, a donc été donc confirmée. Cette observation valide la baisse d'expression de la glycosylase OGG1 observée au niveau transcriptionnel. Ce test sur support multiparamétrique nous a permis d'obtenir des informations sur la capacité d'excision d'autres lésions spécifiques du BER et donc d'étendre notre analyse à d'autres glycosylases, dont certaines ont également vu leur expression génique mesurée par qPCR. La surexpression de la glycosylase MYH au niveau transcriptomique chez la lignée mock a pu par exemple être corrélée à une induction des capacités d'excision de la lésion A-8oxoG sur la biopuce à l'issue d'un stress oxydant. A l'inverse, la sous-expression génique de cette même glycosylase chez la lignée APP751 à l'issue d'un stress métallique a pu être corrélée à une inhibition des capacités d'excision d'MYH.

La baisse générale du système BER que nous venons d'observer en présence d'A $\beta$ , encore plus marquée par l'ajout d'un stress oxydant ou métallique, vient s'ajouter à l'augmentation des dommages oxydatifs que nous avons relatée précédemment. La réponse cellulaire de la lignée APP751 est similaire à celle fréquemment observée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Davydov *et al.* 2003). Nos résultats suggèrent donc un rôle majeur

dans ces observations cliniques pour le peptide neurotoxique. En effet, ils montrent un lien direct entre présence d'A $\beta$ , augmentation des dommages à l'ADN et dérégulation des systèmes de réparation. La combinaison des deux derniers phénomènes pourrait vraisemblablement conduire à une accumulation de dommages non réparés, susceptibles d'entraîner les cellules concernées vers un processus d'apoptose (Herrup *et al.* 2004). Cette hypothèse est représentée dans la figure 35 et sera explicitée davantage dans la partie discussion.

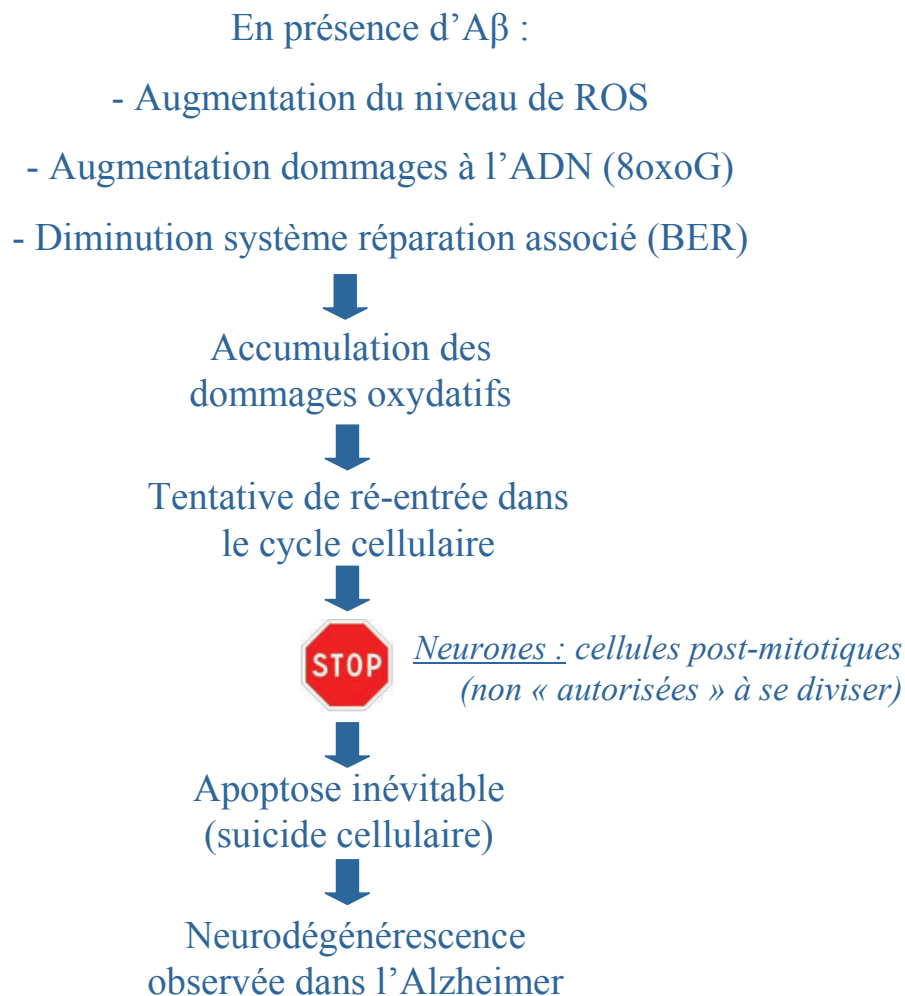


Figure 35 : Hypothèse concernant l'implication de la réparation de l'ADN dans la maladie d'Alzheimer.



### III. Surexpression du NER chez la lignée APP751 après un stress oxydant

#### A. Introduction

Le BER est le système de réparation majoritaire pour les lésions oxydatives (petites bases modifiées et cassures simple). Cependant il existe un phénomène de recouvrement entre les différentes voies de réparations : par exemple, certaines protéines du NER ont été impliquées dans la voie BER (Dusinska *et al.* 2006). De plus, outre les petites bases oxydées, les cassures simple brin ou les sites abasiques, des lésions plus volumineuses ainsi que des cassures double brin peuvent être engendrées à l'issue d'un stress oxydant, et mettre en jeu d'autres systèmes de réparation que le BER. De ce fait, il paraît important de s'intéresser à l'état des autres systèmes de réparation dans la lignée APP751, et notamment le NER puisque des déficiences génétiques au niveau de ce système évoluent vers des phénomènes de neurodégénérescences dans certains pathologies comme XP ou CS (Rass *et al.* 2007b). Les principes généraux du NER et ses protagonistes majeurs sont représentés en figure 36. Dans cette troisième partie de résultats, nous étudierons le comportement du NER en réponse à un stress oxydant, mais aussi en réponse à un stress générant des lésions plus volumineuses (UVC).

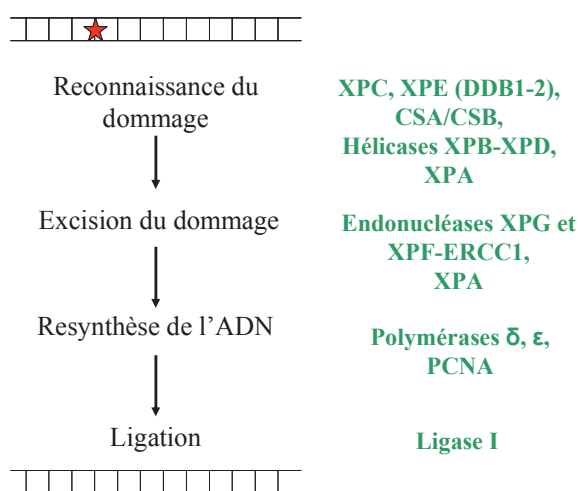


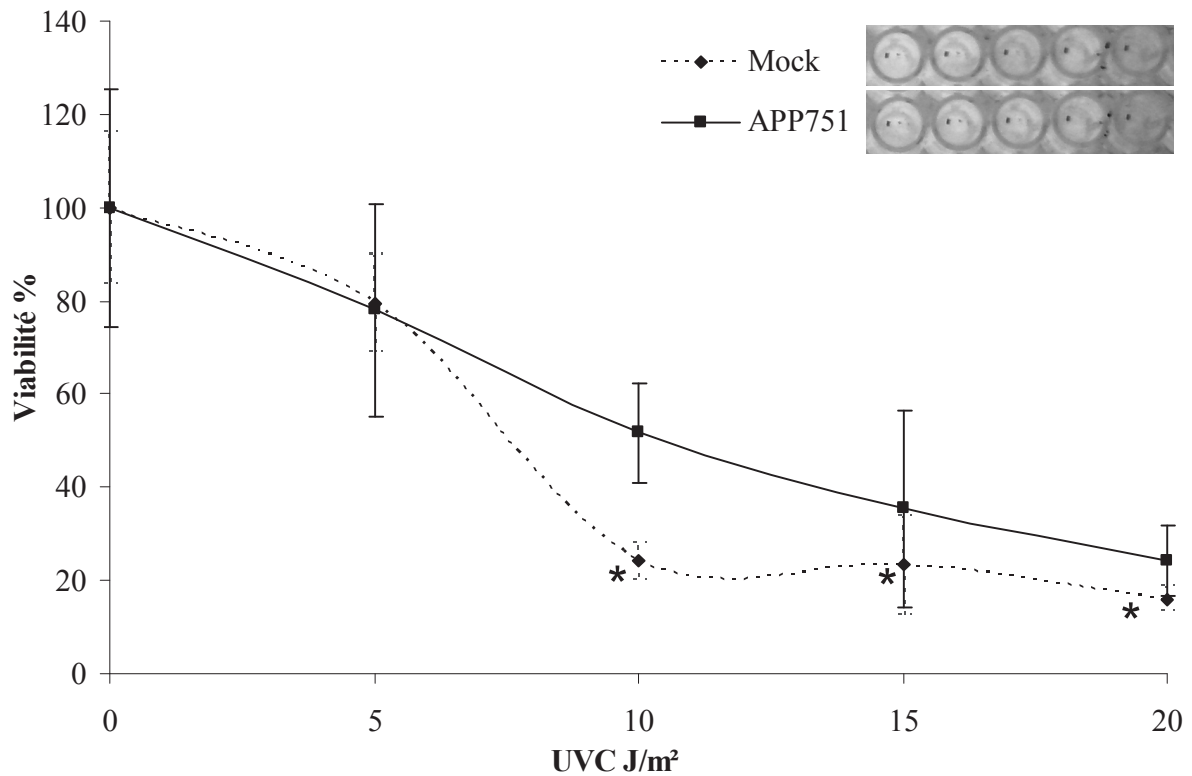
Figure 36 : Principales étapes du NER et protéines impliquées.

## B. Résultats

### 1. Evolution de la viabilité et du potentiel clonogénique engendrés par les UVC au sein des deux lignées

Pour évaluer la viabilité cellulaire (figure 37) ainsi que le potentiel clonogénique (figure 38) à l'issue d'une exposition aux UVC, nous avons utilisé respectivement le test MTT et le test de clonogénicité. Le test MTT, déjà utilisé en partie II des résultats, évalue la viabilité cellulaire via la quantification de la respiration mitochondriale. Le potentiel clonogénique permet d'évaluer la capacité de cellules volontairement isolées (par un ensemencement à faible densité) à former des colonies.

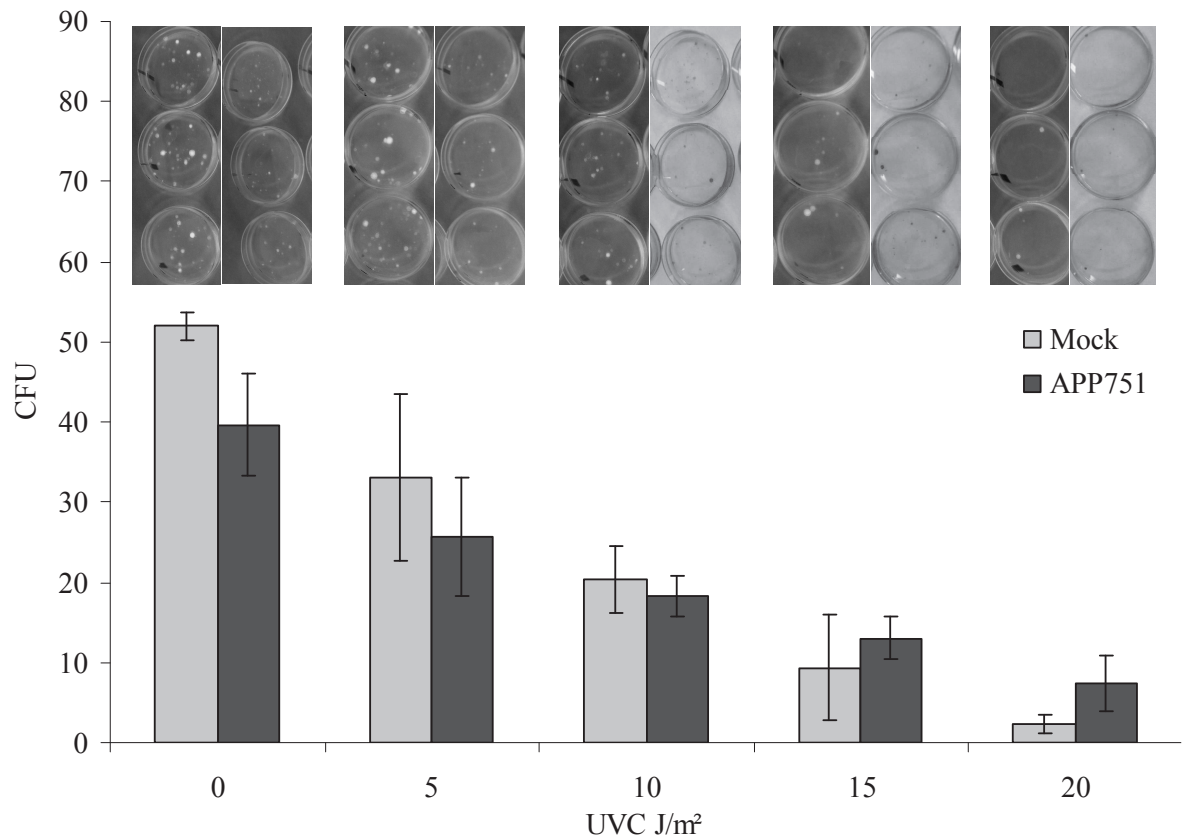
Quatre doses d'irradiations ont été appliquées : 5, 10, 15 et 20 J/m<sup>2</sup>. Parmi les doses induisant une différence significative entre les deux lignées, à 10 J/m<sup>2</sup>, la lignée mock se révéla plus sensible en terme de viabilité évaluée par le MTT, que la lignée APP751 (24% versus 51,8% ; p=0,0001). Après une irradiation à 15 J/m<sup>2</sup>, la survie cellulaire fut plus affectée chez la lignée mock (23% de viabilité) que chez la lignée APP751 (35,4% ; p=0,04). A 20 J/m<sup>2</sup>, la lignée mock fut plus sensible que la lignée APP751, avec des pourcentages de survie résiduelle de 16,1% et 24,2% respectivement (p=0,0001). Pour aucune des doses testées le potentiel clonogénique ne fut plus affecté dans une lignée que dans l'autre. Pour les futures expériences, nous avons choisi d'utiliser la plus basse dose d'irradiation (5 J/m<sup>2</sup>), cette dernière n'induisant pas de différence significative de survie entre les deux lignées, et correspondant à une proportion acceptable de 80% de viabilité.



**Figure 37 : Courbes de viabilité à l'issue d'une irradiation UVC.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h, à l'issue desquelles 4 doses d'UVC sont appliquées : 5, 10, 15 et 20 J/m<sup>2</sup>. Les cellules sont alors cultivées pendant 24h additionnelles et le test MTT est réalisé pour évaluer la viabilité cellulaire. La dose la plus faible (5 J/m<sup>2</sup>) n'engendra pas de différence entre les deux lignées et est choisie comme concentration de travail pour les expériences ultérieures.

\* : valeur significativement différente de la lignée mock ( $p < 0,05$ , test de Student)

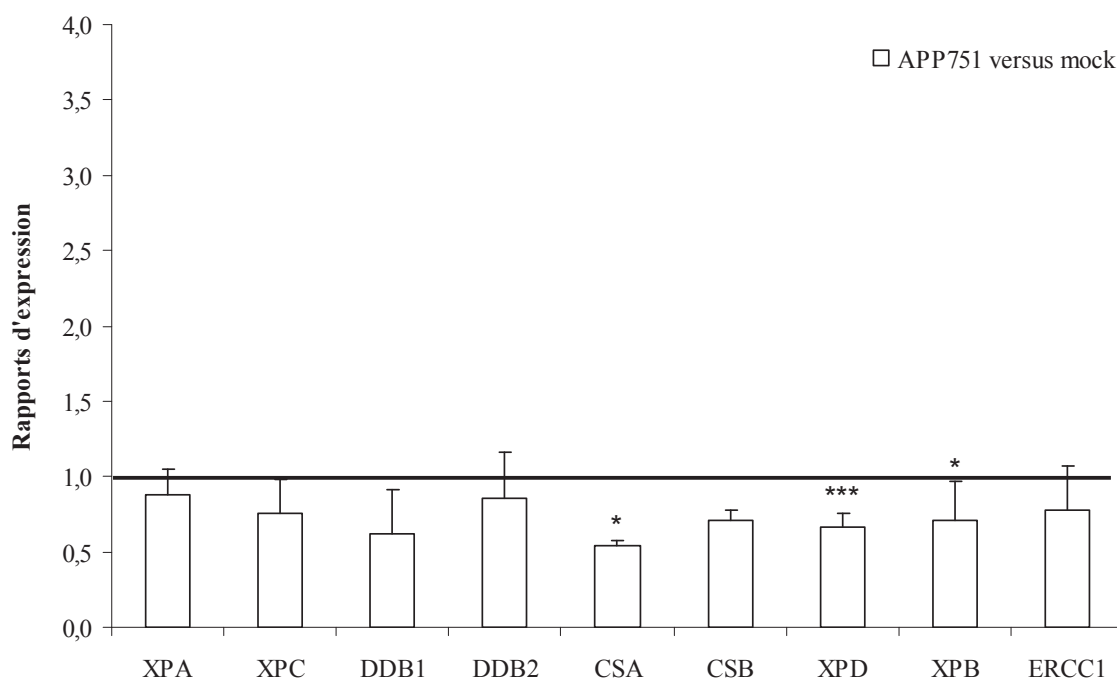


**Figure 38 : Potentiel de clonogénicité à l'issue d'une irradiation UVC.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h à l'issue desquelles quatre doses d'UVC sont appliquées (5, 10, 15 et 20 J/m<sup>2</sup>). Les cellules sont cultivées pendant 12 jours additionnels et les colonies formées pendant cette période révélées par l'utilisation d'une solution de crystal violet et comptées manuellement. Des images caractéristiques ainsi qu'une représentation graphique des CFU (colony forming unit) sont présentées ci-dessus. Aucune dose d'irradiation n'induit de différence significative entre les deux lignées.

## 2. Comparaison des profils d'expression des gènes du NER à l'état basal entre la lignée APP751 et la lignée mock

L'expression génique des enzymes du NER fut mesurée par la technique de qPCR en temps réel. Nous avons dans un premier temps comparé l'expression des gènes du NER entre la lignée mock et la lignée APP751 à l'état basal (figure 39). Les rapports d'expression de XPA, XPC, DDB1, DDB2, CSB et ERCC1 n'apparurent pas différents entre les deux lignées cellulaires. L'expression de CSA fut cependant réduite dans la lignée APP751 comparée à la lignée mock ( $0,54 \pm 0,04$  ;  $p=0,04$ ). L'expression de XPD fut également diminuée par  $0,67 \pm 0,19$  dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock ( $p=0,0007$ ). Le rapport d'expression d'XPB fut modulé par  $0,71 \pm 0,26$  dans la lignée APP751 comparée à la lignée mock ( $p=0,02$ ).



**Figure 39 : Profil d'expression génique des gènes du NER dans la lignée APP751 comparée à la lignée mock.**

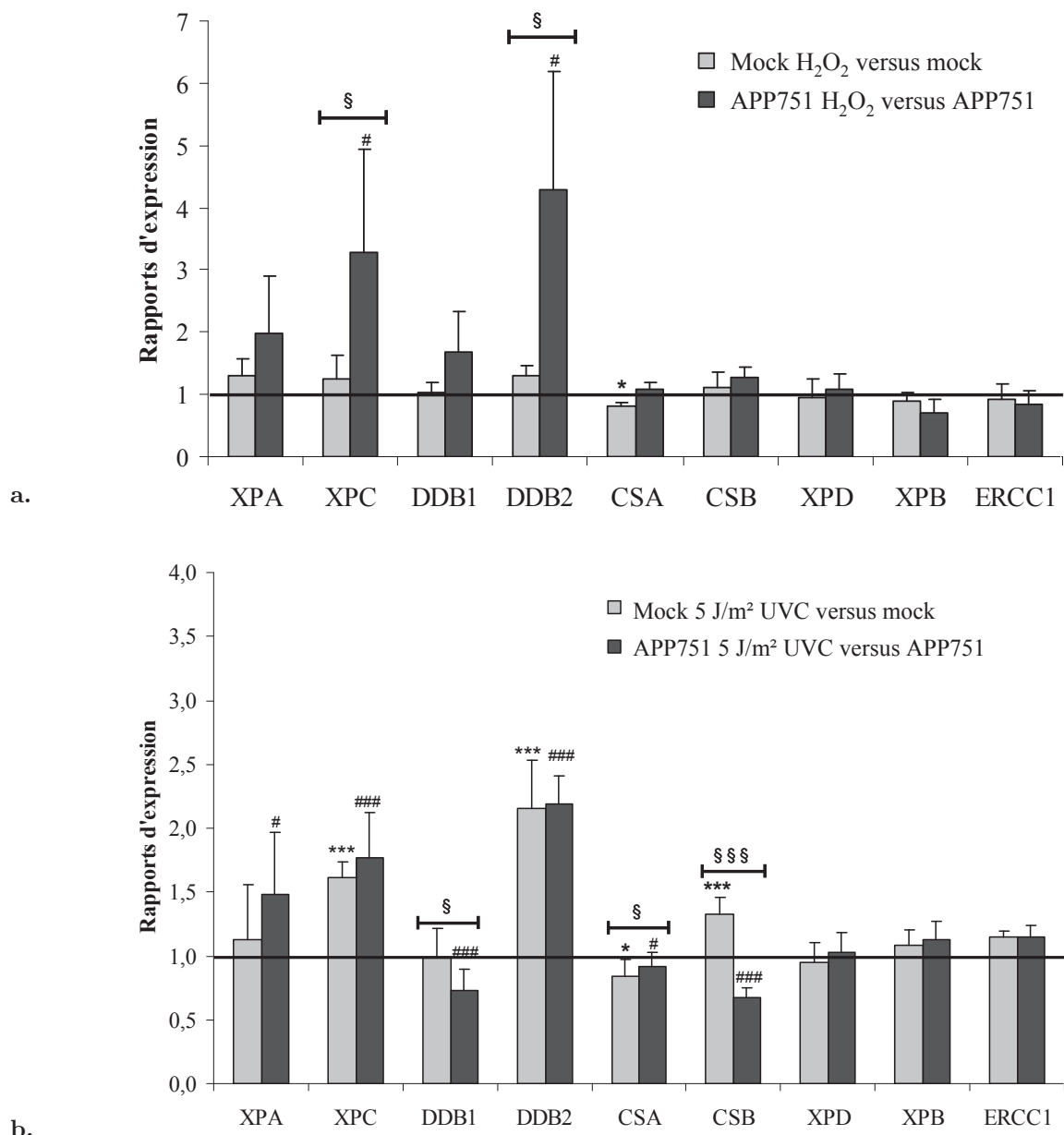
Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h. L'ARN total est extrait immédiatement et subséquentment reverse-transcrit. Vingt ng d'ADNc sont ensuite utilisés comme matrice pour chaque run d'amplification par qPCR. L'expression relative des gènes du NER dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock indique une sous-expression des gènes CSA, XPB et XPD dans la lignée sécrétrice d'A $\beta$ . Sept expériences indépendantes ont été réalisées (n=7).

\* valeur significativement différente ( $p<0,05$ ) de la lignée mock, \*\* $p<0,005$  ; \*\*\* $p<0,0005$ .

### 3. Comparaison des profils d'expression des gènes du NER à l'issue d'un stress oxydant ou d'un stress UVC

Nous avons ensuite examiné les profils d'expression des deux lignées cellulaires à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  (figure 40.a). L'expression d'XPA, DDB1, XPD, XPB, CSB et ERCC1 ne fut significativement modulée dans aucune des deux lignées. Le rapport d'expression du gène CSA fut diminué au sein de la lignée mock ( $0,83 \pm 0,04$  ;  $p=0,002$ ) mais ne fut pas modulé au sein de la lignée APP751. Le rapport d'expression d'XPC à la suite d'un stress  $H_2O_2$  au sein de la lignée mock ne fut pas modifié, mais il fut surexprimé de manière significative dans la lignée APP751 ( $1,99 \pm 0,92$  ;  $p=0,93$ ). De plus, le profil d'expression fut significativement différent entre les deux lignées cellulaires ( $p=0,05$ ), impliquant une réponse propre à chaque lignée. Le rapport d'expression suivant un stress  $H_2O_2$  fut augmenté au sein de la lignée mock ( $1,31 \pm 0,15$  ;  $p=0,01$ ) mais encore plus au sein de la lignée APP751 ( $4,28 \pm 1,91$ ,  $p=0,02$ ). Les rapports d'expression des deux lignées furent également significativement différents l'un de l'autre ( $p=0,03$ ).

A l'issue d'une irradiation UVC (figure 40.b), l'expression d'XPA n'était pas significativement modulée dans la lignée mock, alors qu'elle était surexprimée chez la lignée APP751 ( $1,48 \pm 0,49$  ;  $p=0,03$ ). Ces rapports d'expression n'étaient pas significativement différents l'un de l'autre. XPC apparut significativement sur-exprimé au sein de chacune des deux lignées ( $1,61 \pm 0,13$  ;  $p=1.10^{-9}$  pour mock et  $1,76 \pm 0,36$  ;  $p=0,0005$  pour APP751). Ces deux réponses n'étaient pas significativement différentes l'une de l'autre. Le même schéma fut observé pour DDB2, avec une augmentation de  $2,15 \pm 0,37$  pour la lignée mock ( $p=2.10^{-7}$ ) et de  $2,18 \pm 0,22$  pour la lignée APP751 ( $p=1.10^{-6}$ ). Ces deux sur-régulations de DDB2 dues à l'irradiation UVC n'étaient pas significativement différentes l'une de l'autre. DDB1 ne fut pas modulé au sein de la lignée mock mais il apparut sous-exprimé au sein de la lignée APP751 ( $0,73 \pm 0,17$  ;  $p=0,002$ ). Ces deux rapports d'expression furent significativement différents l'un de l'autre. ( $p=0,02$ ).



**Figure 40 : Comparaison des profils d'expression des lignées mock et APP751 à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'un stress UVC.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h, et traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 µM) ou exposées aux UVC (5 J/m<sup>2</sup>) pendant 24h. L'ARN total est immédiatement extrait et subséquentement reverse-transcrit. Vingt ng d'ADNc sont ensuite utilisés comme matrice pour chaque run d'amplification par qPCR. L'expression relative des gènes du NER dans la lignée mock traitée à l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport à la lignée mock ou la lignée APP751 traitée à par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport à la lignée APP751 est calculée par le logiciel REST et représentée graphiquement en (a). L'expression relative des gènes du NER dans la lignée mock exposée aux UVC par rapport à la lignée mock ou la lignée APP751 exposée aux UVC par rapport à la lignée APP751 est calculée par le logiciel REST et représentée graphiquement en (b). Le profil d'expression fut différent entre les lignées mock et APP751 à l'issue de l'exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comme résultats le plus marquant notons la surexpression de DDB2 et XPC au sein de la lignée APP751 et leur non-modulation au sein de la lignée mock. Le profil d'expression des gènes du NER fut similaire entre les lignées mock et APP751 à l'issue d'une irradiation aux UVC, avec une surexpression équivalente des gènes comme DDB2 et XPC. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n=3).

\* valeur significativement différente (p<0,05) de la lignée mock, \*\*p<0,005 ; \*\*\*p<0,0005

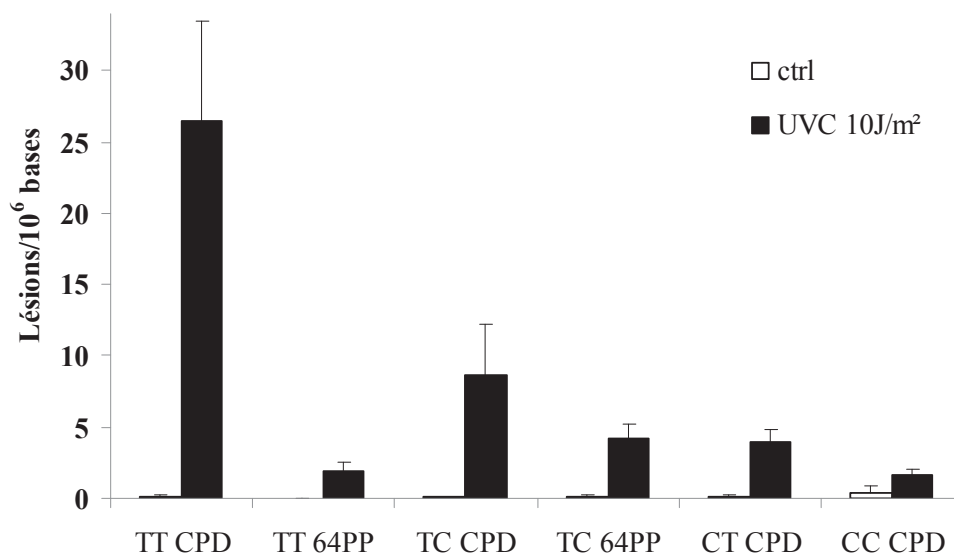
# valeur significativement différente (p<0,05) de la lignée APP751, ##p<0,005 ; ###p<0,0005

§ valeurs significativement différentes (p<0,05) l'une de l'autre, §§p<0,005 ; §§§p<0,0005, test de Student.

L'expression de CSA fut réduite dans la lignée mock ( $0,84 \pm 0,14$  ;  $p=0,005$ ) et dans la lignée APP751 ( $0,92 \pm 0,10$  ;  $p=0,03$ ). Ces deux rapports n'étaient pas significativement différents l'un de l'autre. L'expression de CSB fut sur-exprimée au sein de la lignée mock ( $1,32 \pm 0,14$  ;  $p=2.10^{-5}$ ) et sous exprimée au sein de la lignée APP751 ( $0,67 \pm 0,08$  ;  $p=6.10^{-8}$ ). Les deux réponses furent significativement différentes l'une de l'autre ( $p=7.10^{-8}$ ). Chez les deux lignées, l'irradiation en UVC n'induisit aucune modulation pour les gènes XPB, XPD et ERCC1.

#### 4. Mesure de l'activité d'excision des photoproduits par les extraits protéiques des lignées mock et APP751

Afin d'analyser l'activité protéique des enzymes du NER, nous avons testé le potentiel d'excision d'extraits protéiques des lignées mock et APP751 sur un substrat génomique endommagé par une exposition aux UVC, afin d'introduire des photoproduits. La présence de CPDs et 6-4 PP dans le substrat génomique endommagé a été vérifié par HPLC-MS/MS (figure 41).



**Figure 41 : Analyse par HPLC-MS/MS du substrat endommagé par une exposition aux UVC.**

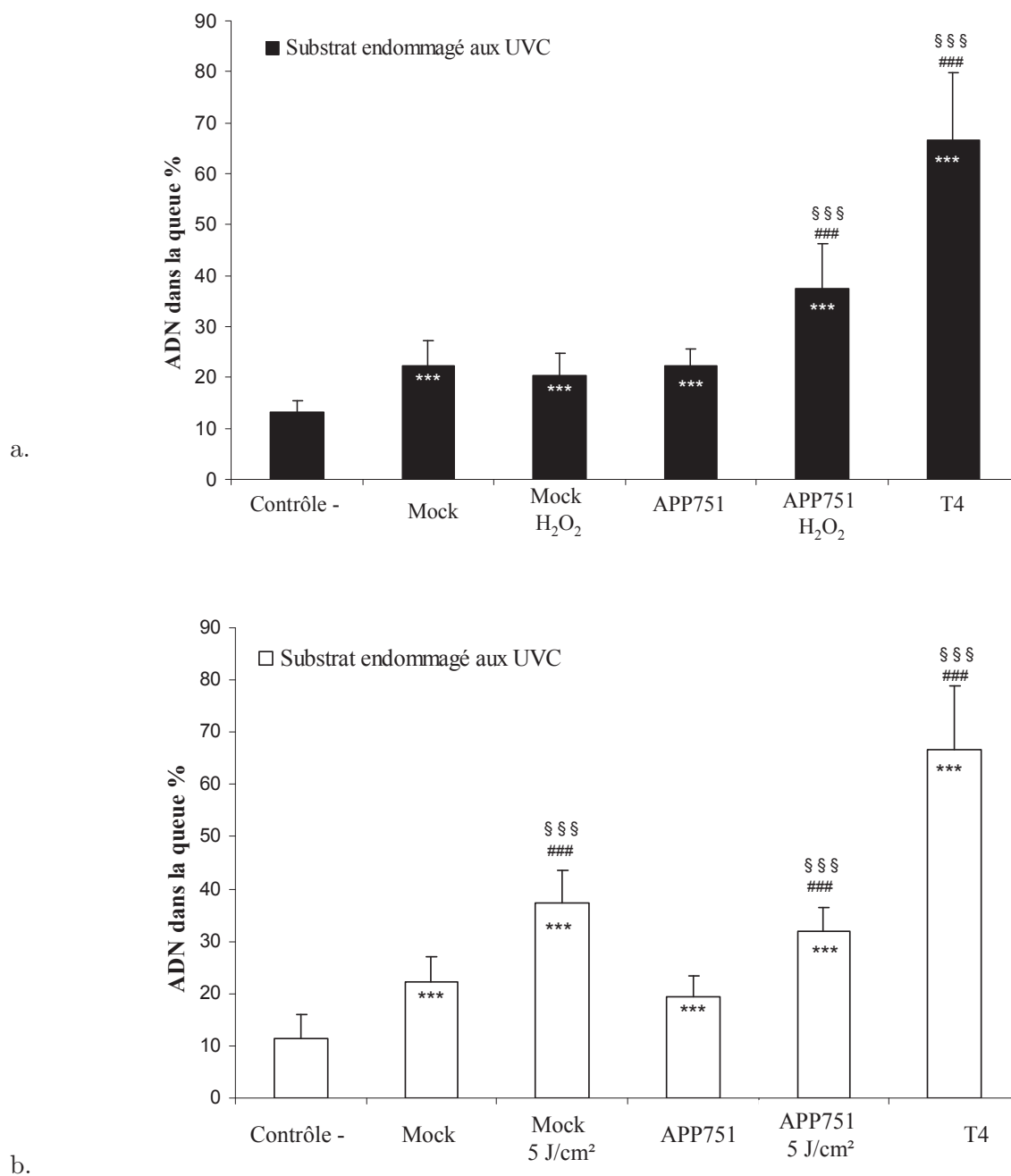
Les cellules LnCap sont ensemencées pendant 72h avant d'être exposées à une dose de  $10 \text{ J/m}^2$  d'UVC et immédiatement récoltées. L'ADN est alors extrait et hydrolysé pour détecter les nucléosides par HPLC-MS/MS et quantifier le taux de lésions (6-4 PP et CPDs) par rapport aux nucléosides normaux.



La capacité d'excision des différents extraits protéiques issus des lignées mock et APP751 sur substrat génomique endommagé a été évaluée par le test de réparation basé sur la technique des comètes (figure 31, paragraphe II.B.3). La quantité d'ADN dans la queue de la comète a été assimilée à la capacité d'excision d'un extrait cellulaire donné. Nous avons commencé par vérifier que les capacités d'excision des extraits protéiques étaient significativement différentes du taux d'excision non spécifique induit par le contrôle négatif (tampon réactionnel uniquement), démontrant ainsi la spécificité d'excision des photoproduits par les extraits cellulaires. L'enzyme T4 endonucléase V a été utilisée en tant que contrôle positif, indiquant un maximum d'excision des photoproduits portés par le substrat.

Nous avons montré (figure 42.a) que l'application d'un stress  $H_2O_2$  à la lignée mock n'induisait pas d'augmentation de l'excision des photoproduits (22,4 % et 20,5% pour les échantillons mock et mock  $H_2O_2$  respectivement). Au sein de la lignée APP751, l'induction de la capacité d'excision des photoproduits par un stress  $H_2O_2$  fut observée (22,3% pour la lignée APP751 à l'état basal et 37,5% pour la lignée APP751 à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  ;  $p=3.10^{-6}$ ). La capacité d'excision de la lignée APP751 traitée à l'  $H_2O_2$  fut significativement différente de la capacité d'excision de la lignée mock traitée également à l'  $H_2O_2$  ( $p=1.10^{-6}$ ).

La capacité d'excision des photoproduits par les extraits cellulaires mock et APP751 préalablement irradiées aux UVC (figure 42.b) fut induite de manière similaire entre les deux lignées. Chez la lignée mock, la capacité d'excision à l'issue d'une irradiation UVC fut de 37,2% contre 22,2% à l'état basal ( $p=0,0004$ ). Chez la lignée APP751, la capacité d'excision à l'issue d'une irradiation aux UVC fut de 31,9% contre 19,3% à l'état basal ( $p=0,0001$ ). Les capacités d'excision des lignées mock et APP751 irradiées aux UVC ne furent pas significativement différentes l'une de l'autre.



**Figure 42 : Capacité d'excision des photoproduits par des extraits cellulaires mock et APP751.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h, et traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 µM) ou irradiées aux UVC (5 J/m<sup>2</sup>). Des extraits protéiques sont alors réalisés pour évaluer leur capacité d'excision sur un substrat génomique endommagé aux UVC par le test de réparation basé sur le test des comètes. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n=3). (a) Aucune augmentation du potentiel d'excision n'est observée au sein de la lignée mock à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors qu'une induction de ce potentiel fut observé au sein de la lignée APP751. (b) L'augmentation du potentiel d'excision induit par une irradiation aux UVC est similaire chez les deux lignées. Le contrôle négatif (ctrl -) représente le tampon d'extraction seul. L'enzyme T4 constitue le contrôle positif.

\* valeurs significativement différentes du ctrl - (p=0,05), \*\* (p=0,005), \*\*\* (p=0,0005);

# valeurs significativement différentes de la lignée mock (p=0,05), ## (p=0,005), ### (p=0,0005);

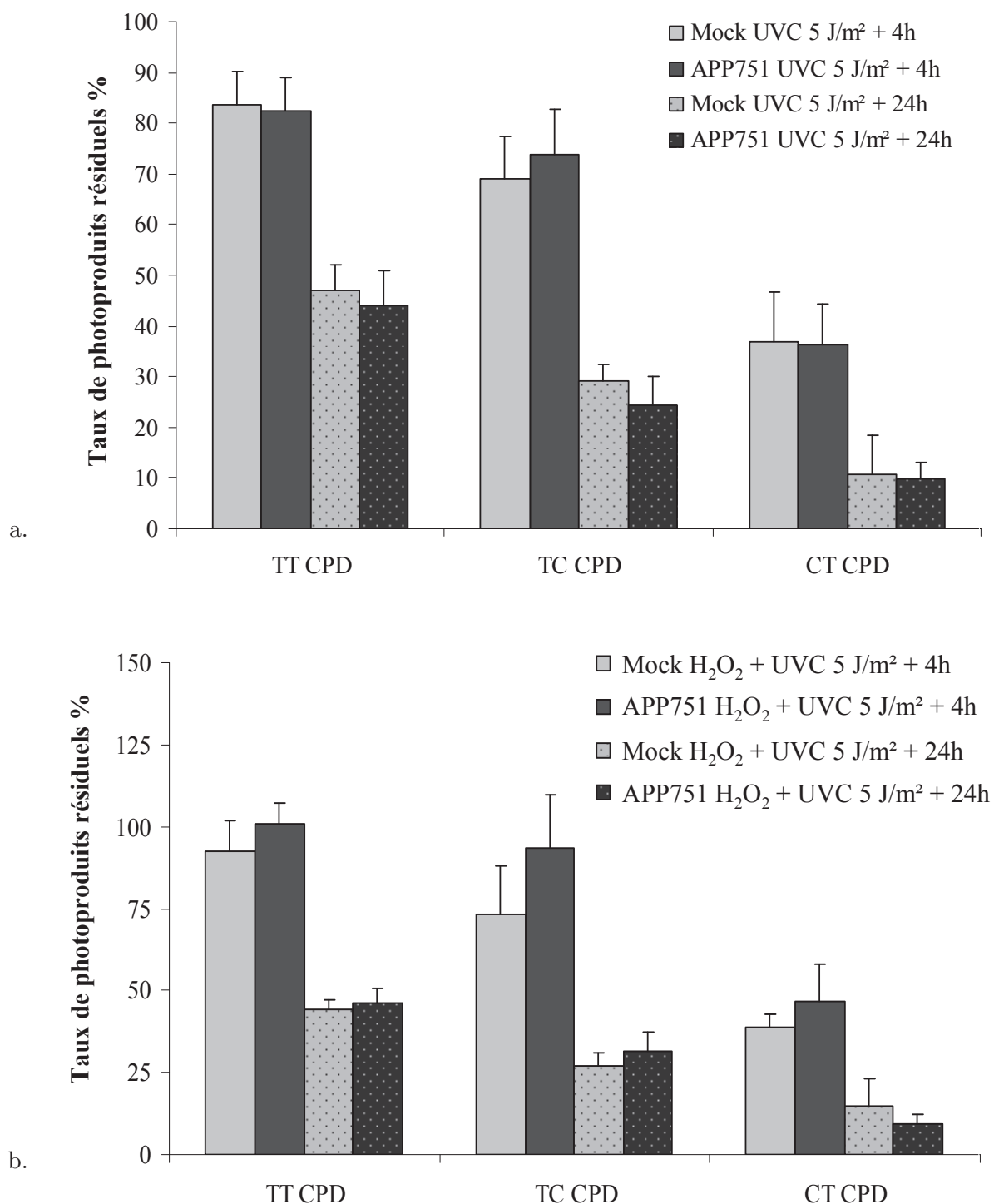
§ data valeurs significativement différentes de la lignée APP751 (p=0,05), §§ (p=0,005), §§§ (p=0,0005)

Test statistique utilisé : test de Student

## 5. Cinétique de réparation des photoproduits

Nous avons évalué par HPLC-MS/MS la cinétique de réparation des CPDs à l'issue d'une irradiation à 5 J/cm<sup>2</sup> d'UVC (figure 43.a). Quatre heures après l'irradiation, le pourcentage résiduel des photoproduits n'était pas significativement différent entre la lignée mock et la lignée APP751 : le taux de TT-CPD fut de 84% pour la lignée mock et 82% pour la lignée APP751, le pourcentage résiduel de TC-CPD fut de 69% pour la lignée mock et 74% pour la lignée APP751 et enfin, le taux restant de CT-CPD fut de 37% pour mock et 36% pour APP751. Vingt-quatre heures après l'irradiation aux UVC, le pourcentage résiduel de CPD fut également similaire entre les deux lignées. Pour mock et APP751 respectivement, le taux de TT-CPD fut de 47 et 44%, le taux TC-CPD fut de 29 et 24% et le taux de CT-CPD fut de 11 et 10%.

Nous avons ensuite évalué si une exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant l'irradiation aux UVC avait un effet sur la cinétique de réparation de CPDs (figure 43.b). Quatre heures après l'irradiation, le taux de CPDs résiduels n'était pas significativement différent entre les deux lignées cellulaires. Le taux de TT-CPD était de 93% pour mock contre 101% pour APP751, le taux de TC-CPD était de 73% pour mock et de 94% pour APP751 et le taux de CT-CPD était de 39% pour la lignée mock contre 47% pour la lignée APP751. Vingt-quatre heures après l'irradiation, le taux de photoproduits résiduels n'était pas non plus significativement différent entre les deux lignées. Le taux résiduel de TT-CPD était de 44% pour la lignée mock et 46% pour la lignée APP751, le taux de TC-CPD était de 27% pour mock et 31% pour APP751 et enfin le taux de CT-CPD était de 15% pour mock et 9% pour APP751.



**Figure 43 : Cinétique de réparation des photoproduits à l'issue d'une irradiation UVC, combinée ou non à une stimulation à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Les lignées mock et APP751 sont cultivées pendant 48h, puis directement exposées aux UVC (5 J/m<sup>2</sup>) (a) ou préalablement traitées par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 μM) pendant 24h (b). Les cellules sont récoltées soit immédiatement, soit 4h ou 24h après l'irradiation. L'ADN est alors extrait et hydrolysé pour détecter les nucléosides par HPLC-MS/MS et quantifier le taux de lésions (CPDs) par rapport aux nucléosides normaux. La présence d'Aβ n'induit pas de différence dans la cinétique de réparation des photoproduits après expositions aux UVC, entre les lignées mock et APP751 ayant été stimulées ou non par un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### C. Conclusion

L'analyse du statut NER chez la lignée APP751 a révélé la surexpression au niveau transcriptomique des facteurs XPC et DDB2 à l'issue d'un stress  $H_2O_2$ , alors qu'aucune modulation n'était observée chez la lignée mock. La capacité d'excision des photoproduits de la lignée APP751 fut également augmentée chez la lignée APP751 après un stress  $H_2O_2$ , et resta inchangée chez la lignée mock. A l'issue d'une irradiation par les UVC, les lignées mock et APP751 montrèrent une surexpression similaire des gènes XPC et DDB2. L'augmentation de la capacité d'excision des photoproduits à l'issue de l'irradiation fut également semblable entre les deux lignées. Ces dernières observations indiquent une réponse spécifique de la lignée APP751 par rapport à la lignée mock, à l'issue d'un stress  $H_2O_2$ . Cependant, à la suite d'une irradiation par les UVC les deux lignées répondirent de manière similaire. Nous avons donc voulu étudier si le fait de stimuler les lignées mock et APP751 par  $H_2O_2$  avant de les soumettre à une exposition aux UVC, pourrait constituer un avantage pour la lignée APP751, lui permettant d'avoir une cinétique de réparation des photoproduits plus rapide que celle de la lignée mock. Mais, l'analyse de la disparition des photoproduits indiqua une cinétique similaire entre les deux lignées, ayant été stimulées ou non au préalable par l' $H_2O_2$ . L'augmentation des capacités du NER par  $H_2O_2$  dans la lignée APP751 vue dans le test de réparation basé sur la technique des comètes ne se retrouve donc pas dans la cinétique de réparation *in cellulo*. Ceci pourrait s'expliquer par un effet des UVC sur le système NER plus important que celui d' $A\beta$ , ce dernier étant alors masqué.

Toutes ces observations suggèrent plusieurs hypothèses quant aux raisons de la participation du NER à l'issue d'un stress oxydant, spécifiquement en présence d' $A\beta$ . Cette stimulation du système de réparation par excellence des lésions volumineuses suggère qu'un type de lésion plus volumineuse pourrait se former en présence du peptide neurotoxique. D'autre part, XPC et DDB2 sont des protéines multifonctionnelles et pourraient être surexprimées en vue

d'accomplir d'autres processus biologiques que la réparation de l'ADN, comme par exemple l'apoptose. Ces hypothèses sont représentées dans la figure 44 et seront détaillées dans la partie discussion de ce manuscrit.

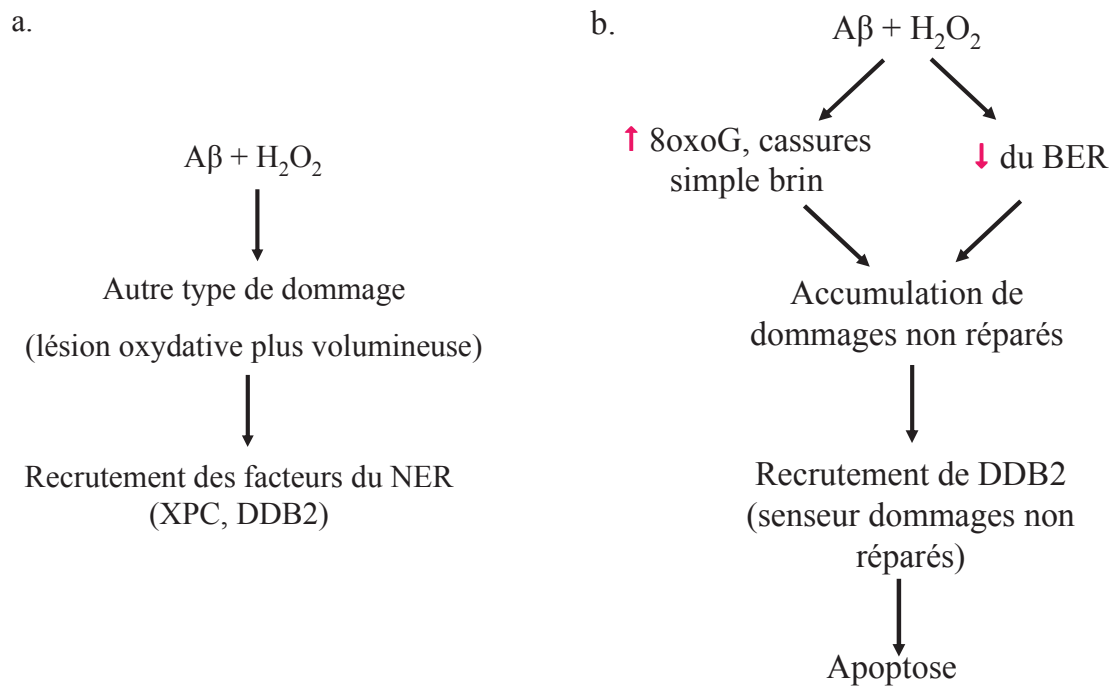


Figure 44 : Hypothèses concernant l'implication spécifique du NER dans la maladie d'Alzheimer.

## IV. Etat des autres systèmes de réparation en présence d'A $\beta$

### A. Introduction

Dans cette dernière partie, nous nous sommes intéressés à deux autres systèmes de réparation au niveau transcriptomique : la réparation des cassures double brin (NHEJ et HR) et le MMR. Les systèmes HR et NHEJ sont susceptibles d'être modulés à l'issue d'un stress oxydant, qui peut engendrer des cassures double brin, soit directement, soit par la réplication d'une cassure simple brin. Par ailleurs, de nombreuses maladies associées à un défaut génétique au niveau du NHEJ impliquent un phénotype de neurodégénérescence. Notre intérêt concernant le MMR s'appuie sur l'existence de défauts au niveau de certains de ses acteurs dans la maladie d'Huntington. Nous avons donc comparé l'expression des gènes du NHEJ et du MMR entre la lignée APP751 et la lignée mock à l'état basal, ainsi qu'à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour le NHEJ.

### B. Résultats

#### 1. Modulation des gènes de l'HR et du NHEJ (figure 45)

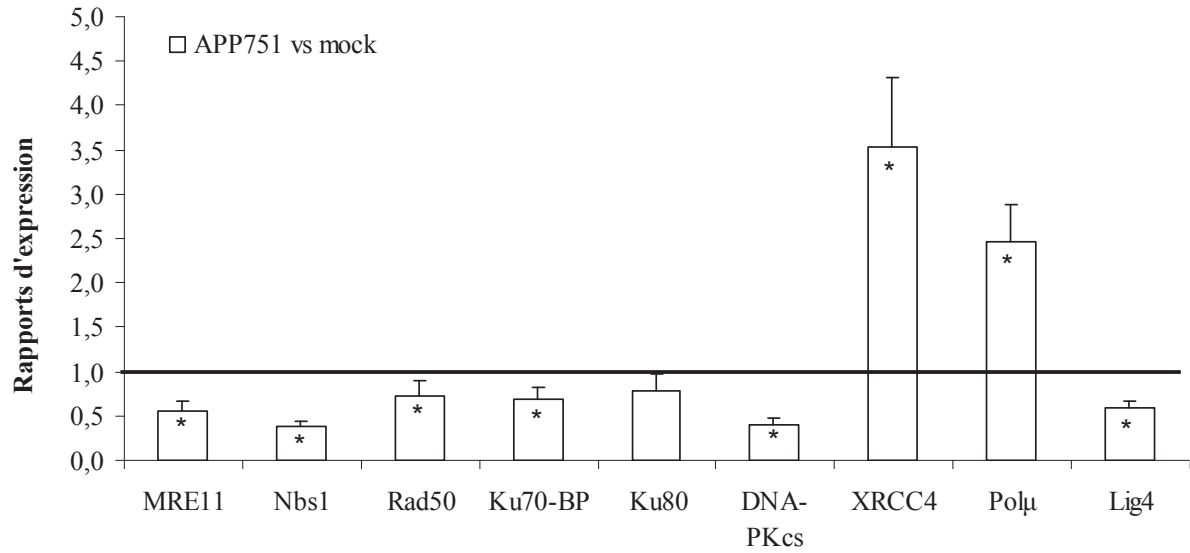
A l'état basal, les trois composantes du complexe MRN étaient sous-exprimées au sein de la lignée APP751 comparée à la lignée mock. MRE11 présentait un rapport d'expression de  $0,56 \pm 0,12$  ( $p=6.10^{-5}$ ), Nbs1 de  $0,37 \pm 0,07$  ( $p=4.10^{-5}$ ) et Rad50 de  $0,72 \pm 0,18$  ( $p=0,03$ ). L'expression des gènes Ku70-BP et DNA-PKcs (respectivement  $0,68 \pm 0,13$  ;  $p=0,07$  et  $0,41 \pm 0,07$  ;  $p=6.10^{-7}$ ) était également diminuée chez la lignée APP751 par rapport à la lignée mock. Les gènes XRCC4 ( $3,53 \pm 0,77$  ;  $p=0,03$ ) et pol $\mu$  ( $2,46 \pm 0,43$  ;  $p=0,002$ ) étaient au contraire sur-exprimés chez la lignée APP751. L'expression de Ku80 ne fut pas significativement modulée entre les deux lignées. Enfin, l'expression de la Lig4 était sous-régulée chez la lignée APP751 ( $0,60 \pm 0,08$  ;  $p=0,0005$ ).

A l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MRE11 était sous-exprimé chez les deux lignées ( $0,53 \pm 0,11$  ;  $p=0,0008$  pour mock et  $0,41 \pm 0,13$  ;  $p=0,0007$  pour APP751). Le même cas de figure fut

observé pour le gène Nbs1 ( $0,62 \pm 0,17$  ;  $p=0,008$  pour mock et  $0,44 \pm 0,13$  ;  $p=0,003$  pour APP751) ainsi que pour le gène Ku70-BP ( $0,64 \pm 0,24$  ;  $p=0,03$  pour mock et  $0,64 \pm 0,12$  ;  $p=0,004$  pour APP751). L'expression de DNA-PKcs fut significativement diminuée à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  au sein de la lignée mock uniquement ( $0,73 \pm 0,20$  ;  $p=0,04$ ) alors que l'expression du gène XRCC4 fut réduite dans la lignée APP751 seulement ( $0,72 \pm 0,17$  ;  $p=0,02$ ). La pol $\mu$  apparut surexprimée chez la lignée mock ( $2,92 \pm 0,39$  ;  $p=0,0005$ ) à l'issue d'un stress  $H_2O_2$  et cette réponse était significativement différente de celle de la lignée APP751 ( $p=0,002$ ). Enfin, les gènes Rad50, Ku80 et Lig4 ne furent modulés dans aucune des deux lignées à l'issue d'un stress  $H_2O_2$ .



a.



b.

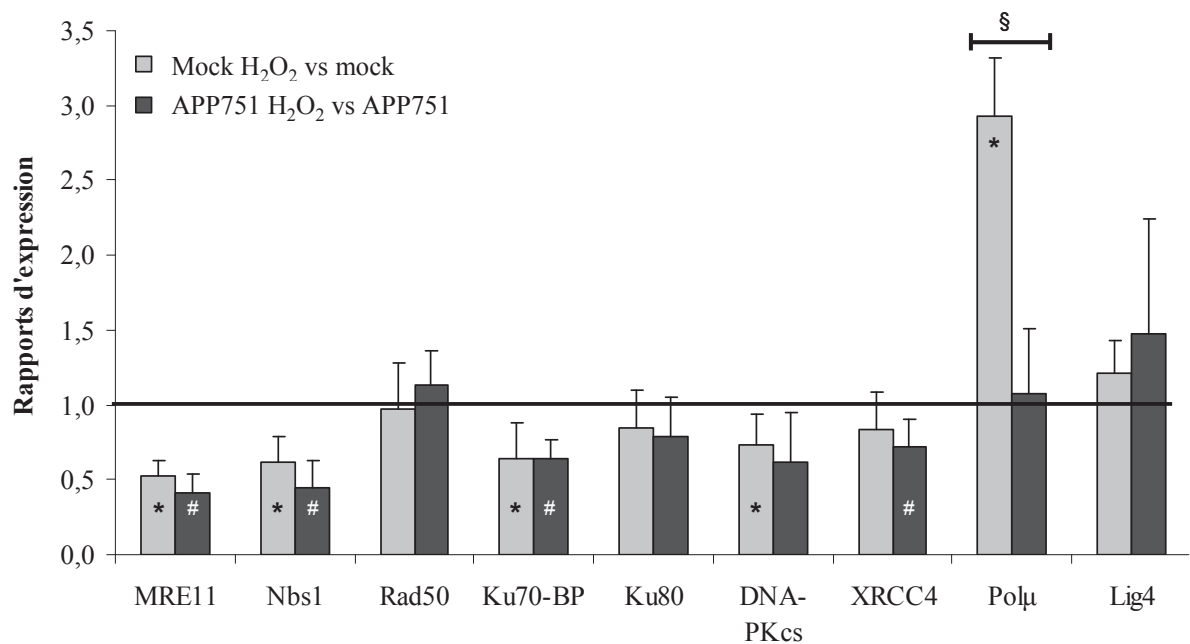


Figure 45 : Expression des gènes de l'HR et du NHEJ, à l'état basal ou à l'issue d'un stress oxydant.

## 2. Modulation des gènes du MMR (figure 46)

A l'état basal, les gènes *mlh1* et *mps1* étaient sous exprimés chez la lignée APP751 comparée à la lignée mock ( $0,84 \pm 0,10$  ;  $p=0,02$  et  $0,74 \pm 0,15$  ;  $p=0,02$  respectivement). Les gènes *msh6* et *msh3* ne furent pas modulés entre les deux lignées.

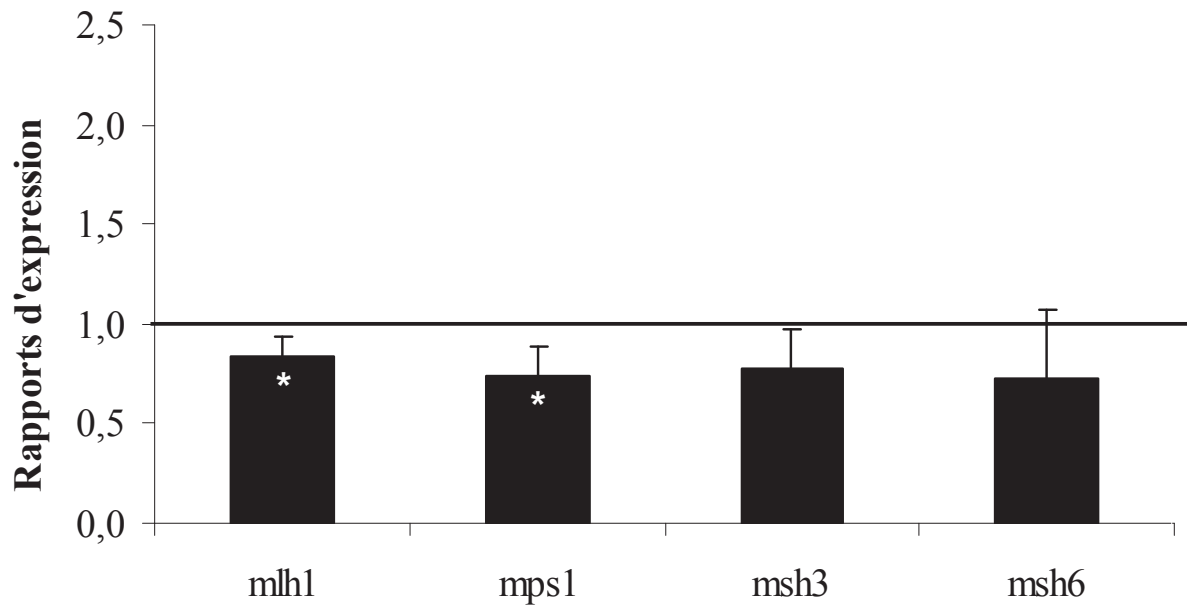


Figure 46 : Expression des gènes du MMR à l'état basal.

### C. Conclusion

La comparaison des gènes de réparation des l'HR et NHEJ à l'état basal dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock montre une diminution globale des premiers facteurs alors que les facteurs de terminaison (XRCC4, pol $\mu$ ) apparaissent sur-exprimés. Nos résultats concernant la kinase géante DNA-PKcs impliquée dans le NHEJ rejoignent ceux d'une étude traitant du niveau et de l'activité de cette protéine dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Shackelford 2006). Une autre étude relate également une baisse de l'expression protéique de DNA-PKcs, mais aussi une diminution de l'expression des facteurs Ku70 et Ku80 mais aussi leur activité de liaison à l'ADN (Davydov *et al.* 2003). Dans notre étude la proportion de Ku80 n'est pas modulée entre la lignée APP751 et la lignée mock, mais l'expression de la protéine de liaison à Ku70, Ku70-BP est diminuée en présence d'A $\beta$ . Enfin, Jacobsen (Jacobsen *et al.* 2004) observe une diminution du complexe MRN (MRE11, Rad50 et Nbs1) chez des patients atteints d'Alzheimer. Dans la lignée APP751, ce complexe est également sous-exprimé en présence d'A $\beta$ . La négligence de la réparation des cassures double brin, constitue une menace sévère pour la cellule, puisque ce type de dommages à l'ADN sont les plus enclins à déclencher l'apoptose (Shrivastav *et al.* 2008).

En ce qui concerne le MMR, la comparaison à l'état basal nous indique que les facteurs de reconnaissance des mésappariement (msh3 et msh6) ne sont pas modulés d'une lignée à l'autre alors que les facteurs intervenant en deuxième temps au sein du MMR sont sous-exprimés chez la lignée APP751 comparée à la lignée mock.



## Chapitre III : Discussion générale

La maladie d'Alzheimer est la forme de démence prépondérante chez le sujet âgé (Liu et al. 2001). Les symptômes de la maladie affectent sévèrement et progressivement la mémoire, la cognition et le comportement des individus qui en sont atteints (Papassotiropoulos *et al.* 2006; Fernandez *et al.*). Le cerveau des patients touchés par la maladie d'Alzheimer présente une taille réduite résultant d'une dégénérescence des synapses et d'une mort massive des neurones (Braak *et al.* 1991; Mattson 2004). Parmi les caractéristiques histopathologiques affectant ce type cellulaire unique, on note la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans l'environnement intraneuronal (Edelberg *et al.* 1996) et l'accumulation de plaque séniles dans l'environnement extraneuronal. Encore appelées plaques amyloïdes, les plaques séniles sont issues de l'agrégation du peptide neurotoxique A $\beta$ . Ce dernier est lui-même engendré par le processus protéolytique anormal de la protéine transmembranaire APP, séquentiellement clivée par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases (Dreses-Werringloer *et al.* 2008).

A $\beta$  est un peptide de 40 à 42 acides aminés, isolé et séquencé la première fois en 1984 (Glenner *et al.* 1984). A $\beta$  pourrait s'avérer plus toxique à l'état d'oligomère soluble qu'à l'issue de son agrégation (Lambert *et al.* 1998; Kaye *et al.* 2003). L'action neurotoxique du peptide A $\beta$  implique la perte d'homéostasie du calcium et la génération d'un stress oxydant. En effet, le taux de dommages oxydatifs aux macromolécules biologiques est particulièrement élevé dans les neurones situés à proximité des plaques amyloïdes, suggérant un rôle important du stress oxydant dans la toxicité neuronale induite par A $\beta$  (Butterfield *et al.* 2001). De nombreuses publications traitent notamment de l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN, considérée comme une caractéristique de la maladie d'Alzheimer, dans le cerveau mais aussi dans les tissus périphériques (Moreira *et al.* 2008). Bien qu'oxydativement endommagés, les neurones post-mitotiques ont une capacité limitée de réparation de leur ADN (Shackelford 2006).

La perte d'efficacité des systèmes de réparation associés aux dommages oxydatifs (purines oxydées, les cassures simple ou double brin) a été observée plusieurs fois chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ou dans des modèles qui lui sont associés (Davydov *et al.* 2003). Une perturbation des systèmes de réparation empêchant la cellule de lutter efficacement contre les attaques oxydatives et conduisant à l'accumulation des dommages dans l'ADN pourrait vraisemblablement engendrer la mort neuronale massive observée dans la maladie d'Alzheimer (Nospikel *et al.* 2003; Roos *et al.* 2006).

Un lien direct entre A $\beta$ , l'augmentation des dommages à l'ADN et la baisse des systèmes de réparation n'a cependant jamais été établi. Dans le but d'explorer cette possibilité, nous avons choisi d'utiliser dans notre étude un modèle simple, une lignée cellulaire génétiquement modifiée surexprimant l'isoforme à 751 acides aminés de l'APP (APP751), porteuse de la mutation « swedish » (APP<sub>670/671</sub>). Par une potentialisation de l'activité  $\beta$ -sécrétase, la double mutation faux-sens « swedish » conduit à la sécrétion accrue d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> et d'A $\beta$ <sub>1-40</sub> par la lignée (Hardy 1997). Cette sécrétion endogène constitue le plus gros avantage de notre modèle. Les quantités d'A $\beta$  libérées dans le milieu de culture de notre lignée APP751 sont de l'ordre du pg/mL, soit une concentration de l'ordre du pM, alors que certaines études appliquent jusqu'à 20  $\mu$ M d'A $\beta$  exogène. Si l'on se permet d'assimiler 1 mL de milieu de culture à 1 g de cerveau, la teneur en A $\beta$  de notre lignée cellulaire se rapproche des valeurs mesurées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, qui sont de l'ordre du pg/g (Lue *et al.* 1999). Les effets que nous observons au sein de notre étude sont donc visibles alors que nous travaillons à faible concentration d'A $\beta$ , ce qui montre l'extrême efficacité délétère de ce peptide. La sécrétion endogène et à niveau physiologique de notre modèle nous a permis d'appliquer un agent de stress additionnel, sous la forme de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou CuSO<sub>4</sub> à des doses peu cytotoxiques, reproduisant partiellement l'environnement subi par les neurones dans la maladie d'Alzheimer. Contrairement à ces derniers, notre lignée APP751 n'est pas déficiente en enzymes antioxydantes. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a donc été choisi pour accentuer le phénomène de stress oxydant au sein de notre modèle cellulaire, faisant pencher la balance qui définit un état

d'équilibre en faveur des ROS et au détriment des enzymes antioxydantes. Intimement liée au stress oxydant, une deuxième perturbation caractérise l'environnement délétère des neurones de patients atteints d'Alzheimer : la perte d'homéostasie des métaux. En fonctionnement physiologique, le cerveau régule strictement l'homéostasie des ions métalliques : ce processus normal joue un rôle important dans l'activité neuronale. Les ions métalliques (cuivre, zinc et fer notamment) sont essentiels pour les organismes vivants. Ils sont présents dans les cerveaux sains à des concentrations relativement élevées (Atwood *et al.* 1999) où ils participent à l'activité neuronale. Par exemple, la concentration en ZnII est de l'ordre de 150 à 300  $\mu\text{M}$ , celle de CuII peut atteindre 100  $\mu\text{M}$ , et le FeIII jusqu'à 500  $\mu\text{M}$ . Une dérégulation (défiance ou excès) entraîne des dysfonctionnements dans l'organisme. En effet, les ions métalliques CuII et FeIII sont généralement initiateurs de toxicité par leurs propriétés oxydo réductrices, via la production de ROS. De nombreuses maladies neurodégénératives sont d'ailleurs associées à des dérégulations de l'homéostasie des métaux (Doraiswamy *et al.* 2004). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, de nombreuses études ont montré que le métabolisme des ions métalliques est altéré. Les concentrations de cuivre, de zinc et de fer sont plus élevées que la normale, et plus particulièrement dans les lésions caractéristiques de la maladie (plaques amyloïdes) et à proximité de celles-ci (Lovell *et al.* 1998; Atwood *et al.* 1999). Dans notre étude, nous avons délaissé le Zinc de côté pour nous concentrer sur l'un des deux métaux participant à la génération d'un stress oxydant via la réaction de Fenton. Nous avons choisi d'utiliser le  $\text{CuSO}_4$  pour augmenter la teneur en ions métalliques plutôt que le fer qui nécessite l'application additionnelle d'un agent chélateur dans le milieu cellulaire.

Après avoir collecté des informations quant à la quantité sécrétée du peptide A $\beta$  et procédé à l'évaluation de la cytotoxicité engendrée par les agents de stress que nous utiliserons tout au long de notre étude ( $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{CuSO}_4$ ), nous avons évalué la quantité de ROS libérée par les cellules sécrétrices d'A $\beta$  (lignée APP751) et l'avons comparée à celle des cellules contrôle (lignée mock), en vue de poursuivre la vérification de la validité de notre modèle. Nous avons

pu montrer que le taux de ROS était toujours supérieur au sein de la lignée APP751 comparée à la lignée mock, à l'état basal ou à l'issue d'un stress, **apportant une preuve supplémentaire quant à la faculté du peptide A $\beta$  à générer ou amplifier un stress oxydant**. Nos observations s'ajoutent à celles de Behl, qui en 1994 (Behl *et al.* 1994) montre que l'utilisation de divers antioxydants protège efficacement les lignées cellulaires PC12 et B12 ainsi que des neurones corticaux de rats en culture contre la toxicité d'A $\beta$  et observe également que le traitement de ces cellules par A $\beta$  génère de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mattson indique qu'en présence d'oxygène et de métaux de transition comme le Fer ou le Cuivre, une entité radicalaire se forme à proximité de l'acide aminé en position 35 du peptide (Mattson 1997). Bush précise qu'A $\beta$  (ou la partie N-terminale de l'APP) réalise la réduction du Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> dans un cycle de réaction catalytique utilisant l'oxygène moléculaire et des agents de réduction biologiques comme substrats, pour générer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bush *et al.* 2003). Le peptide A $\beta$  constitue donc une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui favorisent en retour le clivage séquentiel de l'APP par les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases (Tamagno *et al.* 2008). Ainsi pris au piège dans ce cercle vicieux, les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer font face à un état pathologique perpétuel de stress oxydant.

Outre A $\beta$ , les sources de ROS sont considérables dans le cerveau. Ce dernier nécessite une forte consommation en oxygène, les neurones arborant un pouvoir glycolytique relativement bas (Markesbery 1997). La production d'énergie par ces cellules est donc quasi exclusivement dépendante de la phosphorylation oxydative, source de ROS par excellence (Shoffner 1997). Les métaux tels que le Fer ou le Cuivre participent à l'augmentation des ROS par leur interaction avec A $\beta$ , mais également au travers de la réaction de Fenton. Les effets délétères et toxiques du stress oxydant s'exercent à plusieurs niveaux et toutes les macromolécules biologiques sont concernées. Les protéines subissent des réactions de carbonylation et de nitration ainsi que des glycations et glycoxydations au niveau de leurs résidus lysine (Shackelford 2006). Les lipides formés d'acides gras insaturés, comme ceux présents dans les membranes cellulaires sont particulièrement sensibles au stress oxydant et subissent la



peroxydation lipidique (Davydov *et al.* 2003). De nombreux produits sont alors générés tels que des diènes conjugués, peroxydes, alcanes ou aldéhydes dont le plus connu est le 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Catala 2009). Cet aldéhyde relativement stable possède une forte réactivité avec les protéines et l'ADN. Il altère les fonctions de protéines comme les transporteurs membranaires, les récepteurs ou encore les canaux ioniques (Mattson 2004). Le 4-HNE forme par ailleurs un adduit volumineux au niveau de la molécule d'ADN. Les acides nucléiques sont également une cible privilégiée du stress oxydant induit entre autres par A $\beta$  (Wang *et al.* 2005). Les lésions induites par les ROS englobent les bases oxydées, parmi lesquelles la 8oxoG, les lésions oxydatives plus volumineuses, les sites abasiques et enfin les cassures simple ou double brin. Le taux de certains de ces dommages oxydatifs au niveau de l'ADN nucléaire de la lignée APP751 fut donc analysé. La technique des comètes dans sa forme classique nous a permis de mesurer la présence de cassures simple brin et de sites alkali-labiles, tels les sites abasiques. L'ajout de la fpg nous a permis d'obtenir des informations complémentaires quant au taux de purines oxydées. Dans la lignée APP751, à l'état basal, la proportion des cassures simple brin, sites alkali-labiles et purines oxydées était plus élevée que dans la lignée mock. A l'issue d'un stress, l'induction des dommages à l'ADN était également plus élevée au sein de la lignée APP751 qu'au sein de la lignée mock.

Non seulement la seule présence d'A $\beta$  induit une augmentation des dommages à l'ADN à l'état basal mais favorise leur induction à l'issue d'un stress métallique ou oxydant. Ces observations sont concordantes avec et pourraient s'expliquer par la plus grande proportion de ROS chez la lignée APP751 que chez la lignée mock. L'augmentation des dommages ne s'est pas limitée à l'ADN nucléaire. Dans notre étude nous avons également montré une plus grande fréquence de la délétion commune de l'ADN mitochondrial au sein de la lignée APP751, à l'état basal ou à l'issue d'un stress. La délétion commune représente un marqueur précoce de mitochondries en souffrance, partiellement en réponse à un stress oxydant (Peinnequin *et al.* 2011). Entouré par la chaîne de transports d'électrons, l'ADN mitochondrial s'avère spécialement sensible aux dommages oxydatifs. Une étude de Meccoci

(Mecocci *et al.* 1994) indique que le taux d'oxydation de l'ADN mitochondrial dans le cortex pariétal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer est trois fois supérieur à celui de sujets sains. Dans cette même étude, l'augmentation des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN nucléaire fut moindre, mais significative. Les conséquences des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial peuvent s'avérer dramatiques au niveau cellulaire. Dirigées contre les sous-unités protéines codées par le génome mitochondrial, elles conduisent à des déficiences dans la chaîne de transport d'électrons. Ceci a pour effet d'augmenter la quantité de ROS, de conduire à des déficits en terme d'énergie métabolique et de déclencher le relargage de facteurs comme l'AIF (apoptosis inducing factor) ou le cytochrome *c*, normalement séquestrés dans la membrane de la mitochondrie. Les dommages oxydatifs au niveau de l'ADN mitochondrial sont donc particulièrement redoutables, compte tenu de leur capacité à induire directement l'apoptose, à plus ou moins long terme (Wei *et al.* 2002).

Ayant observé les caractéristiques communes à notre modèle et à l'état pathologique des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer telles que l'augmentation des ROS et des dommages à l'ADN mitochondrial et nucléaire, nous avons ensuite voulu évaluer si la prise en charge de ces lésions était adéquate. Pour cela, nous avons analysé l'état du système de réparation associé aux bases oxydées, sites abasiques et cassures simple brin, le système BER. D'un point de vue transcriptomique, nous avons observé une sous-expression globale de la plupart de ses acteurs. La glycosylase OGG1 est apparue sous-exprimée non seulement à l'état basal chez la lignée APP751 par rapport à la lignée mock, mais également sous-réglée au sein de la lignée APP751 à l'issue d'un stress oxydant, démontrant une incapacité d'adaptation de cette lignée face à une attaque extérieure. La diminution d'OGG1 à l'état basal chez la lignée APP751 a pu être confirmée en termes d'expression de protéines mais aussi d'activité. Deux tests distincts ont été utilisés pour mesurer la capacité d'excision de la 8oxoG : le test des comètes modifié nous a permis d'observer une diminution de l'activité d'excision de la 8oxoG dans un substrat génomique par la lignée APP751 à l'état basal et plus encore après traitement par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le test fonctionnel sur biopuce nous a

permis de confirmer l'inhibition du potentiel d'excision de la 8oxoG dans un substrat oligonucléotidique à l'issue d'un stress oxydant ou métallique. Des défauts d'activités d'OGG1 sont décrits couramment dans la littérature. D'un point de vue génétique, lors d'une étude axée sur la recherche de mutations au sein du gène codant pour OGG1, mettant en jeu 14 patients atteints d'Alzheimer et 10 contrôles sains du même âge, Mao (Mao *et al.* 2007) n'a pu mettre en évidence aucune mutation au sein de la population contrôle, alors que 28,6% des patients Alzheimer (soit 4 patients) présentaient des altérations dans la séquence d'OGG1. Deux types de mutations ont été décelés : une délétion commune à deux patients modifiant la séquence carboxy-terminale de la protéine et les deux autres mutations conduisant à la substitution d'un acide aminé. Des tests d'activité ont été réalisés à partir d'extraits protéiques correspondant aux patients examinés. De manière intéressante, l'une des mutations mises en évidence dans la séquence du gène codant pour OGG1 chez des patients atteints d'Alzheimer, a été associée à une capacité d'excision de la 8oxoG totalement annihilée. Cette mutation consiste en la délétion d'une cytosine en position 796 du gène codant pour OGG1 et modifie considérablement la partie C-terminale de la protéine à compter de l'acide aminé en position 261. De nombreuses cystéines absentes de la protéine sauvage et un fragment de 59 acides aminés supplémentaires sont incorporés. Or, une étude de Bravard *et al.* (Bravard *et al.* 2009) indique qu'un SNP (single nucleotide polymorphism) en position 1245 du gène codant pour OGG1 conduit à la substitution d'une sérine par une cystéine en position 326 de la séquence d'acides aminés correspondante. L'activité de la protéine ainsi exprimée s'avère plus sensible à l'inactivation par des espèces oxydantes. La mutation décelée par Mao au niveau d'OGG1 chez des sujets atteints d'Alzheimer modifie la séquence de la protéine en conduisant à l'incorporation de nombreuses cystéines. L'oxydation de ces dernières, facilitée par le taux élevés de ROS qui sévissent dans la maladie d'Alzheimer, pourrait alors expliquer le phénomène de baisse d'activité d'OGG1.

Une autre étude (Weissman *et al.* 2007) mettant en jeu 10 contrôles sains et 10 patients atteints d'Alzheimer, supporte l'idée d'une diminution de la capacité d'excision de la 8oxoG

dans la maladie. Les auteurs précisent que la baisse d'activité d'OGG1 est retrouvée à la fois dans les zones « plus affectées par l'Alzheimer », c'est-à-dire présentant des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires comme le lobe pariétal, mais aussi dans les zones « moins affectées » comme le cervelet. Ces observations suggèrent que la diminution de l'activité d'OGG1 est une caractéristique générale de la maladie d'Alzheimer qui n'aurait pas d'effet dans les zones dépourvues en plaques séniles et enchevêtrements neurofibrillaires (cervelet), mais sensibiliserait les neurones aux effets délétères d'A $\beta$  et Tau dans les zones affectées (lobe pariétal) les entraînant potentiellement vers un processus d'apoptose. Des précisions quant à l'apparition chronologique de la diminution d'activité d'OGG1 ont été apportées par (Shao *et al.* 2008). Dans leur étude, ils ont comparé l'activité d'excision par des extraits protéiques issus des lobes frontaux de sujets sains, atteints de troubles cognitifs modérés ou d'Alzheimer. Ils ont observé une réduction de l'activité d'OGG1 dans les lobes frontaux, pariétaux et temporaux des patients atteints d'Alzheimer par rapport aux sujets sains. Ayant obtenu des résultats semblables pour les patients atteints de troubles cognitifs modérés, ils concluent que les changements au niveau du BER pourraient être un processus très précoce dans la maladie d'Alzheimer. Des défauts au niveau d'OGG1 sont susceptibles d'engendrer la persistance de 8oxoG dans l'ADN, et de conduire à son mésappariement avec une Adénine lors de la réplication. La glycosylase MYH est spécifiquement dédiée à l'élimination d'une Adénine mal appariée en face d'une 8oxoG (David *et al.* 2007). Dans notre étude, nous avons montré que cette dernière était également sous-régulée dans la lignée APP751 par rapport à la lignée mock. Cette dernière était également capable de surexprimer MYH à l'issue d'un stress métallique ou oxydant, alors que la lignée sécrétrice d'A $\beta$  ne modulait pas l'expression de la glycosylase. Il n'existe pas de données dans la littérature concernant un lien entre MYH et la maladie d'Alzheimer. L'implication de cette glycosylase ne semble pas forcément pertinente dans des cellules post-mitotiques, puisque MYH intervient dans l'élimination d'un mésappariement généré à l'issue de la réplication de l'ADN. Toutefois, une étude récente a révélé un autre rôle pour cette protéine : elle participerait à

l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire à l'issue d'un dommage à l'ADN (Hahm *et al.*). Du fait de cette fonction, toute modulation anormale de MYH (inhibition comme observé dans notre étude mais aussi surexpression) pourrait avoir un effet délétère sur le caractère post-mitotique des neurones, qui comme nous l'avons vu nécessitent une régulation permanente et finement contrôlée afin d'éviter une ré-entrée abusive et dangereuse dans le cycle cellulaire (Herrup *et al.* 2007a).

La glycosylase chargée de l'excision de l'uracile dans l'ADN est également apparue sous exprimée chez la lignée APP751 par rapport à la lignée mock. L'analyse des capacités d'excision de l'uracile sur biopuce nous a permis d'établir qu'il existait une induction de ce potentiel au sein de la lignée mock et au contraire une inhibition au sein de la lignée APP751, à l'issue d'un stress oxydant ou métallique. Ce phénomène de baisse d'activité de l'UNG a été retrouvé dans l'étude de Weissman (Weissman *et al.* 2007) comparant la capacité d'excision d'extraits protéiques issus du cerveau de patients atteints d'Alzheimer comparés à des sujets sains. De manière intéressante, (Kruman *et al.* 2004a) ont montré que la déplétion d'UNG dans des neurones hippocampaux de rats en culture déclenchait l'apoptose, soulignant la toxicité de l'accumulation d'uracile dans l'ADN.

L'expression du gène codant pour l'APE1 est également apparue réduite dans notre étude, chez la lignée APP751 comparée à la lignée mock. Il semblerait que la réduction de l'expression d'APE1 par siRNA influe négativement sur la viabilité cellulaire de neurones en culture à l'issue d'un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vasko *et al.* 2005). Cependant, d'autres études ont montré une augmentation de l'incision des sites abasiques (Tan *et al.* 1998; Davydov *et al.* 2003) ou au contraire, aucune modulation de cette capacité entre des échantillons protéiques issus de patients atteints d'Alzheimer et de contrôles sains (Weissman *et al.* 2007). Le cas d'APE1 est quelque peu particulier, car outre sa participation à la réponse cellulaire face à un stress oxydant, par ses fonctions d'acteur de la réparation de l'ADN, elle participe également à la régulation du statut redox de certains facteurs de transcription comme NFkappaB et p53 (Jayaraman *et al.* 1997), influant alors sur des processus cellulaires clé comme l'expression

génique, la prolifération ou la mort cellulaire (Bhakat *et al.* 2009). La détermination du rôle exact d'APE1 dans la mort neuronale associée à la maladie d'Alzheimer, parmi des participants avérés tels que le stress oxydant généré par A $\beta$ , les processus de réparation de l'ADN altérés et l'activation de facteurs de transcription comme p53, n'est pas encore clairement établie. Afin de déterminer la relation potentielle entre l'expression d'APE1, l'accumulation d'A $\beta$  et la neurodégénérescence qui survient dans la maladie d'Alzheimer, (Tan *et al.* 2009) ont analysé les effets de concentrations croissantes d'A $\beta$  et d'un stress oxydant sur l'expression d'APE1 et du taux de survie neuronale. En utilisant une forte concentration d'A $\beta$  1-42 (5  $\mu$ M) ils ont observé une diminution de l'expression d'APE1, et au contraire une surexpression avec une concentration plus faible (1  $\mu$ M). L'induction d'APE1 apparaît selon eux neuroprotectrice, et son inhibition conduirait vraisemblablement à la mort neuronale.

Dans notre travail, la pol $\beta$  apparut également sous-exprimée au niveau transcriptomique chez la lignée APP751 par rapport à la lignée mock. Dans l'étude de (Weissman *et al.* 2007) les extraits protéiques issus de patients atteints d'Alzheimer présentaient également une activité réduite au niveau de l'étape de « gap-filling », normalement assurée par la pol $\beta$ .

Au niveau des acteurs du BER plus impliqués dans la réparation des cassures simple brin comme PARP1, XRCC1 et APTX une diminution de l'expression génique a également été observée au sein de la lignée APP751. De manière intéressante, (Boerrigter *et al.* 1991) ont rapporté une diminution de la réparation des cassures simple brin chez 15 patients atteints d'une forme familiale d'Alzheimer par rapports aux individus sains du même âge. Il est également important de noter qu'une version mutée de l'APTX est à l'origine de la maladie neurodégénérative Ataxia with Oculomotor Apraxia 1 (AOA1) (Rass *et al.* 2008), indiquant qu'une déficience en APTX joue un rôle important dans un phénomène de neurodégénérescence.

Cette diminution globale du BER dans la lignée APP751, à l'état basal et plus encore à l'issue d'une exposition au CuSO<sub>4</sub> ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est d'autant plus inquiétante qu'à l'inverse,

l'induction des dommages à l'ADN augmente au sein de la lignée à l'issue d'un stress métallique ou oxydant en présence d'A $\beta$ . La sécrétion de ce dernier par la lignée APP751 entraîne une perturbation sévère sur le système BER, du niveau transcriptomique jusqu'au niveau de l'activité protéique potentialisant ainsi les effets délétères de l'augmentation massive du taux de dommages à l'ADN.

Il apparaît donc que la sécrétion d'A $\beta$  dans notre modèle reproduit une grande partie des observations cliniques concernant la réparation de l'ADN dans la maladie d'Alzheimer. Ce peptide neurotoxique joue donc un rôle central. Le mécanisme par lequel la sécrétion d'A $\beta$  par la lignée APP751 conduit à la dérégulation du système BER reste à définir. Une sous-expression si généralisée suggère cependant l'idée d'une déficience au niveau de la signalisation de cette voie de réparation. La libération du peptide A $\beta$  dans le milieu extracellulaire n'est pas la seule résultante du clivage de l'APP et certains de ses sous-produits pourraient avoir des conséquences signalétiques et délétères au niveau de la cellule. En effet, une première étape de clivage de l'APP par la sécrétase BACE entraîne la sécrétion d'une entité sAPP $\beta$  en N-terminal de l'APP, la réduisant ainsi en un peptide 99 acides aminés (C99) localisé dans la membrane plasmique. Le clivage subséquent en N-terminal du peptide C99 par la  $\gamma$ -sécrétase conduit à la libération d'A $\beta$  dans le milieu extracellulaire. En C-terminal du peptide C99, deux sous-produits sont amenés à se former à l'issue du clivage par la  $\gamma$ -sécrétase. Si aucun clivage additionnel n'est mis en jeu, on assiste à la libération du domaine intracellulaire de l'APP (AICD) (Leissring *et al.* 2002). Une caspase peut également intervenir et cliver la partie C-terminal du peptide C99, conduisant à la génération d'un peptide de 31 acides aminés (C31) (Lu *et al.* 2000). L'AICD et le peptide neurotoxique C31 ont des vertus signalétiques. L'AICD régulerait une voie de signalisation calcique, médiée par le phospho-inositide et le peptide C31 serait susceptible d'induire l'apoptose. Avant de subir le clivage par une  $\gamma$ -sécrétase alors qu'il est toujours localisé dans la membrane plasmique, le peptide C99 peut également être internalisé, son clivage par la  $\gamma$ -sécrétase et la génération d'A $\beta$  se produisant à l'intérieur de la cellule (Mattson 2004). Il n'existe cependant aucune

donnée sur la faculté de ces sous-espèces de l'APP à influencer de manière quelconque sur le système BER.

Les voies de régulation de ce système de réparation sont d'ailleurs peu connues. On sait que des modifications post-traductionnelles ont lieu afin d'orienter l'activité des enzymes. Ces modifications influent au niveau de la fixation, du turn-over ou de la localisation sub-cellulaire des enzymes en question (Almeida *et al.* 2007). Les modifications post-traductionnelles font partie des nombreuses fonctions du reticulum endoplasmique, avec le repliement et l'assemblage de protéines néo-synthétisées (Rao *et al.* 2004). Le peptide A $\beta$  est connu pour engendrer un stress au niveau du réticulum endoplasmique et altérer sensiblement ses fonctions comme en témoigne le nombre de protéines mal repliées qui s'accumulent dans le cytosol des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Il est plausible que le stress occasionné par A $\beta$  au niveau du reticulum endoplasmique puisse influencer sur les modifications post-traductionnelles destinées aux enzymes de réparation et engendrer la baisse d'activité que nous rapportons dans notre étude. Une autre fonction clé du reticulum endoplasmique est la séquestration de la réserve de calcium intracellulaire, fonction victime de la toxicité du peptide A $\beta$ . Ce dernier perturbe doublement l'homéostasie calcique puisqu'il occasionne également une entrée massive de calcium extracellulaire dans le cytoplasme (Hynd *et al.* 2004). La perte de l'homéostasie du calcium entraîne l'activation de la calpaïne, enzyme protéolytique, dont la capacité à dégrader OGG1 à l'issue d'un stress oxydant a été révélée (Hill *et al.* 2008). D'autre part, Shao a montré en 2008 que le sous-produit toxique de la peroxydation lipidique 4-HNE était responsable d'une inactivation de la capacité d'excision d'OGG1 chez des patients atteints d'Alzheimer (Shao *et al.* 2008). En utilisant une technique de retard de PCR, Tao a par ailleurs pu corrélérer en 2004 la baisse d'expression de certains gènes dans le cerveau vieillissant avec le niveau élevé de dommages oxydatifs au niveau de leurs promoteurs (Lu *et al.* 2004).

A l'issue de ce travail, nous ne sommes pas en mesure de préciser le mécanisme par lequel la sécrétion d'A $\beta$  perturbe le système BER. **Néanmoins, nous avons établi pour la**



**première fois un lien entre ces deux phénomènes.** Bien qu'elles n'aient jamais été associées à la présence d'A $\beta$ , les déficiences du BER sont retrouvées dans de nombreuses études, traitant des capacités d'excision d'échantillons protéiques issus de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Certaines s'accordent à dire que la diminution du BER serait un phénomène précoce dans la mise en place de la maladie. Le paradigme actuel énonce que les dommages non réparés s'accumuleraient dans les neurones, jusqu'à déclencher une ré-entrée dans le cycle cellulaire et une apoptose subséquente (Herrup *et al.* 2004). Pour analyser l'hypothèse que l'activation du cycle cellulaire est une composante à part entière de la réponse aux dommages à l'ADN, Kruman a établi que le traitement de neurones post-mitotiques par des agents génotoxiques induisait une ré-entrée dans le cycle cellulaire suivie d'une apoptose alors que l'exposition à des agents non génotoxiques n'activait pas le cycle cellulaire (Kruman *et al.* 2004b). En 2009, Tian a montré que le traitement de neurones post-mitotiques par un agent générant un stress oxydant engendrait la phosphorylation de la protéine senseur des cassures double brin ATM par la cycline kinase-dépendante Cdk5. Cette phosphorylation d'ATM par Cdk5 conduisit à l'activation des protéines du cycle cellulaire Cdk2 et Cdk6 et finalement à l'apoptose (Tian *et al.* 2009). A notre niveau, nous avons confirmé qu'A $\beta$  générait des ROS, à l'état basal dans la lignée APP751 et potentialisait cette génération en présence de CuSO<sub>4</sub> ou d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et que le taux de dommages oxydatifs à l'ADN augmentait de manière concordante. Nous avons établi qu'en retour, une baisse du système BER se produisait chez la lignée sécrétrice d'A $\beta$  et que les capacités de réparation de cette lignée étaient encore plus éteintes à l'issue d'un stress métallique ou oxydant additionnel. Ces observations suggèrent une évolution vers un phénomène d'accumulation des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN de la lignée APP751. Cette lignée, bien que porteuse d'un phénotype sauvage pour la protéine p53 (Goldschneider *et al.* 2004), reste une modèle cancéreux, en division continue, et nous montre ici ses limites : il ne nous permettra donc pas de conduire de plus amples études quant à la ré-activation du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose en réponse à l'accumulation de dommages à l'ADN.

Néanmoins, pour tenter d'étendre la compréhension du modèle cellulaire utilisé, nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des gènes d'un autre système de réparation de l'ADN, le système NER. En effet, les deux systèmes de réparation dits d'excision/resynthèse que sont le BER et le NER ont longtemps été appréhendés comme deux mécanismes distincts et cloisonnés. Il est pourtant de plus en plus évident que cette compartimentation n'est pas aussi rigoureuse qu'on le pensait. Certains dommages oxydatifs normalement connus pour être pris en charge par le BER, se révèlent en définitive dépendants des protéines XP de la GG-NER. *In vitro*, des oligonucléotides porteurs de 8oxoG ou diols de thymine subissent une incision par un système NER reconstitué à partir des protéines purifiées XPC/hHR23, XPA, RPA, TFIIH, XPG et XPF/ERCC1 (Reardon *et al.* 1997). Selon Yang (Yang 2006), les interactions entre le BER et le NER ne correspondent pas à une compétition, mais plutôt à une action complémentaire et coopérative. Il a été montré qu'XPC stimulait l'activité de la glycosylase impliquée dans la reconnaissance des mésappariements G:T (Shimizu *et al.* 2003). La glycosylase OGG1 est également stimulée par XPC/hHR23B (D'Errico *et al.* 2006) (Bernardes de Jesus *et al.* 2008). Il s'avère également que les dommages induits par un stress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont moins bien réparés par des cellules déficientes en XPA que par des cellules normales (Low *et al.* 2008). Les protéines de la TC-NER sont également impliquées dans la réparation des lésions engendrées par un stress oxydant. S'il existe une voie NER couplée à la transcription, ce n'est pas le cas pour la voie BER, les lésions dont elle se charge ne bloquant que très peu l'avancement des ARN polymérases. Pourtant, il s'avère que les cellules issues de patients CS exhibent une très forte sensibilité face à un stress oxydant (Dianov *et al.* 1998; de Waard *et al.* 2004; D'Errico *et al.* 2007), suggérant une incapacité des cellules déficientes en CSA ou CSB à réparer les dommages oxydatifs ou certains d'entre eux et donc leur importance dans ce processus.

L'intervention des facteurs NER dans la réparation des dommages oxydatifs constitue une hypothèse qui permettrait d'expliquer les phénomènes de neurodégénérescence retrouvés chez certains patients XP et chez tous les patients CS (Balajee *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 2005).

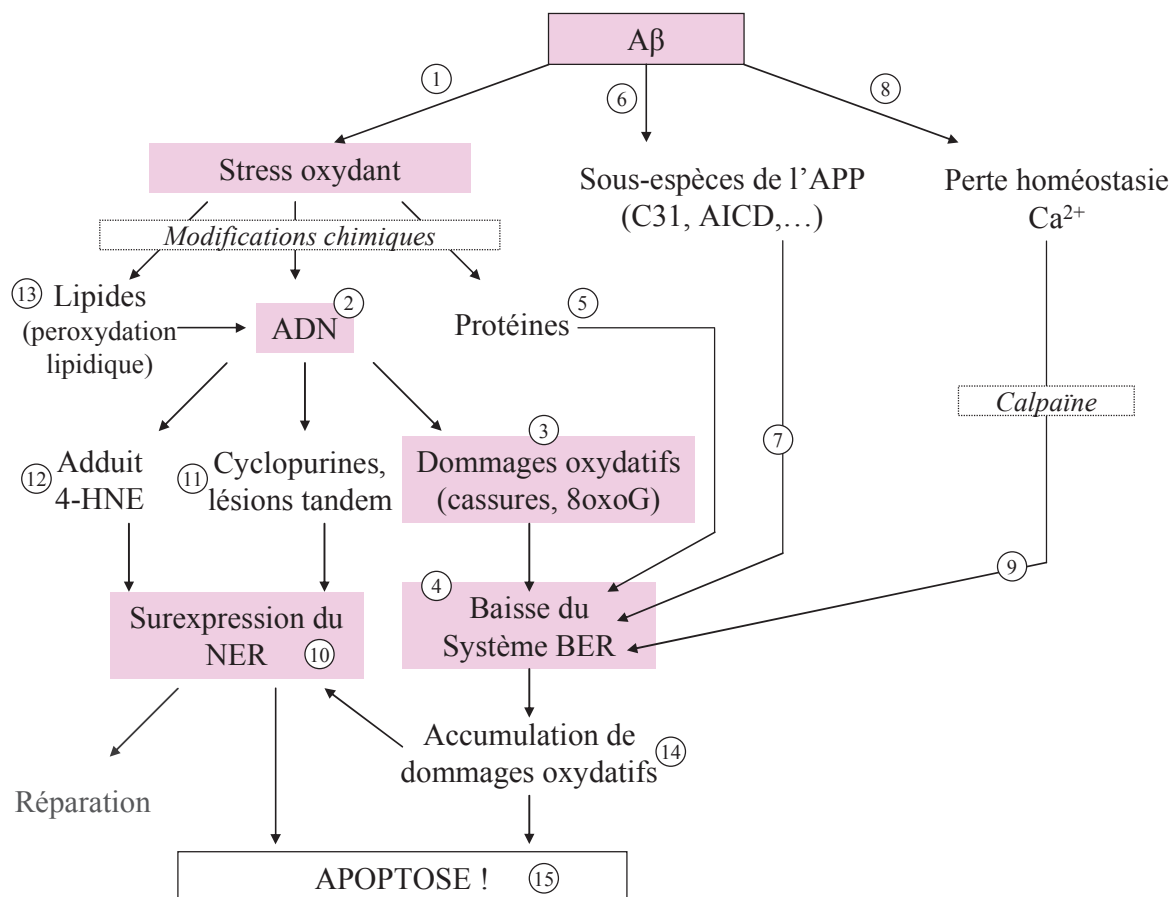
Une dérégulation des facteurs du NER pourrait par extension être impliquée dans la maladie d'Alzheimer et nous avons donc cherché à analyser l'état du NER dans notre modèle cellulaire. Nous avons commencé par comparer l'expression des gènes du NER à l'état basal entre la lignée APP751 et la lignée contrôle mock. Nous n'avons pas observé de sous-expression globale comme cela était le cas pour le BER. Cependant, contrairement aux données de la littérature qui énonçaient une augmentation de l'expression protéique des deux hélicases sous-unitaires du complexe TFIIH chez des patients atteints d'Alzheimer (Hermon *et al.* 1998), nous avons observé la sous-expression d'XPD et XPB dans la lignée APP751 au niveau transcriptomique. Cette différence pourrait s'expliquer par le temps d'exposition à A $\beta$  appliqués aux différents modèles pris en compte. L'étude d'Hermon met en jeu des échantillons *post-mortem* de patients, décédés de la maladie d'Alzheimer, dont les neurones ont subi l'environnement délétère d'A $\beta$  depuis plusieurs années alors que notre modèle n'a été exposé à la sécrétion du peptide que pendant 48h. Comme de nombreuses publications le suggèrent, la négligence des systèmes de réparation vis-à-vis d'un dommage serait un évènement précoce (Nospikel *et al.* 2003). Au-delà d'un certain seuil de dommage, la cellule tente peut-être un sauvetage de dernière minute, en vain, car il est beaucoup trop tard. D'un autre côté, outre leur implication dans la voie NER, il s'avère qu'XPD et XPB participent à l'apoptose médiée par p53 (Wang *et al.* 1996). La surexpression protéique de ces deux hélicases, observée dans les échantillons issus de patients atteints d'Alzheimer par Hermon, correspondrait donc plus vraisemblablement à la mise en place d'une voie apoptotique qu'à une tentative tardive de réparation des lésions accumulées au cours de la vie de l'individu. Dans la lignée APP751, nous avons également observé la sous-expression du facteur CSA à l'état basal. Nous avons vu plus haut qu'une déficience en CSA ou CSB augmentait la sensibilité des cellules à un stress oxydant. Les sous-expressions combinées de la glycosylase OGG1 et du facteur CSA affectent donc profondément la capacité de la lignée APP751 à lutter contre l'accumulation des dommages oxydatifs, qui sont en augmentation en son sein.

De manière surprenante, nous avons constaté qu'à l'issue d'un stress oxydant, la lignée APP751 surexprimait certains gènes du NER, comme XPC et DDB2, alors que leur expression n'était pas modulée entre l'état basal et l'état traité au sein de la lignée mock. Le test des comètes modifié a permis de valider une augmentation de l'excision de lésions caractéristiques du NER (photoproduits) par la lignée APP751 à la suite d'un stress oxydant. Cette dernière observation suggère qu'un stress oxydant augmenterait les capacités du NER via l'expression d'XPC et de DDB2. Si nous avons déjà évoqué la participation de certains facteurs du NER à la réparation de lésions oxydatives normalement réparées par le BER, il est également possible que la stimulation du NER que nous constatons soit due à la formation d'un autre type de lésions oxydatives, plus volumineuses. Pour expliquer le phénomène de neurodégénérescence observés chez les patients XP et CS, Robbins a émis l'hypothèse qu'une lésion volumineuse hypothétique se formait au niveau des neurones, spécialement sensibles au stress oxydant. En absence de NER, ces lésions hypothétiques s'accumuleraient dans les neurones et les entraîneraient peu à peu vers l'apoptose (Robbins *et al.* 1983). Les cyclopurines et les lésions tandems sont aujourd'hui des candidates pressenties au titre de lésions hypothétiques, les dernières n'étant de surcroît que faiblement réparées par le système BER (Bergeron *et al.* 2010). Un autre type de lésion volumineuse pourrait également se former et stimuler le NER. Nous avons vu que l'action neurotoxique d'A $\beta$  via un stress oxydant engendrait l'oxydation de l'ADN, mais aussi des lipides. Or, le sous-produit de la peroxydation lipidique, l'aldéhyde 4-HNE, a la capacité de se lier à l'ADN pour générer un adduit volumineux, dont la réparation impliquerait vraisemblablement la voie NER.

Une dernière hypothèse est cependant à prendre en considération et se base sur la **pluralité des rôles joués par XPC et DDB2 au sein de la cellule**. S'ils sont partie intégrante de la voie NER, ils participent au même titre que XPD et XPB au processus d'apoptose. Leur surexpression dans la lignée APP751 à l'issue d'un stress oxydant pourrait donc **correspondre à la mise en place de la voie apoptotique plutôt qu'à un processus de réparation**. Dans cette optique visant à démontrer que la machinerie de reconnaissance

du NER était non seulement requise pour la détection des dommages mais aussi pour l'activation de la cascade de signalisation en aval, conduisant à l'apoptose, Stergiou a analysé l'effet d'une mutation non caractérisée au niveau d'XPC chez *C. elegans* et a pu montrer que la capacité à déclencher l'apoptose était réduite à l'issue d'un stress génotoxique chez cet organisme muté (Stergiou *et al.* 2011). DDB2 a également été associé à un processus d'apoptose dans de nombreuses études (Bagchi *et al.* 2010). Stoyanova (Stoyanova *et al.* 2009) a montré que l'activité de DDB2 était requise pour la mise en place de l'apoptose à l'issue d'un stress génotoxique au cisplatine, connu pour générer des ROS (Santos *et al.* 2007). Une autre étude a montré que la surexpression de DDB2 au sein d'une lignée cancéreuse lui octroyait une sensibilité exacerbée au cisplatine, en augmentant le phénomène d'apoptose (Barakat *et al.* 2010). Cependant, rien ne nous permet de conclure véritablement sur la surexpression de DDB2 et XPC dans la lignée APP751, en présence d'A $\beta$  et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quant à son rôle dans la réparation de l'ADN ou dans l'induction de l'apoptose. Confronté à des résultats semblables aux nôtres (observation d'une diminution de l'activité d'OGG1 et surexpression des hélicases du NER) dans une étude menée sur des échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, Lovell émet l'hypothèse que l'activité des hélicases interférerait avec les facteurs du BER, mais ne précise pas non plus le mécanisme sous-jacent (Lovell *et al.* 2000).

En combinant toutes ces observations, nous sommes néanmoins en mesure d'élaborer un scénario catastrophe pour le rôle d'A $\beta$ , représenté en figure 47.



**Figure 47 : Modèle proposé pour le rôle d'A $\beta$  dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, impliquant les systèmes de réparation de l'ADN.**

Les éléments surlignés en rose ont été apportés ou confirmés par notre étude. Le peptide A $\beta$  génère un stress oxydant (1) susceptible d'endommager toutes les macromolécules biologiques, parmi lesquelles l'ADN (2). On note en conséquence une augmentation des lésions oxydatives parmi lesquelles les cassures simple brin et la 8oxoG (3). Cependant, le système de réparation associé à ce type de lésions (BER) présente une capacité réduite (4). Cette baisse d'activité peut s'expliquer par plusieurs phénomènes : le stress oxydant (généré entre autre par A $\beta$ ) occasionne des modifications chimiques au niveau des protéines, susceptibles d'en perturber l'activité et les enzymes de réparation peuvent être touchées (5). Le clivage protéolytique anormale de l'APP donne lieu à la sécrétion du peptide A $\beta$ , mais également à d'autres sous-espèces (6) dont les fonctions sont mal connues, mais pourraient interférer avec les processus de signalisation en réponse aux dommages à l'ADN (7). La toxicité du peptide A $\beta$  implique la génération d'un stress oxydant mais également la perte de l'homéostasie du calcium (8). Ce phénomène induit notamment l'expression de l'enzyme protéolytique calpaïne (9), responsable du clivage et donc de la réduction d'activité de la glycosylase OGG1. En présence d'A $\beta$  et en réponse à un stress oxydant, si le système BER est sous-exprimé, certains acteurs du NER sont en revanche surexprimés (10). Cette surexpression peut être liée au fait qu'outre les cassures simple brin et petites lésions oxydatives généralement prises en charge par le BER, des lésions plus volumineuses peuvent se former, comme les lésions tandems ou les cyclopurines (11). L'adduit volumineux 4-HNE (12), sous-produit de la peroxydation lipidique (13), est également susceptible de stimuler le NER. Mais, il ne faut pas négliger la pluralité des rôles joués par certains facteurs du NER au sein de la cellule. Ainsi, l'accumulation des dommages oxydatifs (14) pourraient stimuler l'action de facteurs comme XPC et DDB2, non pas en tant qu'acteurs de la réparation de l'ADN, mais en tant que senseurs de dommages non réparés pour la mise en place du processus apoptotique (15).

## Conclusions et perspectives

Dans cette étude nous avons analysé le phénotype de réparation d'une lignée sécrétrice du peptide neurotoxique A $\beta$ , connu pour générer des espèces réactives de l'oxygène. A l'état basal, le niveau de dommages oxydatifs était plus élevé que dans la lignée contrôle, et l'induction de ces mêmes dommages à l'issue d'un stress métallique ou oxydant était également beaucoup plus importante chez la lignée APP751. Pourtant, la voie de réparation associée préférentiellement à la réparation des « petites » lésions était sous-exprimée à l'état basal, et encore plus après traitement par des agents caractéristiques de la maladie d'Alzheimer tels que CuSO<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, démontrant une incapacité de la lignée APP751 à s'adapter à une attaque extérieure. Cette absence de réponse au niveau du BER s'insère dans l'hypothèse que les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer accumulent des dommages oxydatifs qui les poussent à réintégrer un processus de division cellulaire, rapidement avorté, pour évoluer vers une mort par apoptose. Nous avons cependant observé une réponse de la voie NER chez la lignée APP751. En effet, les facteurs XPC et DDB2 apparurent spécifiquement surexprimés au sein de la lignée sécrétrice d'A $\beta$  confrontée un traitement additionnel par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pour tenter d'expliquer ce phénomène, plusieurs questions se posent : la sous-expression du BER en présence d'A $\beta$  conduit-elle au recrutement secondaire de facteurs du NER pour réparer les dommages oxydatifs de type 8oxoG ? Ou la cellule fait-elle face à des lésions plus volumineuses comme les lésions tandem ou l'adduit du 4-HNE ? Les facteurs du NER sont-ils surexprimés dans une optique de réparation de l'ADN ou de la mise en place de l'apoptose ? Quelle est la place du cycle cellulaire entre dommages à l'ADN, réparation et apoptose ? Pour répondre aux questions concernant le type de dommages à l'ADN, il nous sera possible d'utiliser notre modèle cellulaire. Par contre, pour l'étude des relations entre réparation, cycle cellulaire et apoptose, nous ne pourrons plus nous permettre d'utiliser un modèle cancéreux. Nous devons valider les résultats obtenus sur un modèle animal de type Alzheimer et poursuivre les expériences susceptibles de nous éclairer

sur le chemin suivi par les neurones, depuis l'apparition des lésions oxydatives jusqu'à la neurodégénérescence.

Des expériences supplémentaires pour étendre la compréhension du modèle cellulaire utilisé, en concentrant nos observations sur l'effet direct de la sécrétion d'A $\beta$  sur les systèmes de réparation sont cependant envisageables. Des résultats intéressants ont déjà été obtenus au niveau de l'expression génique des acteurs qui prennent en charge les cassures double brin, expression qui s'est avérée réduite en présence d'A $\beta$ . Cette prédiction d'une diminution de la réparation des cassures double brin, dommages à l'ADN les plus enclins à déclencher l'apoptose, mérite d'être approfondie.

A $\beta$  n'étant pas la seule caractéristique histopathologique définissant et influençant la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, une étude « monoparamétrique » semblable à la notre serait envisageable en ciblant cette fois spécifiquement les effets de la protéine Tau sur les dommages et la réparation de l'ADN. Une récente étude a montré que dans des neurones en culture, un stress oxydant aigu et un choc thermique conduisaient à l'accumulation la protéine Tau sous forme non phosphorylée dans le noyau des cellules en question. Un test des comètes a par la suite révélé que cette forme nucléaire de Tau protégeait les neurones sauvages contre les dommages à l'ADN alors que les neurones dépourvu de cette protéine présentaient de nombreuses lésions (Sultan *et al.* 2011). Il serait donc intéressant de comprendre l'évolution des fonctions de Tau au sein de la maladie d'Alzheimer. Sa translocation nucléaire et son effet protecteur en termes de dommages à l'ADN pourraient vraisemblablement diminuer au fur et à mesure de l'avancement de la maladie.

Au cours de ce travail, une étude préliminaire sur l'expression des gènes du BER dans les cerveaux de souris doublement transgénique pour APP et PS1 (provenant du laboratoire du Pr Alain Buisson) a été réalisée. Les premiers résultats sont encourageants puisqu'ils témoignent d'une réduction de l'expression génique d'OGG1 chez les souris transgéniques âgées de 5 et 10 mois par rapport aux souris sauvages contrôles. Il serait par exemple intéressant de mener une étude sur ce modèle transgénique pour la maladie d'Alzheimer afin



de préciser la chronologie des événements qui conduisent à l'issue fatale de la maladie. L'établissement d'une cinétique d'apparition des dommages à l'ADN serait confronté à l'analyse des capacités de réparation et au statut de régulation des protéines du cycle cellulaire au cours de la maladie. En parallèle, la présence, la caractérisation et la quantification des caractéristiques histopathologiques comme Tau et A $\beta$  serait également étudiées.

A plus long terme, la compréhension de l'implication des lésions et de la réparation de l'ADN dans la maladie d'Alzheimer pourrait contribuer à établir des stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

Nous avons évoqué l'absence d'un diagnostic définitif de la maladie d'Alzheimer, hormis le diagnostic post-mortem. Bien que cible majeure des recherches autour de cette démence particulière, la difficulté à établir un diagnostic réside dans le caractère multifactoriel de la maladie. Lors de la journée Alzheimer du CEA en 2009, j'ai entendu Luc Buée énoncer que qualifier une maladie de multifactorielle signifiait que « l'on n'y comprenait pas grand-chose ». Plaisanterie mise à part, la suite de son exposé mettait l'accent sur l'avancée considérable des recherches autour de la maladie d'Alzheimer dans les 30 dernières années et leur apport en termes de compréhension des mécanismes qui régissent la maladie. Les méthodes de diagnostic actuelles combinent des consultations psychologiques et visent à rendre routinières la détection de lésions histopathologiques caractéristiques du vivant de l'individu via les techniques d'imagerie et la présence de biomarqueurs dans les fluides corporels, comme le dosage du peptide A $\beta$  ou de Tau dans le liquide céphalo-rachidien. Dans une maladie à l'étiologie si complexe, la multiplication des tests et la capacité à recouper certains paramètres pourraient améliorer grandement la fiabilité du diagnostic. Il serait donc intéressant de mener une étude sur les capacités de réparations de cellules sanguines de patients présumés atteints de la maladie d'Alzheimer et d'établir alors s'il présente un « phénotype réparation » spécifique permettant de les distinguer de sujets sains, en complément d'autres données d'ordre psychologique ou ayant trait à l'imagerie.

### *Conclusions et perspectives*

D'un point de vue thérapeutique, une connaissance poussée des déficiences en termes de réparation de l'ADN pourrait donner lieu à l'établissement de drogues corrigeant ou du moins limitant ce phénomène.

## Chapitre IV : Matériel et Méthodes

### I. Culture cellulaire

#### A. Produits et matériel

Le milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium/Glutamax™ : DMEM+Glutamax™), le sérum de veau foetal (SVF), la pénicilline-streptomycine, les acides aminés non essentiels (MEM/NEAA), la généticine (G418), la trypsine/EDTA, le PBS (sans CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub> : DPBS) proviennent de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

Selon l'expérience, les lignées de neuroblastome humain ont été cultivées dans des flasques (25, 75 ou 150 cm<sup>2</sup>), dans des boites de culture rondes (35, 60 ou 100 mm de diamètre) provenant de chez Beckton Dickinson (Pont-de-Claix, France) ou dans des microplaques de 96 puits (Nunc, Dutscher, Brimath, France). Les cryotubes de congélation proviennent de chez ce dernier fournisseur également. Pour le comptage des cellules des grilles à usage unique sont utilisées (Kova Slide, Hycor, Garden Grove, CA, USA). Pour les récoltes, des tubes de 15 ou 50 mL sont également utilisés (Falcon).

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>), le MTT, le PBS (avec CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub>), le DMSO et le cristal violet proviennent de chez Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Des kits commerciaux reposant sur la technique ELISA sont utilisés pour mesurer la quantité des isoformes d'Aβ dans le milieu de culture des cellules. Pour l'isoforme Aβ<sub>40</sub>, le kit Colorimetric BetaMark™ x-40 ELISA (Covance, Princeton, NJ, USA) est utilisé et pour l'isoforme Aβ<sub>42</sub>, c'est le kit INNOTEST™ beta-amyloid (1-42) (Innogenectics, Ghent, Belgique).

## B. Culture des lignées de neuroblastome humain

Dans notre étude nous avons utilisé deux versions de la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y. La première version, désignée comme mock, a été transfectée stablement par le plasmide pcDNA3 vide. La seconde version, nommée APP751, a été transfectée de façon stable par le plasmide pcDNA3 porteur du transgène codant pour l'isoforme à 751 acides aminés de l'APP, elle-même porteuse de la mutation suédoise de la protéine (APP<sup>sw</sup>). La transfection de la lignée APP751 lui confère la capacité de surexprimer la protéine transmembranaire APP à 751 acides aminés. La mutation APP<sup>sw</sup> affectant le transgène engendre un clivage accru de la protéine APP par les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases et conduit à la libération d'A $\beta$  dans le milieu de culture.

Les lignées mock et APP751 nous ont été gracieusement fournies par l'équipe du Dr Luc Buée (Vingtdeux *et al.* 2005). Les deux lignées sont cultivées dans du milieu DMEM+Glutamax<sup>TM</sup>, supplémenté par 10% de SVF, 1 mM de MEM/NEAA, 1% de pénicilline-streptomycine (220  $\mu$ g/mL) et 400  $\mu$ g/mL de G418 (sélection du vecteur d'expression pour les lignées mock et APP751). Les lignées se développent à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Les lignées mock et APP751 sont divisées une fois par semaine : une division de 1/10 est nécessaire à chaque passage. Pour cela, les cellules sont d'abord rincées avec 10 mL de DPBS puis sont trypsinées avec 1 mL de trypsine EDTA (0,5 g/L trypsine, 0,2 g/L EDTA). Les cellules se décollent rapidement (1 à 2 min). L'action de la trypsine est arrêtée par du milieu de culture. Les cellules en suspension sont alors réparties dans de nouvelles flasques de culture.

## C. Congélation de cellules

Les cellules sont régulièrement congelées pour leur maintien au sein du laboratoire. Pour cela, les lignées mock et APP751 sont trypsinées comme indiqué ci-dessus, comptées au microscope

inversé (grille à usage unique, Kova® slide, Hycor, Garden Grove, CA, USA) puis centrifugées à 400xg pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris délicatement par la solution de congélation (DMSO 10% + SVF) et transféré dans des cryotubes (5 x 10<sup>6</sup> cellules maximum par cryotube, volume final 1 mL). Les cellules sont congelées progressivement jusqu'à -80 °C en utilisant un bicell. Les cellules sont ensuite conservées dans l'azote liquide.

#### **D. Quantification des isoformes d'A $\beta$ sécrétées dans le milieu de culture**

Le milieu de culture des lignées mock et APP751 est récolté 24, 48 et 72h après l'ensemencement et placé dans un tube de 50 mL. Le milieu est alors centrifugé à 300 g pendant 5 minutes pour s'affranchir des débris cellulaires.

Pour l'isoforme A $\beta$ 40, le test Colorimetric BetaMark™ x-40 ELISA (Covance, Princeton, NJ, USA) est utilisé. Pour l'isoforme A $\beta$ 42, c'est le kit INNOTEST™ beta-amyloid (1-42) (Innogenetics, Ghent, Belgium) qui est utilisé, en se référant aux recommandations des fournisseurs respectifs.

#### **E. Test de cytotoxicité après traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou CuSO<sub>4</sub>**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées (2500 cellules dans 200  $\mu$ L de milieu DMEM+Glutamax™ par puits) dans des microplaques de 96 puits et incubées à 37°C pendant 48h. A l'issue de ces 48h, deux agents de stress ont été testé : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou CuSO<sub>4</sub>. Pour chaque produit, une gamme de 10 concentrations (de 100  $\mu$ M à 1mM) a été appliquée. Au lieu d'enlever le milieu présent dans les puits pour le remplacer par du milieu contenant directement la concentration de stress finale, nous avons choisi de laisser les 200  $\mu$ L de milieu initiaux et d'ajouter 20  $\mu$ L de solution 11X concentrée pour atteindre la concentration de stress finale. Ainsi, nous n'éliminons pas le peptide A $\beta$  sécrété par la lignée APP751 pendant les précédentes 48h d'ensemencement. Les cellules sont incubées en présence de chaque agent de stress pendant 24h à 37°C. Puis le milieu est retiré et remplacé par du milieu neuf (200  $\mu$ L

par puits) pour une incubation supplémentaire de 24h à 37°C. Ensuite, 20 µL d'une solution à 5 mg/mL est appliquée à chacun des puits contenant 200 µL de milieu, pour une durée de deux heures, à 37°C. Le MTT est un sel de tetrazolium jaune, réduite par la succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan insolubles de couleur violette. Dans ce test, l'activité métabolique liée à la respiration des cellules permet d'évaluer leur viabilité. La solution milieu + MTT est finalement retirée et 200 µL de DMSO sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont agitées 20 minutes à température ambiante dans un souci d'homogénéisation. Le DMSO pénètre la membrane plasmique et solubilise les cristaux de formazan. L'absorbance de la solution violette ainsi obtenue est lue à 560 nm et permet de déterminer le pourcentage de survie. Les cellules n'ayant pas reçu de stress correspondent aux 100% de survie. Le pourcentage de viabilité pour chaque dose d'agent de stress est ensuite calculé par rapport aux témoins non stressés.

## **F. Tests de cytotoxicité et de clonogénicité après expositions aux UVC**

Les lignées mock et APP751 sontensemencées ( $2.10^6$  cellules dans 2 mL) dans des boites de culture rondes de 35 mm de diamètre et incubées pendant 48h à 37°C. Le jour de l'irradiation, le milieu de culture des cellules est prélevé et conservé dans un tube falcon de 50 mL le temps de l'irradiation. Le milieu est remplacé par 3 mL de PBS avec  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$ . Quatre doses d'irradiations aux UVC sont testées : 5, 10, 15 et 20  $\text{J/m}^2$ . A l'issue de l'irradiation, le PBS est retiré et remplacé par le milieu ayant été conservé dans un tube falcon.

- Pour le test MTT : les cellules sont incubées à nouveau à 37°C pendant 24h. Puis, 200 µL d'une solution de MTT à 5 mg/mL sont ajoutés aux 3 mL de milieu présent dans chaque boite de culture ronde de 35 mm de diamètre et les cellules sont incubées pendant 2h à 37°C. A l'issue de ces 2h la solution de milieu + MTT est retirée et remplacée par 2 mL de DMSO. Les boites de culture sont mises à

agiter pendant 20 minutes à température ambiante. Pour chaque condition de culture, 200  $\mu$ L de DMSO sont prélevés en triplicat et transvasés dans une plaque 96 puits. La lecture d'absorbance et le calcul du pourcentage de viabilité s'effectue comme dans la partie I.E de ce chapitre.

- Pour le test de clonogénicité : les cellules irradiées (et leur témoin non irradiées) sont comptées à l'issue de l'irradiation et ré-ensemencées à 200 cellules par mL dans des boîtes de culture rondes de 60 mm de diamètre. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 14 jours avec un changement de milieu tous les 3 jours. A la fin de ces 14 jours, le milieu de culture est enlevé, les boîtes de culture rincées par 2 mL de PBS sans  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$  et une solution de cristal violet (0,5% p/v) dans un mélange  $\text{H}_2\text{O}$ /méthanol 1 :1 est appliqué pendant 10 minutes à température ambiante, afin de révéler les cellules ayant subsisté au stress et gardé la capacité de coloniser. Les boîtes de culture sont finalement rincées à l'eau courante et les colonies comptées manuellement.

### **G. Préparation de cellules traitées sous la forme de culots secs ou conservés dans du milieu de congélation**

Les lignées mock et APP751 sont ensemencées selon les besoins de l'expérience dans des flasques de 75  $\text{cm}^2$  ou des boîtes de culture rondes de 100 mm de diamètre pendant 48h. A l'issue de cette incubation, les agents de stress  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{CuSO}_4$  sont appliqués sans retrait du milieu de culture au préalable, à des concentrations finales de 115  $\mu\text{M}$  et 350  $\mu\text{M}$  respectivement, pour une durée de 24h. Pour les études concernant les UVC, les lignées mock et APP751 sont irradiées avec des doses de 5  $\text{J}/\text{m}^2$ . Des témoins non traités ou non irradiés sont également conservés. A l'issue des 24h de stress oxydant ou métallique, les cellules sont récoltées et comptées. Il en est de même pour les cellules irradiées, qui sont récoltées juste après l'irradiation, ou 4h et 24h plus tard. Suivant les besoins des expériences ultérieures, un culot sec est réalisé par simple centrifugation, aspiration du milieu, rinçage au DPBS et

congélation au  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alternativement, les cellules peuvent être congelées dans un milieu de congélation composé de SVF et 10% de DMSO pour être conservées dans l'azote liquide.

## **II. Evaluation du stress oxydant et des dommages à l'ADN**

### **A. Mesure des ROS par cytométrie en flux**

Les lignées mock et APP751, à l'issue de 48h d'ensemencement, suivies ou non d'un stress  $\text{CuSO}_4$  (350  $\mu\text{M}$ ) ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  (115  $\mu\text{M}$ ) sont récoltées, comptées et resuspendues dans du PBS à raison d' $1.10^6$  cellules par mL. Dix  $\mu\text{M}$  de CM-H2DCFDA (dérivé carboxylé de fluoréscéine, excitation 488 nm, émission 525 nm, Invitrogen) dans du DMSO sont ajoutés aux cellules en suspension, et le tout est incubé pendant 30 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'iodure de propidium (Sigma) est alors ajouté dans chaque échantillon pour une concentration finale d'1  $\mu\text{M}$ . Les échantillons sont alors mis sur la glace. L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées par un cytomètre en flux FacsCalibur et son logiciel dédié CellQuest (Becton Dickinson.). En tant que contrôle négatif la lignée mock sans ajout de CM-H2DCFDA est utilisée. La lignée mock traitée par 100  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  juste avant l'incubation par la sonde CM-H2DCFDA est utilisée en tant que contrôle positif.

### **B. Evaluation des dommages à l'ADN nucléaire par la technique des comètes**

L'agarose Low Melt, l'agarose de routine, le NaCl, le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , le Trizma-base, l'HCl, le sodium sarcosinate, le triton, le KCl, l'EDTA, le NaOH et le bromure d'étidium (BET) proviennent de chez Sigma. Le logiciel d'analyse logiciel Comet IV provient de chez Perceptive Instrument (Haverhill UK).

Le test des comètes est mis en œuvre pour évaluer la présence des cassures simple brin ou des sites alcali-labiles (site abasiques, ...). Des informations additionnelles sur le taux de purines oxydées sont obtenues par la quantification des sites sensibles à l'action de l'enzyme



bactérienne fpg (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase). L'expérience fut conduite essentiellement comme précédemment décrit par Sauvaigo (Sauvaigo *et al.* 2002). Rapidement, les échantillons correspondant aux lignées mock et APP751, traitées ou non par  $\text{CuSO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et conservés dans l'azote liquide dans du milieu de congélation, sont suspendues dans de l'agarose Low Melt 0,5% et déposées sur lame de verre préalablement couverte par de l'agarose de routine à 1% dans du PBS, à raison de 10000 cellules par lames et 3 lames par condition. Une fois l'agarose Low Melt solidifié, les lames sont placées dans une solution de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Tris-HCl, pH10, 1% sodium sarcosinate, 10% DMSO et 1% triton X100) à 4°C sur la nuit. Le tampon de lyse est ensuite neutralisé par 3 lavages de 5 minutes (immersion des lames dans une solution de tris-HCl 0,4 M). Les lames sont ensuite équilibrées 3 fois 5 minutes dans le tampon de digestion de la fpg (0,1 M KCl, 0,5 mM  $\text{EDTA}_{\text{Na}_2}$  et 0,04 M Tris-HCl, pH8). La digestion par la fpg (1,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}$  par lame) pour la détection des purines oxydées s'effectue pendant 45 minutes à 37°C. Les lames contrôle sont traitées par le tampon de digestion de la fpg seul.

A l'issue de la digestion, les lames sont transférées dans un bac d'électrophorèse et immergées dans une solution alcaline (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH>13). Après 30 minutes de débobinage de l'ADN, l'électrophorèse est réalisée à 25 V (300 mA) pendant 30 minutes.

Les lames sont ensuite rincées à raison de 3 fois 5 minutes par une solution de neutralisation (Trizma 0,4 M, pH 7.5) et l'ADN est révélé par une solution de BEt (50  $\mu\text{L}$  à 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les noyaux sont observés grâce à un microscope à fluorescence et analysés par le logiciel Comet IV. L'état de la cassure est estimé à partir de l'analyse des lames non traitées par la fpg et correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% Tail DNA). La présence de purines oxydées est déterminé par la soustraction des valeurs de % Tail DNA des lames non traitées par la fpg aux lames correspondantes traitées par la fpg. Pour chaque échantillon, la moyenne de la valeur %Tail intensity est réalisée à partir de l'analyse de 50 comètes, sur chaque lame d'un triplicat.

## C. Evaluation des dommages à l'ADN par spectrométrie de masse

### 1. Extraction et digestion de l'ADN

Le sucrose, le  $MgCl_2$ , le Tris-HCl, la déféroxamine, le triton, l'EDTA- $Na_2$ , la ribonuclease A, la ribonuclease T1, le SDS, l'isopropanol, l'éthanol proviennent de chez Sigma. La protéinase K provient de chez Qiagen.

Pour les lignées mock et APP751, exposées ou non à  $5 J/m^2$  d'UVC, un triplicat de culots secs est repris et homogénéisé par pipetage dans 750  $\mu L$  de tampon de lyse A (320 mM de sucrose, 5 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de déféroxamine, et 1% de triton X-100, pH 7.5). Les échantillons sont alors centrifugés pendant 5 minutes à 1500g. Le surnageant est éliminé pour garder le culot nucléaire. Cette étape est répétée deux fois. Le culot nucléaire est ensuite remis en suspension dans 300  $\mu L$  de tampon de lyse B (5 mM EDTA-Na, 10 mM de Tris-HCl, 0,15 mM de déféroxamine, pH 8). Après homogénéisation, 15  $\mu L$  de SDS (dodécyl sulfate de sodium) à 10% sont ajoutés au lysat, ainsi que 1,5  $\mu L$  de RNase A (100 mg/mL) et 3,5  $\mu L$  de RNase T1 (1 U/ $\mu L$ ). Les échantillons sont alors incubés pendant 15 minutes à 50°C. Quinze  $\mu L$  de protéase sont ajoutés et une incubation d'1h à 37°C est réalisée. L'ADN est alors précipité par addition de 600  $\mu L$  de solution de NaI (20 mM EDTA- $Na_2$ , 7,6 M de NaI, 40 mM de Tris-HCl, 0,3 mM de déféroxamine, pH8) et 1 mL d'isopropanol à 100%. Les cellules sont alors centrifugées pendant 5 minutes à 1500 g. Le surnageant est retiré et le culot d'ADN repris par 1 mL d'isopropanol à 40%. Une nouvelle centrifugation est réalisée comme précédemment à l'issue de laquelle 1 mL d'éthanol à 70% est ajouté. Après une dernière centrifugation, et élimination de l'éthanol, l'ADN est dissout dans 50  $\mu L$  de déféroxamine 0,1 mM pour éviter l'oxydation et stocké à -20°C jusqu'à l'hydrolyse.

### 2. Hydrolyse de l'ADN

La nucléase P1 (de *penicillium citrinum*), la phosphodiesterase II, la phosphatase alcaline et la phosphodiésterase I (de *crotalus adamenteus* Venom) proviennent de chez Sigma.

L'ADN est digéré en nucléosides après incubation à 37°C avec un mélange d'enzymes comprenant nucléase P1, phosphodiesterase II et un tampon 10X (200 mM acide succinique, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH6). Puis au bout de 2h sont ajoutés du tampon de phosphatase alcaline dans 10X (500 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8) ainsi que la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline. Après 2h de digestion, la solution contenant des nucléosides est neutralisée par 0,1 M d'HCl et centrifugée 5 minutes à 5000 g. Le surnageant est transféré dans un vial HPLC puis analysé par HPLC-MS/MS.

#### **D. Quantification de la délétion commune dans l'ADN mitochondrial**

Les procédures relatives à la quantification de la délétion commune dans l'ADN mitochondrial ont déjà fait l'objet d'une publication (Peinnequin *et al.* 2011).

##### **1. Préparation du lysat**

Le Tween20<sup>®</sup>, le NP40 proviennent de chez Sigma.

Des culots secs issus des lignées mock et APP751 traités ou non par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.10<sup>6</sup> cellules) sont repris par 1 mL de tampon de lyse (Tween20<sup>®</sup> 0,005% v/v ; NP40 0,05% v/v ; Tris HCl 10 mM pH 8.3) et la protéinase K est ajoutée à une concentration finale de 0,1 mg/mL. Les échantillons sont alors incubés à 56°C pendant 30 minutes et l'action de la protéinase K inactivée par chauffage à 98°C pendant 15 minutes.

##### **2. Amplification des ADN nucléaire, mitochondrial total et mitochondrial délété par qPCR en temps réel**

Le kit « LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green » provient de chez Roche. La séquence des amorces spécifiques utilisées est disponible dans la référence suivante (Peinnequin *et al.* 2011).

Vingt µL de lysat sont dilués dans 100 µL de tampon de lyse 0,5X et soniqués pendant 10 minutes. Ensuite, 14 µL de cette solution fraîchement diluée et soniquée sont dilués dans 8

$\mu\text{L}$  de tampon de lyse 1X soniqué et 48  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Ces étapes de dilutions successives sont réalisées dans le but de diluer le détergent présent dans le tampon de lyse et d'obtenir des efficacités de qPCR reproductibles. Le kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green est utilisé pour réaliser les expériences de qPCR. Chaque réaction est conduite en utilisant 5  $\mu\text{L}$  de lysat, 7 mM  $\text{MgCl}_2$  et 0,4  $\mu\text{M}$  d'amorces Forward et Reverse. Les réactions PCR sont réalisées dans l'appareil MX3005p et se composent d'un premier segment de 1 cycle à 95°C pendant 600 secondes, un second segment de 45 cycles, comportant chacun une étape à 95°C pendant 20 secondes, une étape à 54°C pendant 5 secondes et une étape à 72°C pendant 8 secondes. Pour obtenir les courbes de dissociation relatives à chaque amplicon, un dernier segment est réalisé, composé d'un cycle incluant une étape de 20 secondes à 95°C, une étape de 30 secondes à 68°C et enfin une étape de 30 secondes à 95°C. La GAPDH, l'ADN mitochondrial total (mt tot) et l'ADN mitochondrial délété (mt del) sont amplifiés en triplicat dans les échantillons suivants : mock témoin, APP751 témoin, mock traité par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et APP751 traité par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Un mix de ces quatre conditions est utilisé comme calibrateur (cal). Cette expérience est conduite deux fois sur deux réplicats biologiques distincts (N=2). La méthode comparative des cycles seuil est utilisée pour réaliser la quantification relative. Alors, l'abondance relative de chaque séquence cible (GAPDH, mt tot ou mt del) est calculée pour chaque échantillon en utilisant les formules suivantes, E correspondant à l'efficacité d'amplification des couples d'amorces spécifiques :

$$(1) E^{\text{Ct cal (GAPDH)}} - E^{\text{Ct échantillon (GAPDH)}}$$

$$(2) E^{\text{Ct cal (mt tot)}} - E^{\text{Ct échantillon (mt tot)}}$$

$$(3) E^{\text{Ct cal (mt del)}} - E^{\text{Ct échantillon (mt del)}}$$

Les valeurs mt tot et mt del sont alors normalisées par rapport à la GAPDH en utilisant les rapports (2)/(1) et (3)/(1) respectivement. Ces valeurs normalisées par rapport à la GAPDH permettent finalement le calcul du rapport mt del/mt tot pour chaque échantillon,

témoignant de l'importance d'ADN mitochondrial délété par rapport à l'ADN mitochondrial total.

### **III. Evaluation du phénotype réparation de l'ADN**

#### **A. Analyse de l'expression des gènes de réparation de l'ADN**

##### **1. Extraction d'ARNm et contrôle qualité**

L'ARN total est extrait de chaque échantillon grâce à l'utilisation du kit gene elute mammalian total RNA miniprep kit (Sigma), suivant les recommandations du fournisseur, incluant une étape d'incubation par de la DNase (Sigma) pour minimiser les contaminations par l'ADN génomique. Brièvement, les culots secs cellulaires sont resuspendus soigneusement dans la solution de lyse contenant 1% de 2-mercaptoéthanol, puis le lysat est placé sur une colonne Gene Elute Filtration puis centrifugée à 16000 g pendant 2 minutes. A l'éluat est ajouté un volume d'EtOH 70%, et l'échantillon est soigneusement homogénéisé. Ce mélange est disposé sur une colonne Gene Elute Binding, qui est centrifugée à 16 000 g pendant 30 secondes. L'éluat est éliminé, et les acides nucléiques fixés sur la colonne rincés par ajout d'un volume de solution de lavage n°1 et une centrifugation à 16000 g pendant 30 secondes. Chaque colonne reçoit ensuite 80 µL d'une solution de DNase I (10 µL d'enzyme et 70 µL de tampon RDD, mélangés par inversion) et est incubée à température ambiante durant 15 minutes, ce qui permet de dégrader tout ADN présent. La DNase est éliminée par rinçage à l'aide d'un volume de tampon de lavage n°1 et une centrifugation, puis par deux rinçages avec 500 µL de solution de lavage n°2 80% EtOH puis centrifugation. 50 µL de solution d'éluat de l'ARN sont disposés sur chaque colonne, ce qui permet de récupérer une solution contenant l'ARN, dont la concentration et le taux de contamination en protéines sont dosés par mesure d'absorbance à 260 nm et 280 nm à l'aide du Nanodrop 1000. Une concentration supérieure à 200 ng/µL est acceptable afin de réaliser afin de réaliser une qPCR sur l'échantillon, ainsi qu'un rapport 260/280 entre 1,7 et 2,1 pour une préparation d'une pureté

acceptable en termes de contamination en protéines. L'intégrité de l'ARN est ensuite vérifiée par la réalisation d'une électrophorèse conditions natives. Pour chaque échantillon, 500 ng d'ARN dans du tampon de charge non dénaturant (15% ficoll, 0,25% xylène cyanol, 0,25% bleu de bromophénol) sont déposés sur gel d'agarose 1% dans du TBE commercial (Invitrogen) avec 0,5 µg/mL de BEt (Sigma) ajoutés au gel. La migration s'effectue à 5-6 V/cm mesuré entre les deux électrodes de la cuve d'électrophorèse. L'ARN est considéré comme intact quand 2 bandes nettes correspondant aux sous-unités 28S et 18S sont visualisables avec un rapport 2 :1 en termes de quantités.

## ***2. Reverse transcription***

L'ARN total est reverse transcrit à l'aide du kit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) suivant les recommandations du fournisseur. Rapidement, 2 µg d'ARN total sont incubés à 70°C pendant 5 minutes en présence de 100 ng de Random Primers (Promega) et 10 mM d'un mix de dNTPs (Sigma). Les échantillons sont alors placés rapidement dans la glace puis le tampon 5X, 0,1 M de DTT et 45 U d'inhibiteur de ribonucléase (Sigma) sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 2 minutes à 25°C. 200 U de Reverse Transcriptase sont ajoutés à chaque échantillon qui sont préincubés pendant 10 minutes à 25°C et incubés ensuite 50 minutes à 42°C. La réaction est arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes.

## **3. PCR quantitative en temps réel**

### **a) Test des amorces**

Les amorces oligonucléotidiques spécifiques (voir tableau 4) sont dessinées grâce au logiciel Primer3-web 0.4.0 (<http://primer3.sourceforge.net>) et synthétisées chez un fournisseur commercial (Eurogentec).

Ces amorces ont été testées sur de l'ADNc des cellules mock ([C] = 20ng/µl). Dix dilutions séquentielles de cet ADNc dans l'eau ont été réalisées et déposées en double sur une plaque

qPCR 96-well plate non-skirted high profile (Eurogentec) en ajoutant un contrôle sans ADNc (*non template*). Chaque puits reçoit ensuite :

- 12,5  $\mu$ L de MESA BLUE qPCR MasterMix contenant la Taq polymérase (Eurogentec) et le fluorophore SYBR Green, s'intercalant dans l'ADN
- 2,5  $\mu$ L d'amorce *forward* (concentration du stock : 2 $\mu$ M)
- 2,5  $\mu$ L d'amorce *reverse* (concentration du stock : 2 $\mu$ M)
- 2,5  $\mu$ L eau *RNase free* (Sigma).

La plaque est recouverte d'un cache transparent et centrifugée durant 3 minutes à 700rpm. L'amplification et la lecture de fluorescence sont réalisées sur un thermocycleur MX3005P Multiplex Quantitative PCR sous le contrôle du logiciel MXPro (Stratagene Agilent Technologies) en utilisant le profil thermique suivant :

- 1<sup>er</sup> segment (1 cycle):
  - 5 minutes à 95°C (activation de la polymérase)
- 2<sup>nd</sup> segment (40 cycles) :
  - 15 secondes à 95°C (dénaturation de l'ADN)
  - 20 secondes à 55°C (hybridation des amorces)
  - 40 secondes à 72°C (synthèse du brin complémentaire)

La lecture de la fluorescence s'effectue à la fin de l'étape d'hybridation, le SYBR Green étant d'autant plus fluorescent que la température est réduite. Ce second segment permet la détermination du cycle seuil (cycle treshold, Ct). Le Ct est obtenu par un algorithme qui détermine la portion de la courbe d'amplification où l'augmentation de la fluorescence est exponentielle. Cette portion de courbe est appelée en conséquence appelé phase exponentielle. Le Ct est placé à 32,5% de la phase exponentielle.

- 3<sup>ème</sup> segment (1 cycle)
  - 1 minute à 95°C (dénaturation de l'ADN)
  - 30 secondes à 55°C (renaturation de l'ADN)
  - 30 secondes à 95°C (dénaturation de l'ADN)

La lecture de fluorescence s'effectue à chaque point entre 55 et 95°C. Ce troisième et dernier segment permet la réalisation d'une courbe de dissociation. L'observation de la courbe de dissociation permet de s'assurer, par l'obtention d'un pic unique, qu'un seul produit correspondant à une amplification spécifique est présent dans le mélange.

L'efficacité E des amorces est déterminée par le logiciel MXPro à l'aide de la formule:

$N_n = N_{\text{initiale}} \times (1 + E)^n$  où N est le nombre de copies de la séquence amplifiée et n le nombre de cycles. Pour  $E = 1$  (efficacité de doublement de 100%), le nombre final de copies après n cycles est égal au nombre maximal théorique de copies qu'il est possible d'obtenir avec la quantité initiale de copies. L'efficacité mesurée expérimentalement doit être comprise entre 95 et 105% pour valider un couple d'amorces.

#### **b) Validation des gènes de référence et quantification relative de l'ARNm**

La mesure de l'expression de gènes par qPCR nécessite tout d'abord la validation de « gènes de ménage » ou gènes de référence, c'est-à-dire de gènes dont l'expression ne change pas au cours du temps, malgré l'application d'un stress. Cela permet de disposer d'une référence invariable pour comparer les échantillons. À l'aide d'amorces dédiées (voir tableau), l'expression de S18 (protéine ribosomale), cyclophiline B et GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase) est vérifiée sur les échantillons issus des différentes conditions. La composition du mélange réactionnel (avec l'ADNc à une concentration de 4 ng/μL utilisé à concentration constante et non séquentiellement diluée) et le profil thermique sont identiques à ceux utilisés pour le test de validation des amorces. A l'issue de la PCR, les



valeurs des cycles seuils obtenus en triplicat pour chaque amorce au sein de chaque condition sont exportés dans la matrice Excel BestKeeper<sup>®</sup> version 1.0 (Pfaffl *et al.* 2004). Cette dernière permet d'une part de déterminer la variabilité individuelle d'un seul gène de référence au sein de toutes les conditions. Pour cela, la moyenne géométrique des Ct est calculée, ainsi que la déviation standard associée. Le critère de validation est fondé sur un écart type des cycles seuils de toutes les conditions inférieur à 1. Il est possible de se limiter à cette validation lorsque l'on souhaite n'utiliser qu'un seul gène de référence pour normaliser l'expression des gènes cibles. Nous avons choisi dans notre étude d'étendre le nombre de gènes de référence à 3. La matrice permet de déterminer si ces gènes sont régulés de manière différente dans les diverses conditions, par l'établissement de corrélations de Pearson. La régulation concordante des différents gènes de référence est vérifiée pour chaque PCR. La quantification relative de l'expression des gènes cibles entre les différentes conditions est réalisée par la macro Excel REST-MCS (Pfaffl *et al.* 2002). Cette dernière est capable de traiter plusieurs gènes de ménage, plusieurs gènes d'intérêt et plusieurs conditions expérimentales. Elle réalise le facteur de sur ou sous-expression par rapport à la condition contrôle selon la méthode du  $\Delta\Delta Ct$  et procure également une mesure statistique (test de comparaison par paire après réallocation aléatoire) de la significativité de cette expression ( $p < 0,05$ ).

## **B. Mesure de l'expression et de l'activité des protéines du BER**

### **1. Extraits nucléaires**

La lyse se fait à partir de culots cellulaires conservés dans l'azote liquide. Le protocole de lyse nucléaire a été optimisé pour travailler à partir d'un minimum de  $3 \cdot 10^6$  cellules et un maximum de  $5 \cdot 10^6$  cellules. L'ensemble des étapes de la lyse est réalisé à 4 °C. Les cellules sont décongelées dans un bain d'eau froide, puis centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Le culot est repris par 1 mL de PBS pour rincer les cellules. Le culot de cellules est ensuite repris par le tampon A (HEPES pH 7,9 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 10 mM, Triton X-100

0.02%, DTT 0,5 mM, PMSF 18 µg/mL) préparé le jour de la lyse, filtré et conservé dans la glace. Un millilitre de tampon A est ajouté pour  $1.10^6$  cellules. Les cellules sont incubées pendant 20 minutes avec le tampon A. A la fin de cette incubation, les cellules sont agitées pendant 30 secondes pour faciliter la lyse membranaire. L'efficacité de la lyse est vérifiée au bleu trypan : plus de 90 % des cellules sont colorées en bleu, témoignant de la réussite de la première lyse. Une centrifugation à 3220 g pendant 5 minutes permet de culotter les noyaux intègres. Les protéines cytoplasmiques sont alors situées dans le surnageant qui est éliminé. Le culot est ensuite repris par le tampon B (HEPES pH 7,9 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 400 mM, EDTA 0.2 mM, Glycérol 25%, DTT 0.5 mM, PMSF 18 µg/mL, antiprotéase 0.7X (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne)) préparé le jour de la lyse, filtré et conservé dans la glace. 12,5 µL de tampon B sont ajoutés pour  $1.10^6$  cellules. Les noyaux sont incubés pendant 20 minutes avec le tampon B. Pour faciliter la lyse des noyaux, deux congélations (dans l'azote liquide)-décongélations (à 4°C) sont réalisées. Une centrifugation à 16000 g pendant 10 min permet de séparer les débris membranaires des protéines nucléaires contenues dans le surnageant. Le lysat est alors aliquoté par 5 ou 10 µL et conservé à -80 °C jusqu'à son utilisation. Deux microlitres sont également prélevés pour le dosage des protéines (dilution 1/160è dans de l'eau désionisée).

## **2. Dosage de protéines**

La concentration en protéine est déterminée par la méthode de l'acide bicinchoninique à l'aide du kit MicroBC Assay Protein quantification (Interchim, Montluçon, France). Les protéines placées en milieu alcalin sont capables de réduire les ions Cu<sup>2+</sup> en ion Cu<sup>+</sup>. Le sel de sodium de l'acide bicinchoninique réagit alors avec les ions Cu<sup>+</sup> en formant un complexe de couleur pourpre soluble dans l'eau et présentant une forte absorption à 562 nm.

Le dosage est réalisé en microplaque 96 puits. La gamme étalon est effectuée à partir d'une solution étalon de BSA de concentration connue (2 mg/mL). Le volume réactionnel est de 100 µL et chaque condition est dupliquée. Trois dilutions sont réalisées pour le dosage à

partir de la solution préparée à la fin de la lyse cellulaire (1/160<sup>e</sup> pour les lysats nucléaires et 1/250<sup>e</sup> pour les lysats totaux). 100 µL de réactif MicroBC assay sont ajoutés dans chaque puits et la microplaque est incubée pendant 1 h à 60 °C. L'absorbance est mesurée à 560 nm et permet la quantification de la concentration en protéines de chaque lysat.

### **3. Mesure de l'expression des protéines**

Les extraits nucléaires ont été caractérisés par l'analyse de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivie par un western-blot. Pour cela, le lysat est dénaturé (réduction des ponts disulfures des protéines) en le mélangeant à une solution de Laemli (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 5 % β Mercaptoéthanol et en chauffant l'ensemble à 90 °C pendant 2 fois 5 min. Les protéines contenues dans le lysat sont séparées sur un gel d'électrophorèse avec 10 % d'acrylamide et contenant du SDS (gel dénaturant). Pour chaque lysat, 15 µg de protéines ont été déposés. La migration dure 1 h à 150 V. Le tampon de migration contient 25 mM de tampon Tris, 192 mM de Glycine et 0,1 % de SDS. Le marqueur de poids moléculaires utilisé provient de chez Fermentas (Burlington, Canada).

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 45 min à 100 V. Le tampon de transfert contient 0,1 % de SDS et 30 % de méthanol.

La membrane est ensuite saturée dans une solution de TBS (Euromedex, Souffelweyersheim, France)-Tween 0,5 % contenant 5 % de lait. Cette étape sert à saturer les espaces vides de la membrane c'est-à-dire les sites sans protéine pour éviter les fixations non spécifiques des anticorps. La saturation se fait sur la nuit à 4 °C sous agitation.

La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon TBS-Tween 0,5 %-Lait 5 %. L'anticorps anti-OGG1 (Interchim), l'anticorps anti-PARP1 (Cell Signaling) et l'anticorps anti-XRCC1 (Abcam) sont dilués au 1/1000 dans le tampon alors que l'anticorps anti-APE1 (Santa-Cruz Biotechnology) est dilué au 1/3000 et l'anticorps anti-β actine (Santa Cruz) est dilué au

1/10 000<sup>e</sup>. A la fin de la fixation primaire, la membrane est rincée dans du tampon TBS-Tween 3 fois 5 min sous agitation.

Enfin la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-souris, anti-lapin ou anti-chèvre) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Angleterre) couplé à la peroxydase et dilué au 1/20 000<sup>e</sup> dans du tampon TBS-Tween.

La dernière étape du western blot consiste à révéler la fixation de l'anticorps secondaire au moyen du kit ECL Plus (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Angleterre). La peroxydase liée à l'anticorps secondaire va alors réagir avec son substrat contenu dans le kit pour donner un produit photoluminescent. Pour finir, la membrane est exposée à un film photographique pendant 3 ou 5 minutes.

### **C. Test de réparation sur biopuce oligonucléotidique (puce oligo)**

Le test d'excision sur puce oligo peut être résumé par trois étapes. Tout d'abord la première étape de fonctionnalisation du support avec le dépôt d'oligonucléotides de 25 nucléotides de long (Eurogentec, Liège, Belgique). Une deuxième étape de fonctionnalisation est ensuite nécessaire et consiste en la formation des duplexes d'oligonucléotides (ODN) sur le support. A la fin de cette étape, la puce est entièrement fonctionnalisée et est constituée de plots ODN comportant des modifications de bases. Enfin, la réaction biochimique d'excision est réalisée lors de la dernière étape.

#### **1. Dépôt des ODN « support »**

Le support utilisé est une lame de verre recouverte d'un polymère fonctionnalisé par de la streptavidine (XanTec bioanalytics, Düsseldorf, Allemagne). Les dépôts d'ODN qualifiés de « support » sont réalisés par le robot de dispense (SciFLEXARRAYER S5, Scienion, Berlin, Allemagne). Les ODN supports sont biotinylés en 5' ce qui permet leur fixation sur le support grâce à la formation d'une liaison non-covalente forte entre la biotine et la streptavidine. Les ODN supports sont constitués de 25 nucléotides. Les lames utilisées pour

les expériences présentées dans cette étude comprennent 24 pavés, chaque pavé comprenant 26 dépôts d'ODN supports. Quatre lames peuvent être insérées en même temps dans une microplaque 96 puits permettant ainsi de délimiter des chambres réactionnelles où un lysat cellulaire peut réagir avec les oligonucléotides d'un pavé (TeleChem International, Sunnyvale, CA, USA).

## **2. Hybridation des duplexes d'ADN**

Lors de la deuxième étape, des duplexes d'ADN sont formés en solution en mélangeant 0,625  $\mu\text{M}$  d'ODN dit « lésion » et 0,5  $\mu\text{M}$  d'ODN appelé « long » dans un tampon PBS/NaCl 0,2 M. Les séquences des ODN « lésion » et ODN « long » sont complémentaires ce qui permet leur hybridation après 5 min à 80 °C et un retour progressif à la température ambiante. Les ODN « lésion » sont marqués en 3' avec un fluorochrome Cy3 et possède une base modifiée entre les nucléotides 6 et 9 en 3' (Eurogentec, Liège, Belgique). L'ODN « lésion » compte 22 nucléotides et l'ODN « long » compte 42 nucléotides. La séquence de l'ODN « long » est choisie de telle façon à ce que les 20 derniers nucléotides en 3' soient complémentaires des 20 nucléotides de l'ODN « support ». Cette astuce permet de connaître précisément où vont se fixer les différents duplexes d'oligonucléotides (portant chacun un dommage différent) sur les ODN « support ». Dans un deuxième temps, il s'agit d'hybrider les duplexes (ODN « lésion » + ODN « long ») aux ODN « support » afin que la lame soit totalement fonctionnalisée. Pour cela, les lames sont rincées 3 fois 3 min avec le tampon PBS/NaCl 0,2 M ayant servi à préparer le mélange de duplexes. 80  $\mu\text{L}$  du mélange de duplexes sont ensuite déposés sur la lame fonctionnalisée avec les ODN « support ». L'hybridation en mode sandwich entre le duplex préalablement formé et l'ODN « support » est réalisée lors de l'incubation de la lame à 37 °C pendant 1 h. La lame est ensuite rincée 3 fois 5 min avec le tampon d'excision (10 mM HEPES/KOH pH 7,8, 2 mM EGTA, 80 mM KCl, 0.1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , 1 mM DTT). A ce stade, le support est entièrement fonctionnalisé : il

contient des oligonucléotides doubles brins marqués Cy3 et comportant des dommages de l'ADN spécifiques.

### 3. La réaction d'excision sur le support à partir d'extrait

Les extraits nucléaires sont dilués dans le tampon d'excision contenant 0.5 mg/mL de BSA. La concentration protéique du lysat cellulaire est de 20 µg/mL lors de la réaction d'excision sur la puce. 100 µL du mix contenant le lysat cellulaire sont ensuite déposés sur chaque pavé. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant 1 h.

A la fin de l'incubation, la lame est rincée 3 fois 5 minutes avec une solution de PBS/NaCl 0.2 M/Tween 0.1 % à 37 °C. La lame est séchée par centrifugation pendant 3 min à 100xg puis en la plaçant 5 min à 37 °C.

La lecture de la fluorescence résiduelle est réalisée au moyen du scanner décrit précédemment. Pour visualiser la fluorescence du Cy3, le laser est réglé sur la longueur d'onde 532 nm. La fluorescence totale de chaque spot est quantifiée et une normalisation est ensuite effectuée sur les données par l'application *Normalize It*.

Afin de pouvoir comparer les activités d'incision pour les différentes lésions, il est donc nécessaire de ramener au même niveau (100 %) les différentes intensités de fluorescence obtenues pour les différents ODN avec le mélange dépourvu de lysat cellulaire. Enfin des taux de coupure de chaque ODN «lésions» sont calculés en faisant le rapport des intensités obtenues pour l'ODN lésions considéré et l'ODN témoin.

## D. Test de réparation basé sur la technique des comètes

### 1. Préparation du substrat génomique lésé

Des cellules LnCap sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 supplémenté par 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour les tests impliquant l'étude de la réparation de la 8oxoG, les cellules sont ensuite incubées par 1 µM de riboflavine (Sigma) à 37°C pendant 20 minutes et irradiées par les UVA à 10 J/cm<sup>2</sup> sur la

glace pour induire la formation de 8oxoG. Pour les tests impliquant l'étude de la réparation des photoproduits, les cellules sont irradiées par une dose de 10 J/cm<sup>2</sup>. Pour les deux types de substrat, le taux de dommages à l'ADN est vérifié par HPLC/MS-MS. Les cellules sont alors collectées par trypsination, resuspendues dans du milieu de culture (RPMI-1640, SVF 20% et DMSO 10%) à 5.10<sup>5</sup> cellules par mL, pour être finalement conservées dans l'azote liquide.

## **2. Préparation des extraits totaux**

Des aliquots congelés dans l'azote liquide correspondant aux lignées mock et APP751, ayant subi un stress métallique, oxydant ou ayant été exposées aux UVC sont centrifugées à 300 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé, fournissant à un culot sec, alors brièvement plongé dans l'azote liquide et resuspendu par 33 µL de tampon d'extraction (45 mM HEPES, 0,4 M KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0,1 mM DTT, and 0,25x Triton, pH 7.8). Le mélange est alors vortexé pendant 30 secondes, incubé pendant 5 minutes sur la glace et centrifugé à 14000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est alors ajouté à raison d'un rapport 1 :5 dans du tampon de réaction (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA and 0,2 mg/mL BSA, pH 8).

## **3. Mesure des capacités de réparation de l'ADN**

Le principe de la méthode repose sur le fait que les enzymes de réparation présentes dans les extraits cellulaires reconnaissent l'ADN du substrat endommagé.

Les processus de réparation conduisent à l'incision du substrat génomique lésé, et induisent des cassures simple brin qui peuvent être quantifiées par la technique des comètes en condition alcaline.

Des culots congelés de LnCap endommagées sont repris par 0,6% d'agarose low-melt. Le mélange est déposé sur lame de microscope, préalablement recouverte par 1% d'agarose de

routine. Une fois l'agarose solidifié par une incubation sur la glace, les lames sont immergées dans une solution de lyse (voir partie comète) sur la nuit à 4°C.

Les lames sont alors neutralisées et équilibrées dans du tampon de réaction (3 incubation de 5 minutes dans 40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0.5 mM EDTA, and 2 mg/mL BSA, pH 8). Un total de 50 µL d'extraits cellulaires (mock et APP751, stressées ou non) sont déposés sur chaque lame, recouverts d'une lamelle et incubés pendant 30 minutes à 37°C. En temps que contrôles positifs, l'enzyme fpg (pour les substrats contenant de la 8oxoG) ou l'enzyme T4 endonucléase (pour les substrats contenant des photoproduits) sont utilisés à raison de 100 µL par lame. Un mélange des tampons d'extraction et de réaction est utilisé en contrepartie en tant que contrôle négatif.

A l'issue de la digestion, les lames sont transférées dans un bac d'électrophorèse, et recouvertes par un tampon d'électrophorèse (voir partie comète) préalablement refroidi à 4°C. Les lames sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes, et l'électrophorèse est réalisée pendant 30 minutes à 25 V et 300 mA. A l'issue de la migration, les lames sont rincées dans du tampon de neutralisation (voir partie comète 3 lavages de 5 minutes) et marquées au BEt.



Tableau 4 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour les expériences de qPCR en temps réel. Tf : température de fusion (°C) ; pb : paires de bases.

	Efficacité (%)	N° d'accès Genbank	Amorce Forward	Tf	Amorce Reverse	Tf	Taille amplicon (pb)
<b>APE1</b>	92,3	<a href="#">NM_001641.2</a>	gctgcctggactctctcatc	60,1	gctgttaccagcacaaacga	59,91	180
<b>CSA</b>	107,5	<a href="#">NM_000082.3</a>	cggtgtgaggacacgatatg	59,98	cacaccatctgaaccacctg	60	218
<b>CSB</b>	102,3	<a href="#">NM_000124.2</a>	gaaacggcagaagaagtgc	60	aatcgtcctccagcttcaga	59,95	224
<b>CycloA</b>	102,3	<a href="#">NM_021130.3</a>	ttcatctgcactccaagac	59,99	tcgagttgtccacagtcagc	60,03	158
<b>CycloB</b>	99,5	<a href="#">NM_000942.4</a>	gcaagatcgaggaggagaag	59,95	ctgtggaatgtgaggggagt	59,96	171
<b>DDB1</b>	102,1	<a href="#">NM_001923.3</a>	aacagagtgaggagagcatt	60,02	tcaatgacatgcagctcctc	59,95	223
<b>DDB2</b>	107,1	<a href="#">NM_000107.2</a>	tcaaggacaaccacccttc	59,94	gtgaccaccattcggctact	60	226
<b>DNAPKcs</b>	95,0	<a href="#">NM_006904.6</a>	catggaagaagatcccaga	60	tgggcacaccactttaacaa	60	198

<b>ERCC1</b>	95,1	<a href="#">NM_0202001.1</a>	tgtccaggtaggatgtaaaa	59,94	gctggtttctgctcatagcc	59,98	151
<b>GAPDH</b>	94,8	<a href="#">NM_002046.3</a>	gagtcaacgatttggtcgt	59,97	ttgattttggaggatctcg	60,01	238
<b>Ku70-Binding Protein</b>	93,1	<a href="#">NM_033276.2</a>	gacgtggagacaatccat	60,08	gcacgacaatgatcaaatgc	60,09	234
<b>Ku80/XRCC5</b>	90,6	<a href="#">NM_021141.3</a>	ccccaattcagcagcatatt	59,92	ccttcagccagactggagac	59,99	235
<b>Lig1</b>	106,2	<a href="#">NM_000234.1</a>	aggagtggaatggagtggg	59,96	aggtgtcagagaggggaagca	59,99	207
<b>Lig3</b>	99,1	<a href="#">NM_013975.2</a>	gctcagcagagatggttc	59,96	tctaggtcccgtgccatatac	59,92	160
<b>Lig4</b>	102,4	<a href="#">NM_002312.3</a>	ggacgatttctcccgtttt	60,3	gcggtgatgaatcttctcgt	60,23	186
<b>Mlh1</b>	109,7	<a href="#">NM_000249.2</a>	gtgctggcaatcaggagccc	66	cacggttaggcattgggtag	66	215
<b>MPS1</b>	104,4	<a href="#">NM_000534.4</a>	gctggcaacagttcactcctt	66	agccttgataccctcccgtt	66	174
<b>MRE11</b>	95,9	<a href="#">NM_005591.3</a>	cccagaggagctgactgac	59,99	ttcatttctctgggcaagtc	60,05	180

<b>Msh3</b>	97,4	<a href="#">NM_002439.2</a>	gagagtaataataattaccg	58	aggcaatggcaattccatca	54	305
<b>Msh6/GTPB</b>	97,3	<a href="#">NM_000179.2</a>	ccctcagccaccaaaagaagca	66	ctgccaccacttcctcatccc	68	288
<b>MutT</b>	97,8	<a href="#">NM_002452.3</a>	ggccagatcgtgtttgagtt	60,12	gtcctgaccctggaaacttga	60,09	228
<b>MutYH/MYH</b>	98,7	<a href="#">NM_012222.2</a>	ccagagatggagcaggaac	59,99	ttctggggaagtgtaccac	59,94	156
<b>Nbs1</b>	104,8	<a href="#">NM_002485.4</a>	ttggttgcattgctcttcttgg	59,99	ggctgcttcttggactcaac	60	233
<b>OGG1</b>	99,1	<a href="#">NM_002542.5</a>	tgg aag aac agg gcg ggc ta	64	atggacatccaccgggcacag	64	164
<b>PARP1</b>	93,0	<a href="#">NM_001618.3</a>	gctcctgaacaatgcagaca	59,99	cattgtgtgtggttgcattga	60	233
<b>polB</b>	105,2	<a href="#">NM_002690.1</a>	gagaagaacgtgagccaagc	60,14	cgtatcatcctgccgaatct	60,06	204
<b>Rad50</b>	98,6	<a href="#">NM_005732.2</a>	cttggatatcgaggacgat	60,06	ccagaagctggaagtaccgc	60,02	215
<b>S18</b>	98,8	<a href="#">NR_003286.2</a>	aacgtctgccctatcaacttt	60	tggatgtggtagcggttttct	62	117

<b>UNG</b>	101,7	<a href="#">NM_080911.1</a>	aatggcagctgtatccaacc	59,96	cacccaacatctgtcactg	60	247
<b>XPA</b>	106,0	<a href="#">NM_000380.3</a>	gcagcccaagataattga	60,04	tggcaaatcaaaagtgttca	60,09	183
<b>XPB/ERC3</b>	94,4	<a href="#">NM_000122.1</a>	gcgagagattcttgtag	59,98	ggcccagacatagaactca	60,07	235
<b>XPC</b>	106,3	<a href="#">NM_004628.4</a>	ccatgaggacacacaagg	60	tccaatgaaccacttcacca	59,94	187
<b>XPD/ERC2</b>	96,0	<a href="#">NM_000400.3</a>	gctggacatctacccaaga	60,07	ccggatcacagcaatctct	59,92	166
<b>XRCC1</b>	107,8	<a href="#">NM_006297.2</a>	cagccctacagaaggactc	60,01	gctgtactggggatgtctt	60,12	209
<b>XRCC4</b>	95,1	<a href="#">NM_003401.3</a>	catttgtcaggagcagga	59,83	tctgcaggtgtctatcttg	59,99	219

## Bibliographie

- Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor and G. R. Stark (1995). "p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8493-7.
- Almeida, K. H. and R. W. Sobol (2007). "A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification." DNA Repair (Amst) **6**(6): 695-711.
- Alzheimer's (2010). World Alzheimer Report 2010, Alzheimer's disease international.
- Alzheimer, A. (1907). "Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie **64**: 146-148.
- Arendt, T., L. Rodel, U. Gartner and M. Holzer (1996). "Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease." Neuroreport **7**(18): 3047-9.
- Atwood, C. S., X. Huang, R. D. Moir, R. E. Tanzi and A. I. Bush (1999). "Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Met Ions Biol Syst **36**: 309-64.
- Avery, O. T., C. M. Macleod and M. McCarty (1944). "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii." J Exp Med **79**(2): 137-58.
- Bagchi, S. and P. Raychaudhuri (2010). "Damaged-DNA Binding Protein-2 Drives Apoptosis Following DNA Damage." Cell Div **5**: 3.
- Balajee, A. S. and V. A. Bohr (2000). "Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair." Gene **250**(1-2): 15-30.
- Barakat, B. M., Q. E. Wang, C. Han, K. Milum, D. T. Yin, Q. Zhao, G. Wani, S. A. Arafa el, M. A. El-Mahdy and A. A. Wani (2010). "Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis." Int J Cancer **127**(4): 977-88.
- Barghorn, S. and E. Mandelkow (2002). "Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments." Biochemistry **41**(50): 14885-96.
- Beal, M. F. (1995). "Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases." Ann Neurol **38**(3): 357-66.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." Cell **77**(6): 817-27.
- Bergeron, F., F. Auvre, J. P. Radicella and J. L. Ravanat (2010). "HO\* radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5528-33.
- Bernardes de Jesus, B. M., M. Bjoras, F. Coin and J. M. Egly (2008). "Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC." Mol Cell Biol **28**(23): 7225-35.
- Bernstein, C. and V. Johns (1989). "Sexual reproduction as a response to H2O2 damage in Schizosaccharomyces pombe." J Bacteriol **171**(4): 1893-7.
- Bhakat, K. K., A. K. Mantha and S. Mitra (2009). "Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein." Antioxid Redox Signal **11**(3): 621-38.
- Blennow, K. and H. Hampel (2003). "CSF markers for incipient Alzheimer's disease." Lancet Neurol **2**(10): 605-13.
- Boerrigter, M. E., C. M. van Duijn, E. Mullaart, P. Eikelenboom, C. M. van der Togt, D. L. Knook, A. Hofman and J. Vijg (1991). "Decreased DNA repair capacity in

- familial, but not in sporadic Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **12**(4): 367-70.
- Boerrigter, M. E., J. Y. Wei and J. Vijg (1992). "DNA repair and Alzheimer's disease." J Gerontol **47**(6): B177-84.
- Borges, H. L., R. Linden and J. Y. Wang (2008). "DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system." Cell Res **18**(1): 17-26.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-59.
- Bramblett, G. T., M. Goedert, R. Jakes, S. E. Merrick, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1993). "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding." Neuron **10**(6): 1089-99.
- Brand, M. D. (2010). "The sites and topology of mitochondrial superoxide production." Exp Gerontol **45**(7-8): 466-72.
- Brasnjevic, I., P. R. Hof, H. W. Steinbusch and C. Schmitz (2008). "Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1087-97.
- Bravard, A., M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe and J. P. Radicella (2009). "Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity." Cancer Res **69**(8): 3642-9.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Radic Biol Med **18**(6): 1033-77.
- Brooks, P. J. (2002). "DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications." Mutat Res **509**(1-2): 93-108.
- Brooks, P. J., T. F. Cheng and L. Cooper (2008). "Do all of the neurologic diseases in patients with DNA repair gene mutations result from the accumulation of DNA damage?" DNA Repair (Amst) **7**(6): 834-48.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa and D. J. Chen (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-7.
- Buschta-Hedayat, N., T. Buterin, M. T. Hess, M. Missura and H. Naegeli (1999). "Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6090-5.
- Bush, A. I., C. L. Masters and R. E. Tanzi (2003). "Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11193-4.
- Busser, J., D. S. Geldmacher and K. Herrup (1998). "Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain." J Neurosci **18**(8): 2801-7.
- Buterin, T., C. Meyer, B. Giese and H. Naegeli (2005). "DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix." Chem Biol **12**(8): 913-22.
- Butterfield, D. A., J. Drake, C. Pocernich and A. Castegna (2001). "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide." Trends Mol Med **7**(12): 548-54.
- Cadet, J., T. Douki and J. L. Ravanat (2010). "Oxidatively generated base damage to cellular DNA." Free Radic Biol Med **49**(1): 9-21.
- Cadet, J., E. Sage and T. Douki (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17.
- Camu, W. and N. Chevassus-au-Louis (2003). Quand meurent les Neurones.

- Candeias, S., K. Muegge and S. K. Durum (1997). "IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic actions." *Immunity* **6**(5): 501-8.
- Catala, A. (2009). "Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions." *Chem Phys Lipids* **157**(1): 1-11.
- Chatgialoglu, C., C. Ferreri and M. A. Terzidis (2011). "Purine 5',8-cyclonucleoside lesions: chemistry and biology." *Chem Soc Rev* **40**(3): 1368-82.
- Clippingdale, A. B., J. D. Wade and C. J. Barrow (2001). "The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease." *J Pept Sci* **7**(5): 227-49.
- Courdavault, S., C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet and T. Douki (2004). "Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells." *Mutat Res* **556**(1-2): 135-42.
- D'Errico, M., E. Parlanti, M. Teson, B. M. de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, P. Jaruga, M. Bjoras, M. Crescenzi, A. M. Pedrini, J. M. Egly, G. Zambruno, M. Stefanini, M. Dizdaroglu and E. Dogliotti (2006). "New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage." *EMBO J* **25**(18): 4305-15.
- D'Errico, M., E. Parlanti, M. Teson, P. Degan, T. Lemma, A. Calcagnile, I. Iavarone, P. Jaruga, M. Ropolo, A. M. Pedrini, D. Orioli, G. Frosina, G. Zambruno, M. Dizdaroglu, M. Stefanini and E. Dogliotti (2007). "The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells." *Oncogene* **26**(30): 4336-43.
- Dahm, R. (2008). "Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research." *Hum Genet* **122**(6): 565-81.
- David, S. S., V. L. O'Shea and S. Kundu (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." *Nature* **447**(7147): 941-50.
- Davies, K. J. (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life." *Biochem Soc Symp* **61**: 1-31.
- Davydov, V., L. A. Hansen and D. A. Shackelford (2003). "Is DNA repair compromised in Alzheimer's disease?" *Neurobiol Aging* **24**(7): 953-68.
- De Leon, M. J., A. E. George, J. Golomb, C. Tarshish, A. Convit, A. Kluger, S. De Santi, T. McRae, S. H. Ferris, B. Reisberg, C. Ince, H. Rusinek, M. Bobinski, B. Quinn, D. C. Miller and H. M. Wisniewski (1997). "Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **18**(1): 1-11.
- De Strooper, B. and J. Woodgett (2003). "Alzheimer's disease: Mental plaque removal." *Nature* **423**(6938): 392-3.
- de Waard, H., J. de Wit, J. O. Andressoo, C. T. van Oostrom, B. Riis, A. Weimann, H. E. Poulsen, H. van Steeg, J. H. Hoeijmakers and G. T. van der Horst (2004). "Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage." *Mol Cell Biol* **24**(18): 7941-8.
- Deane, R., A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman and B. V. Zlokovic (2008). "apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain." *J Clin Invest* **118**(12): 4002-13.
- Dianov, G., C. Bischoff, J. Piotrowski and V. A. Bohr (1998). "Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts." *J Biol Chem* **273**(50): 33811-6.
- Dickerson, B. C., T. R. Stoub, R. C. Shah, R. A. Sperling, R. J. Killiany, M. S. Albert, B. T. Hyman, D. Blacker and L. Detolledo-Morrell (2011). "Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults." *Neurology* **76**(16): 1395-402.



- DiRuggiero, J., J. R. Brown, A. P. Bogert and F. T. Robb (1999). "DNA repair systems in archaea: mementos from the last universal common ancestor?" J Mol Evol **49**(4): 474-84.
- Doetsch, P. W. and R. P. Cunningham (1990). "The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases." Mutat Res **236**(2-3): 173-201.
- Donahue, B. A., M. Augot, S. F. Bellon, D. K. Treiber, J. H. Toney, S. J. Lippard and J. M. Essigmann (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**(24): 5872-80.
- Doraiswamy, P. M. and A. E. Finefrock (2004). "Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders." Lancet Neurol **3**(7): 431-4.
- Douki, T., J. Riviere and J. Cadet (2002). "DNA tandem lesions containing 8-oxo-7,8-dihydroguanine and formamido residues arise from intramolecular addition of thymine peroxy radical to guanine." Chem Res Toxicol **15**(3): 445-54.
- Dragileva, E., A. Hendricks, A. Teed, T. Gillis, E. T. Lopez, E. C. Friedberg, R. Kucherlapati, W. Edelmann, K. L. Lunetta, M. E. Macdonald and V. C. Wheeler (2008). "Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes." Neurobiol Dis.
- Drapkin, R., J. T. Reardon, A. Ansari, J. C. Huang, L. Zawel, K. Ahn, A. Sancar and D. Reinberg (1994). "Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II." Nature **368**(6473): 769-72.
- Dreses-Werringloer, U., J. C. Lambert, V. Vingtdeux, H. Zhao, H. Vais, A. Siebert, A. Jain, J. Koppel, A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, F. Pasquier, D. Galimberti, E. Scarpini, D. Mann, C. Lendon, D. Campion, P. Amouyel, P. Davies, J. K. Foskett, F. Campagne and P. Marambaud (2008). "A polymorphism in CALHM1 influences Ca<sup>2+</sup> homeostasis, Aβ levels, and Alzheimer's disease risk." Cell **133**(7): 1149-61.
- Drummond, J. T. and A. Bellacosa (2001). "Human DNA mismatch repair in vitro operates independently of methylation status at CpG sites." Nucleic Acids Res **29**(11): 2234-43.
- Dusinska, M., Z. Dzapinkova, L. Wsolova, V. Harrington and A. R. Collins (2006). "Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study." Mutagenesis **21**(3): 205-11.
- Edelberg, H. K. and J. Y. Wei (1996). "The biology of Alzheimer's disease." Mech Ageing Dev **91**(2): 95-114.
- Evans, E., J. G. Moggs, J. R. Hwang, J. M. Egly and R. D. Wood (1997). "Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors." EMBO J **16**(21): 6559-73.
- Faller, E. M., S. M. Sugden, M. J. McVey, J. A. Kakal and P. A. MacPherson (2010). "Soluble HIV Tat protein removes the IL-7 receptor alpha-chain from the surface of resting CD8 T cells and targets it for degradation." J Immunol **185**(5): 2854-66.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Fernandez, M., A. L. Gobartt and M. Balana (2010). "Behavioural symptoms in patients with Alzheimer's disease and their association with cognitive impairment." BMC Neurol **10**: 87.
- Ferreira, P. C., A. Piai Kde, A. M. Takayanagui and S. I. Segura-Munoz (2008). "Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease." Rev Lat Am Enfermagem **16**(1): 151-7.



- Fishel, M. L., M. R. Vasko and M. R. Kelley (2007). "DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?" Mutat Res **614**(1-2): 24-36.
- Fortini, P. and E. Dogliotti (2007). "Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways." DNA Repair (Amst) **6**(4): 398-409.
- Fortini, P., E. Parlanti, O. M. Sidorkina, J. Laval and E. Dogliotti (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." J Biol Chem **274**(21): 15230-6.
- Fortini, P., B. Pascucci, E. Parlanti, R. W. Sobol, S. H. Wilson and E. Dogliotti (1998). "Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells." Biochemistry **37**(11): 3575-80.
- Fousteri, M. and L. H. Mullenders (2008). "Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects." Cell Res **18**(1): 73-84.
- Franklin, R. E. and R. G. Gosling (1953). "Molecular configuration in sodium thymonucleate." Nature **171**(4356): 740-1.
- Frelon, S., T. Douki, A. Favier and J. Cadet (2003). "Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide." Chem Res Toxicol **16**(2): 191-7.
- Friedberg, E. C., L. D. McDaniel and R. A. Schultz (2004). "The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis." Curr Opin Genet Dev **14**(1): 5-10.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz and T. Ellenberger (2006). DNA Repair And Mutagenesis, American Society for Microbiology.
- Gabbita, S. P., M. A. Lovell and W. R. Markesbery (1998). "Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease." J Neurochem **71**(5): 2034-40.
- Gao, Y., Y. Sun, K. M. Frank, P. Dikkes, Y. Fujiwara, K. J. Seidl, J. M. Sekiguchi, G. A. Rathbun, W. Swat, J. Wang, R. T. Bronson, B. A. Malynn, M. Bryans, C. Zhu, J. Chaudhuri, L. Davidson, R. Ferrini, T. Stamato, S. H. Orkin, M. E. Greenberg and F. W. Alt (1998). "A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis." Cell **95**(7): 891-902.
- Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
- Goldschneider, D., E. Blanc, G. Raguenez, M. Barrois, A. Legrand, G. Le Roux, H. Haddada, J. Benard and S. Douc-Rasy (2004). "Differential response of p53 target genes to p73 overexpression in SH-SY5Y neuroblastoma cell line." J Cell Sci **117**(Pt 2): 293-301.
- Grober, E., H. Buschke, H. Crystal, S. Bang and R. Dresner (1988). "Screening for dementia by memory testing." Neurology **38**(6): 900-3.
- Group, A. W. (1998). "Consensus report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group." Neurobiol Aging **19**(2): 109-16.
- Hahm, S. H., J. H. Park, S. I. Ko, Y. R. Lee, I. S. Chung, J. H. Chung, L. W. Kang and Y. S. Han "Knock-down of human MutY homolog (hMYH) decreases phosphorylation of checkpoint kinase 1 (Chk1) induced by hydroxyurea and UV treatment." BMB Rep **44**(5): 352-7.
- Hamdi, M., J. Kool, P. Cornelissen-Steijger, F. Carlotti, H. E. Popeijus, C. van der Burt, J. M. Janssen, A. Yasui, R. C. Hoeben, C. Terleth, L. H. Mullenders and

- H. van Dam (2005). "DNA damage in transcribed genes induces apoptosis via the JNK pathway and the JNK-phosphatase MKP-1." *Oncogene* **24**(48): 7135-44.
- Hanawalt, P. C. and G. Spivak (2008). "Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12): 958-70.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**: 154-9.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Hayashi, M., S. Araki, J. Kohyama, K. Shioda and R. Fukatsu (2005). "Oxidative nucleotide damage and superoxide dismutase expression in the brains of xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome." *Brain Dev* **27**(1): 34-8.
- Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra (2008). "Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells." *Cell Res* **18**(1): 27-47.
- Hermon, M., N. Cairns, J. M. Egly, A. Fery, O. Labudova and G. Lubec (1998). "Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **251**(1): 45-8.
- Herrup, K. (2010). "Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis." *J Neurosci* **30**(50): 16755-62.
- Herrup, K., R. Neve, S. L. Ackerman and A. Copani (2004). "Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death." *J Neurosci* **24**(42): 9232-9.
- Herrup, K. and Y. Yang (2007a). "Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?" *Nat Rev Neurosci* **8**(5): 368-78.
- Herrup, K. and Y. Yang (2007b). "Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology?" *Nature reviews. Neuroscience* **8**(5): 368-78.
- Hershey, A. D. and M. Chase (1952). "Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage." *J Gen Physiol* **36**(1): 39-56.
- Hill, J. W., J. J. Hu and M. K. Evans (2008). "OGG1 is degraded by calpain following oxidative stress and cisplatin exposure." *DNA Repair (Amst)* **7**(4): 648-54.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-74.
- Hoshi, M., M. Sato, S. Matsumoto, A. Noguchi, K. Yasutake, N. Yoshida and K. Sato (2003). "Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11): 6370-5.
- Huber, A., P. Bai, J. M. de Murcia and G. de Murcia (2004). "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1103-8.
- Hwang, J. T., K. A. Tallman and M. M. Greenberg (1999). "The reactivity of the 2-deoxyribonolactone lesion in single-stranded DNA and its implication in reaction mechanisms of DNA damage and repair." *Nucleic Acids Res* **27**(19): 3805-10.
- Hynd, M. R., H. L. Scott and P. R. Dodd (2004). "Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Neurochem Int* **45**(5): 583-95.
- Iida, T., A. Furuta, K. Nishioka, Y. Nakabeppu and T. Iwaki (2002). "Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain." *Acta Neuropathol* **103**(1): 20-5.
- Jack, C. R., Jr., D. W. Dickson, J. E. Parisi, Y. C. Xu, R. H. Cha, P. C. O'Brien, S. D. Edland, G. E. Smith, B. F. Boeve, E. G. Tangalos, E. Kokmen and R. C. Petersen (2002). "Antemortem MRI findings correlate with hippocampal neuropathology in typical aging and dementia." *Neurology* **58**(5): 750-7.

- Jacobsen, E., T. Beach, Y. Shen, R. Li and Y. Chang (2004). "Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains." Brain Res Mol Brain Res **128**(1): 1-7.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis." Ann N Y Acad Sci **695**: 144-8.
- Jay, V. (2001). "Gregor Johann Mendel." Arch Pathol Lab Med **125**(3): 320-1.
- Jayaraman, L., K. G. Murthy, C. Zhu, T. Curran, S. Xanthoudakis and C. Prives (1997). "Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53." Genes Dev **11**(5): 558-70.
- Jones, S. K., L. E. Nee, L. Sweet, R. J. Polinsky, J. D. Bartlett, W. G. Bradley and S. H. Robison (1989). "Decreased DNA repair in familial Alzheimer's disease." Mutat Res **219**(4): 247-55.
- Kadioglu, E., S. Sardas, S. Aslan, E. Isik and A. Esat Karakaya (2004). "Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease." Biomarkers **9**(2): 203-9.
- Kanwisher, N. (2010). "Functional specificity in the human brain: a window into the functional architecture of the mind." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11163-70.
- Kaufmann, W. K. and R. S. Paules (1996). "DNA damage and cell cycle checkpoints." FASEB J **10**(2): 238-47.
- Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman and C. G. Glabe (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." Science **300**(5618): 486-9.
- Klein, W. L., G. A. Krafft and C. E. Finch (2001). "Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum?" Trends Neurosci **24**(4): 219-24.
- Klungland, A. and T. Lindahl (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." EMBO J **16**(11): 3341-8.
- Koch, H., K. P. Wittern and J. Bergemann (2001). "In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation." J Invest Dermatol **117**(4): 892-7.
- Kraemer, K. H., N. J. Patronas, R. Schiffmann, B. P. Brooks, D. Tamura and J. J. DiGiovanna (2007). "Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship." Neuroscience **145**(4): 1388-96.
- Krokan, H. E., H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei and G. Slupphaug (2000). "Base excision repair of DNA in mammalian cells." FEBS Lett **476**(1-2): 73-7.
- Kruman, II, E. Schwartz, Y. Kruman, R. G. Cutler, X. Zhu, N. H. Greig and M. P. Mattson (2004a). "Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis." J Biol Chem **279**(42): 43952-60.
- Kruman, II, R. P. Wersto, F. Cardozo-Pelaez, L. Smilenov, S. L. Chan, F. J. Chrest, R. Emokpae, Jr., M. Gorospe and M. P. Mattson (2004b). "Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage." Neuron **41**(4): 549-61.
- Kusumoto, R., C. Masutani, K. Sugawara, S. Iwai, M. Araki, A. Uchida, T. Mizukoshi and F. Hanaoka (2001). "Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro." Mutat Res **485**(3): 219-27.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft and W. L. Klein (1998). "Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6448-53.

- Leissring, M. A., M. P. Murphy, T. R. Mead, Y. Akbari, M. C. Sugarman, M. Jannatipour, B. Anliker, U. Muller, P. Saftig, B. De Strooper, M. S. Wolfe, T. E. Golde and F. M. LaFerla (2002). "A physiologic signaling role for the gamma - secretase-derived intracellular fragment of APP." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4697-702.
- Leuner, B. and E. Gould (2010). "Structural plasticity and hippocampal function." Annu Rev Psychol **61**: 111-40, C1-3.
- Lezza, A. M., P. Mecocci, A. Cormio, M. F. Beal, A. Cherubini, P. Cantatore, U. Senin and M. N. Gadaleta (1999). "Mitochondrial DNA 4977 bp deletion and OH8dG levels correlate in the brain of aged subjects but not Alzheimer's disease patients." FASEB J **13**(9): 1083-8.
- Liu, Q., H. Kawai and D. K. Berg (2001). "beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4734-9.
- Liu, Y., H. I. Kao and R. A. Bambara (2004a). "Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism." Annu Rev Biochem **73**: 589-615.
- Liu, Y. and S. C. West (2004b). "Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 937-44.
- Lovell, M. A., S. P. Gabbita and W. R. Markesbery (1999). "Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF." J Neurochem **72**(2): 771-6.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease." Nucleic Acids Res **35**(22): 7497-504.
- Lovell, M. A., J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell and W. R. Markesbery (1998). "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." J Neurol Sci **158**(1): 47-52.
- Lovell, M. A., C. Xie and W. R. Markesbery (2000). "Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain." Brain Res **855**(1): 116-23.
- Low, G. K., E. D. Fok, A. P. Ting and M. P. Hande (2008). "Oxidative damage induced genotoxic effects in human fibroblasts from Xeroderma Pigmentosum group A patients." Int J Biochem Cell Biol **40**(11): 2583-95.
- Lu, D. C., S. Rabizadeh, S. Chandra, R. F. Shayya, L. M. Ellerby, X. Ye, G. S. Salvesen, E. H. Koo and D. E. Bredesen (2000). "A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor." Nat Med **6**(4): 397-404.
- Lu, T., Y. Pan, S. Y. Kao, C. Li, I. Kohane, J. Chan and B. A. Yankner (2004). "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain." Nature **429**(6994): 883-91.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel and J. Rogers (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-62.
- Lyras, L., N. J. Cairns, A. Jenner, P. Jenner and B. Halliwell (1997). "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease." J Neurochem **68**(5): 2061-9.
- Maga, G. and U. Hubscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." J Cell Sci **116**(Pt 15): 3051-60.
- Maillard, O., U. Camenisch, K. B. Blagoev and H. Naegeli (2008). "Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair." Mutat Res **658**(3): 271-86.

- Mao, G., X. Pan, B. B. Zhu, Y. Zhang, F. Yuan, J. Huang, M. A. Lovell, M. P. Lee, W. R. Markesbery, G. M. Li and L. Gu (2007). "Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease." Nucleic Acids Res **35**(8): 2759-66.
- Markesbery, W. R. (1997). "Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease." Free Radic Biol Med **23**(1): 134-47.
- Martin, L. J. (2008). "DNA damage and repair: relevance to mechanisms of neurodegeneration." J Neuropathol Exp Neurol **67**(5): 377-87.
- Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-132.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-9.
- Mattson, M. P., M. A. Lovell, K. Furukawa and W. R. Markesbery (1995). "Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons." J Neurochem **65**(4): 1740-51.
- McLean, C. A., R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush and C. L. Masters (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Ann Neurol **46**(6): 860-6.
- McShea, A., P. L. Harris, K. R. Webster, A. F. Wahl and M. A. Smith (1997). "Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease." Am J Pathol **150**(6): 1933-9.
- Mecocci, P., U. MacGarvey and M. F. Beal (1994). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease." Ann Neurol **36**(5): 747-51.
- Mecocci, P., M. C. Polidori, T. Ingegneri, A. Cherubini, F. Chionne, R. Cecchetti and U. Senin (1998). "Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients." Neurology **51**(4): 1014-7.
- Mellon, I., V. A. Bohr, C. A. Smith and P. C. Hanawalt (1986). "Preferential DNA repair of an active gene in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 8878-82.
- Meselson, M. and F. W. Stahl (1958). "The Replication of DNA in Escherichia Coli." Proc Natl Acad Sci U S A **44**(7): 671-82.
- Migliore, L. and F. Coppede (2008). "Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases." Mutat Res.
- Migliore, L., I. Fontana, F. Trippi, R. Colognato, F. Coppede, G. Tognoni, B. Nucciarone and G. Siciliano (2005). "Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients." Neurobiol Aging **26**(5): 567-73.
- Mitra, S., I. Boldogh, T. Izumi and T. K. Hazra (2001). "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage." Environ Mol Mutagen **38**(2-3): 180-90.
- Mitra, S., T. K. Hazra, R. Roy, S. Ikeda, T. Biswas, J. Lock, I. Boldogh and T. Izumi (1997). "Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells." Mol Cells **7**(3): 305-12.
- Moreira, P. I., A. Nunomura, M. Nakamura, A. Takeda, J. C. Shenk, G. Aliev, M. A. Smith and G. Perry (2008). "Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease." Free Radic Biol Med **44**(8): 1493-505.
- Morocz, M., J. Kalman, A. Juhasz, I. Sinko, A. P. McGlynn, C. S. Downes, Z. Janka and I. Rasko (2002). "Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **23**(1): 47-53.



- Moser, J., M. Volker, H. Kool, S. Alekseev, H. Vrieling, A. Yasui, A. A. van Zeeland and L. H. Mullenders (2005). "The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions." DNA Repair (Amst) **4**(5): 571-82.
- Mu, D., D. S. Hsu and A. Sancar (1996). "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease." J Biol Chem **271**(14): 8285-94.
- Mu, D. and A. Sancar (1997). "Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans." J Biol Chem **272**(12): 7570-3.
- Nikolova, T., M. Ensminger, M. Loblrich and B. Kaina (2010). "Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate." DNA Repair (Amst) **9**(10): 1050-63.
- Nouspikel, T. and P. C. Hanawalt (2003). "When parsimony backfires: neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease." Bioessays **25**(2): 168-73.
- Nunomura, A., R. J. Castellani, X. Zhu, P. I. Moreira, G. Perry and M. A. Smith (2006). "Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **65**(7): 631-41.
- Nunomura, A., T. Hofer, P. I. Moreira, R. J. Castellani, M. A. Smith and G. Perry (2009). "RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders." Acta Neuropathol **118**(1): 151-66.
- Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 759-67.
- Papassotiropoulos, A., M. Fountoulakis, T. Dunckley, D. A. Stephan and E. M. Reiman (2006). "Genetics, transcriptomics, and proteomics of Alzheimer's disease." J Clin Psychiatry **67**(4): 652-70.
- Peinnequin, A., T. Poyot, A. Dib, A. Aubourg, C. Mouret and C. Demeilliers (2011). "Direct quantification of mitochondrial DNA and its 4.9-kb common deletion without DNA purification." Anal Biochem **409**(2): 298-300.
- Petrini, J. H. (2000). "The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 293-6.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, C. Prgomet and T. P. Neuvians (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." Biotechnol Lett **26**(6): 509-15.
- Podlutzky, A. J., Dianova, II, V. N. Podust, V. A. Bohr and G. L. Dianov (2001). "Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA." Embo J **20**(6): 1477-82.
- Puch, C. B., E. Barbier, A. Kraut, Y. Coute, J. Fuchs, A. Buhot, T. Livache, M. Seve, A. Favier, T. Douki, D. Gasparutto, S. Sauvaigo and J. Breton (2011). "TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs." Arch Biochem Biophys **507**(2): 296-303.
- Rao, R. V. and D. E. Bredesen (2004). "Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 653-62.
- Rass, U., I. Ahel and S. C. West (2007a). "Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways." J Biol Chem **282**(13): 9469-74.
- Rass, U., I. Ahel and S. C. West (2007b). "Defective DNA repair and neurodegenerative disease." Cell **130**(6): 991-1004.

- Rass, U., I. Ahel and S. C. West (2008). "Molecular mechanism of DNA deadenylation by the neurological disease protein aprataxin." J Biol Chem **283**(49): 33994-4001.
- Reardon, J. T., T. Bessho, H. C. Kung, P. H. Bolton and A. Sancar (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9463-8.
- Robbins, J. H., R. A. Brumback, M. Mendiones, S. F. Barrett, J. R. Carl, S. Cho, M. B. Denckla, M. B. Ganges, L. H. Gerber, R. A. Guthrie and et al. (1991). "Neurological disease in xeroderma pigmentosum. Documentation of a late onset type of the juvenile onset form." Brain **114** ( Pt 3): 1335-61.
- Robbins, J. H., R. J. Polinsky and A. N. Moshell (1983). "Evidence that lack of deoxyribonucleic acid repair causes death of neurons in xeroderma pigmentosum." Ann Neurol **13**(6): 682-4.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends Mol Med **12**(9): 440-50.
- Rothstein, R., B. Michel and S. Gangloff (2000). "Replication fork pausing and recombination or "gimme a break"." Genes Dev **14**(1): 1-10.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, J. G. Herman and S. B. Baylin (2001). "DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer." Oncogene **20**(24): 3156-65.
- Sakumi, K., Y. Tominaga, M. Furuichi, P. Xu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and Y. Nakabeppu (2003). "Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption." Cancer Res **63**(5): 902-5.
- San Filippo, J., P. Sung and H. Klein (2008). "Mechanism of eukaryotic homologous recombination." Annu Rev Biochem **77**: 229-57.
- Santos, N. A., C. S. Catao, N. M. Martins, C. Curti, M. L. Bianchi and A. C. Santos (2007). "Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria." Arch Toxicol **81**(7): 495-504.
- Sarazin, M., C. Berr, J. De Rotrou, C. Fabrigoule, F. Pasquier, S. Legrain, B. Michel, M. Puel, M. Volteau, J. Touchon, M. Verny and B. Dubois (2007). "Amnesic syndrome of the medial temporal type identifies prodromal AD: a longitudinal study." Neurology **69**(19): 1859-67.
- Satoh, M. and T. Kuroiwa (1991). "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell." Exp Cell Res **196**(1): 137-40.
- Sauvaigo, S., C. Petec-Calain, S. Caillat, F. Odin and J. Cadet (2002). "Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions." Anal Biochem **303**(1): 107-9.
- Scharer, O. D. (2003). "Chemistry and biology of DNA repair." Angew Chem Int Ed Engl **42**(26): 2946-74.
- Scheltens, P., N. Fox, F. Barkhof and C. De Carli (2002). "Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion." Lancet Neurol **1**(1): 13-21.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T. D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe and S. Younkin (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-70.

- Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein." *J Alzheimers Dis* **3**(1): 75-80.
- Shackelford, D. A. (2006). "DNA end joining activity is reduced in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **27**(4): 596-605.
- Shao, C., S. Xiong, G. M. Li, L. Gu, G. Mao, W. R. Markesbery and M. A. Lovell (2008). "Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain." *Free Radic Biol Med* **45**(6): 813-9.
- Shimizu, Y., S. Iwai, F. Hanaoka and K. Sugawara (2003). "Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase." *EMBO J* **22**(1): 164-73.
- Shoffner, J. M. (1997). "Oxidative phosphorylation defects and Alzheimer's disease." *Neurogenetics* **1**(1): 13-9.
- Shrivastav, M., L. P. De Haro and J. A. Nickoloff (2008). "Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice." *Cell Res* **18**(1): 134-47.
- Smith, M. A., P. L. Harris, L. M. Sayre and G. Perry (1997). "Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18): 9866-8.
- Smith, M. A., M. Rudnicka-Nawrot, P. L. Richey, D. Praprotnik, P. Mulvihill, C. A. Miller, L. M. Sayre and G. Perry (1995). "Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **64**(6): 2660-6.
- Sonnen, J. A., J. C. Breitner, M. A. Lovell, W. R. Markesbery, J. F. Quinn and T. J. Montine (2008). "Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models." *Free Radic Biol Med* **45**(3): 219-30.
- Spires, T. L. and B. T. Hyman (2005). "Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals." *NeuroRx* **2**(3): 423-37.
- Staropoli, J. F. (2008). "Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin?" *Bioessays* **30**(8): 719-27.
- Stergiou, L., R. Eberhard, K. Doukoumetzidis and M. O. Hengartner (2011). "NER and HR pathways act sequentially to promote UV-C-induced germ cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans*." *Cell Death Differ* **18**(5): 897-906.
- Stoyanova, T., N. Roy, D. Kopanja, S. Bagchi and P. Raychaudhuri (2009). "DDB2 decides cell fate following DNA damage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(26): 10690-5.
- Subbarao, K. V., J. S. Richardson and L. C. Ang (1990). "Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro." *J Neurochem* **55**(1): 342-5.
- Sugawara, K., T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai and F. Hanaoka (2001). "A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair." *Genes Dev* **15**(5): 507-21.
- Suh, Y. H. and F. Checler (2002). "Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease." *Pharmacol Rev* **54**(3): 469-525.
- Sultan, A., F. Nessler, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee and M. C. Galas (2011). "Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection." *J Biol Chem* **286**(6): 4566-75.
- Svejstrup, J. Q. (2002). "Mechanisms of transcription-coupled DNA repair." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1): 21-9.
- Tamagno, E., M. Guglielmotto, M. Aragno, R. Borghi, R. Autelli, L. Giliberto, G. Muraca, O. Danni, X. Zhu, M. A. Smith, G. Perry, D. G. Jo, M. P. Mattson and M. Tabaton (2008). "Oxidative stress activates a positive feedback between the



- gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein." J Neurochem **104**(3): 683-95.
- Tamagno, E., M. Parola, P. Bardini, A. Piccini, R. Borghi, M. Guglielmotto, G. Santoro, A. Davit, O. Danni, M. A. Smith, G. Perry and M. Tabaton (2005). "Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonal is mediated by stress-activated protein kinases pathways." J Neurochem **92**(3): 628-36.
- Tamaoka, A. (1998). "[Characterization of amyloid beta protein species in the plasma, cerebrospinal fluid and brains of patients with Alzheimer's disease]." Nippon Ronen Igakkai Zasshi **35**(4): 273-7.
- Tan, Z., L. Shi and S. S. Schreiber (2009). "Differential Expression of Redox Factor-1 Associated with Beta-Amyloid-Mediated Neurotoxicity." Open Neurosci J **3**: 26-34.
- Tan, Z., N. Sun and S. S. Schreiber (1998). "Immunohistochemical localization of redox factor-1 (Ref-1) in Alzheimer's hippocampus." Neuroreport **9**(12): 2749-52.
- Tang, J. and G. Chu (2002). "Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein." DNA Repair (Amst) **1**(8): 601-16.
- Tarantini, A., A. Maitre, E. Lefebvre, M. Marques, A. Rajhi and T. Douki (2011). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells." Toxicology **279**(1-3): 36-44.
- Tian, B., Q. Yang and Z. Mao (2009). "Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death." Nat Cell Biol **11**(2): 211-8.
- Vasko, M. R., C. Guo and M. R. Kelley (2005). "The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress." DNA Repair (Amst) **4**(3): 367-79.
- Vincent, I., M. Rosado and P. Davies (1996). "Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease?" J Cell Biol **132**(3): 413-25.
- Vingtdeux, V., M. Hamdane, M. Gompel, S. Begard, H. Drobecq, A. Ghestem, M. E. Grosjean, V. Kostanjevecki, P. Grognet, E. Vanmechelen, L. Buee, A. Delacourte and N. Sergeant (2005). "Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism." Neurobiol Dis **20**(2): 625-37.
- Walker, L. C., J. Pahnke, M. Madauss, S. Vogelgesang, A. Pahnke, E. W. Herbst, D. Stausske, R. Walther, C. Kessler and R. W. Warzok (2000). "Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of Abeta42 and then Abeta40 in the elderly." Acta Neuropathol **100**(1): 36-42.
- Wang, J., S. Xiong, C. Xie, W. R. Markesbery and M. A. Lovell (2005). "Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease." J Neurochem **93**(4): 953-62.
- Wang, X. W., W. Vermeulen, J. D. Coursen, M. Gibson, S. E. Lupold, K. Forrester, G. Xu, L. Elmore, H. Yeh, J. H. Hoeijmakers and C. C. Harris (1996). "The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway." Genes Dev **10**(10): 1219-32.
- Watanabe, K., R. G. Liberman, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum and F. P. Guengerich (2007). "Analysis of DNA adducts formed in vivo in rats and mice from 1,2-dibromoethane, 1,2-dichloroethane, dibromomethane, and dichloromethane using HPLC/accelerator mass spectrometry and relevance to risk estimates." Chem Res Toxicol **20**(11): 1594-600.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.

- Wei, Y. H. and H. C. Lee (2002). "Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging." Exp Biol Med (Maywood) **227**(9): 671-82.
- Weissman, L., D. G. Jo, M. M. Sorensen, N. C. de Souza-Pinto, W. R. Markesbery, M. P. Mattson and V. A. Bohr (2007). "Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment." Nucleic Acids Res **35**(16): 5545-55.
- Wiederhold, L., J. B. Leppard, P. Kedar, F. Karimi-Busheri, A. Rasouli-Nia, M. Weinfeld, A. E. Tomkinson, T. Izumi, R. Prasad, S. H. Wilson, S. Mitra and T. K. Hazra (2004). "AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells." Mol Cell **15**(2): 209-20.
- Wilkins, M. H., A. R. Stokes and H. R. Wilson (1953). "Molecular structure of deoxyribose nucleic acids." Nature **171**(4356): 738-40.
- Williams, R. W. and K. Herrup (1988). "The control of neuron number." Annu Rev Neurosci **11**: 423-53.
- Wood, R. D. (1997). "Nucleotide excision repair in mammalian cells." J Biol Chem **272**(38): 23465-8.
- Yang, W. (2006). "Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins." DNA Repair (Amst) **5**(6): 654-66.

Annexes

I. Article original d'Alois Alzheimer (1907) traduit en français

**TRADUCTION DE L'ARTICLE ORIGINAL  
DE Alois ALZHEIMER :  
« SUR UNE MALADIE SINGULIÈRE  
DU CORTEX »**

« A. rapporte le cas d'un malade qui fut suivi à l'asile d'aliénés de Francfort sur le Main et dont le système nerveux central lui fut adressé pour examen par le Directeur SIOLI.

*Le tableau clinique* faisait tellement exception à la règle qu'il n'était pas possible de le ranger parmi les maladies connues, le tableau anatomique donnait un résultat différent des processus pathologiques connus jusqu'à présent.

Une femme âgée de 51 ans présenta comme premiers symptômes des idées de jalousie envers son mari. Peu après, apparurent des troubles de la mémoire de progression rapide. Elle n'arrivait plus à s'orienter dans sa maison, elle laissait traîner les choses ça et là, les cachait parfois ; elle croyait qu'on voulait la tuer et se mettait à pousser des cris.

A l'asile, tout son comportement était marqué par une perplexité complète. Elle présentait une désorientation temporo-spatiale totale. Quelquefois elle faisait remarquer qu'elle ne comprenait rien et ne s'y retrouvait pas. Quelquefois, elle saluait le médecin comme s'il était un visiteur en s'excusant de n'avoir pas fini son ménage, tantôt elle se mettait à crier qu'il voulait l'ignorer ou le repoussait avec indignation comme si elle craignait qu'il attente à son honneur de femme. De temps en temps, elle délirait à un point tel qu'elle arrachait sa literie, qu'elle appelait son mari et sa fille et qu'elle semblait avoir des hallucinations auditives. Souvent elle criait pendant des heures d'une voix atroce.

En raison de son incapacité à comprendre la situation, elle se mettait à crier fort dès qu'on voulait s'approcher pour l'examiner. On n'arrivait à obtenir quelques informations qu'après de multiples efforts répétés. La mémoire était sévèrement touchée. Quand on lui montrait des objets, elle arrivait le plus souvent à les nommer correctement, mais tout de suite après, elle avait tout oublié. En lisant, elle passe d'une ligne à l'autre, elle lit en épelant, d'une façon monotone. En écrivant, elle recommence la même



syllabe à plusieurs reprises et en oublie d'autres et en général finit très vite par s'arrêter. En parlant, elle utilise souvent des phrases indiquant son embarras, ou des expressions paraphasiques (pot à lait au lieu de tasse) ; parfois on note qu'elle reste en panne de mots. Manifestement il y a des questions qu'elle ne saisit pas. Elle semble avoir oublié l'utilisation de certains objets. La marche et la coordination gestuelle ne sont pas perturbées. Les réflexes rotuliens sont présents. Les réactions pupillaires sont normales. Les artères radiales sont un peu rigides, il n'y a pas d'augmentation de la matité cardiaque ; pas d'albumine.

*Au cours de l'évolution* les symptômes interprétés comme signes de focalisation étaient tantôt plus, tantôt moins marqués mais restaient toujours modérés. Par contre, la démence globale était progressive. Après 4 ans 1/2 de maladie la patiente décédait. A la fin, elle était complètement indifférente, demeurant au lit jambes fléchies. Elle était incontinente et présentait, malgré tous les soins, des escarres de décubitus.

*L'autopsie* montrait un cerveau atrophié d'une manière régulière sans focalisation macroscopique. Les grosses artères cérébrales montraient des modifications artériosclérotiques.

Les préparations utilisant la méthode à l'argent de Bielschowsky présentent des altérations singulières des neurofibrilles. A l'intérieur d'une cellule d'aspect normal on note une ou plusieurs fibrilles caractérisées par leur largeur extrême et leur capacité particulière a été imprégnée. Ensuite, beaucoup de fibrilles voisines présentent la même altération. Puis ces fibrilles se transforment en faisceaux et apparaissent progressivement à la surface de la cellule. Enfin, le noyau et la cellule se désintègrent et il ne reste plus qu'un paquet de fibrilles agglomérées à la place d'une cellule ganglionnaire. Comme il est possible de colorer ces fibrilles par d'autres colorants que les fibrilles normales, il doit y avoir eu une transformation chimique de la substance des fibrilles. Celle-ci pourrait être à l'origine de la persistance des fibrilles après la mort de la cellule. Il semble que la transformation des fibrilles soit liée à un stockage d'un produit métabolique pathologique non encore étudié dans la cellule ganglionnaire. Environ 1/4 à 1/3 des cellules ganglionnaires du cortex présentent ces altérations. De nombreuses cellules ganglionnaires, surtout dans les couches cellulaires supérieures ont tout à fait disparu. On trouve des petits foyers miliaires disséminés dans tout le cortex et en particulier dans les couches supérieures qui sont dues au stockage d'un produit métabolique singulier dans le cortex. Cette substance est réfractaire aux colorants mais on peut la reconnaître sans préparation. La glie est formée de filaments abondants, en outre beaucoup de cellules gliales présentent de grands sacs graisseux.

Il n'y a aucune infiltration des vaisseaux. Par contre on trouve une prolifération endothéliale et, parfois, une néovascularisation.

Au total, il s'agit apparemment, selon nous, d'un processus pathologique particulier. Au cours des dernières années, de tels processus pathologiques particuliers ont été observés en nombre croissant. Cette observation nous indique qu'il ne suffit pas de nous efforcer de classer un cas de maladie dont le tableau clinique n'est pas clair dans un des groupes des maladies connues. Sans doute existe-t-il beaucoup plus de maladies psychiques que celles qui sont mentionnées dans nos manuels d'enseignement. Dans certains de ces cas, un examen histologique ultérieur montrera la particularité de tel cas.

De cette façon, nous arriverons graduellement à isoler une maladie clinique particulière parmi les grands groupes de maladies de nos manuels, et à délimiter plus précisément sa propre clinique. »

(Communication personnelle).  
Munich 1907.

## II. Communications scientifiques

⌘ Congrès « **Gene expression in neuronal diseases** », organisé par la Biochemical Society, du 16 au 18 juillet 2009, Cardiff, UK. Abstract sélectionné pour une communication orale de 15 minutes et présentation d'un poster.

⌘ Congrès « **Plasticité et Instabilité des Génomes (PIG, 5<sup>ème</sup> édition)** », organisé par un comité inter-CEA, les 5 et 6 novembre 2009, Marcoule, France. Présentation d'un poster.

⌘ Congrès « **Two Faces of Evil : Cancer and Neurodegeneration** », organisé par la Fondation IPSEN, le 26 avril 2010, Paris, France. Présentation d'un poster.

⌘ Congrès « **Plasticité et Instabilité des Génomes (PIG, 6<sup>ème</sup> édition)** », organisé par un comité inter-CEA, les 8 et 9 novembre 2010, Grenoble, France. Présentation d'un poster.

⌘ Congrès « **Molecular Basis for Neurodegeneration** », organisé par les Keystone Symposia, du 21 au 26 février 2011, Taos, NM, USA. Présentation d'un poster.

### **III. Article scientifique**

Article en révision dans le journal DNA Repair.

## **Alzheimer's disease-associated neurotoxic peptide amyloid- $\beta$ impairs base excision repair in human neuroblastoma cells**

Forestier Anne<sup>a</sup>, Douki Thierry<sup>a</sup>, Sauvaigo Sylvie<sup>a</sup>, De Rosa Viviana<sup>a</sup>, Masson-Genteuil Gwenaelle<sup>a</sup>,  
Demeilliers Christine<sup>b</sup> and Rachidi Walid<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, SCIB, UMR-E CEA / UJF-Grenoble 1, INAC,  
Grenoble, F-38054, France

<sup>b</sup> INSERM U884, UJF-Grenoble 1, Grenoble, F-38000, France

Corresponding Author: Dr. Walid RACHIDI  
CEA Grenoble  
INAC / SCIB / LAN  
17, rue des Martyrs  
38054 Grenoble cedex 9  
Tel.: +33 4 38 78 50 11  
Fax.: +33 4 38 78 50 90  
e-mail: [walid.rachidi@cea.fr](mailto:walid.rachidi@cea.fr)



## Abstract

Alzheimer's disease-associated amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide partly exerts its neurotoxicity through the generation of reactive oxygen species (ROS). We aimed at determining whether A $\beta$ -induced oxidative stress was deleterious to neurons through increased DNA damage and modulation of its repair. In this study we used two neuroblastoma cell lines either endogenously secreting A $\beta$  or its mock control. Under both basal conditions and following exposure to copper sulfate or hydrogen peroxide, we compared the extent of DNA damage, base excision repair (BER) gene expression and finally BER activities between the two cell lines. We showed that the presence of A $\beta$  in a neuroblastoma cell line led to an increase in both nuclear and mitochondrial DNA damage. Unexpectedly, a concomitant decrease in basal level of base excision repair, a major route for repairing oxidative DNA damage, was observed at the levels of both gene expression and protein activity. Moreover, addition of copper sulfate or hydrogen peroxide potentiates A $\beta$ -mediated perturbation of DNA damage/repair systems in the "A $\beta$  cell line" compared to mock. Taken together, these findings indicate that A $\beta$  could act as double-edged sword by both increasing oxidative nuclear/mitochondrial damage and preventing their repair. The synergistic effects of increased ROS production, accumulated DNA damage and impaired DNA repair could participate in, and partly explain, the massive loss of neurons observed in Alzheimer's disease since both oxidative stress and DNA damage can trigger apoptosis.

## Key words

Neurodegenerative disorders, DNA damage, DNA repair, 8oxoGuanine, OGG1, Base Excision Repair

## I. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is an age-dependent neurodegenerative disorder characterized by a progressive decline in behavior and cognition, concomitant with a massive apoptotic loss of neurons from brain regions involved in learning and memory [1]. It is becoming the main cause of dementia in developed countries

where, due to a demographic shift toward an elderly population, an increasing number of individuals are affected. The two major pathological hallmarks in AD are neurofibrillary tangles (NFTs) and senile plaques (SPs) [2]. NFTs are intracellular lesions consisting of twisted filaments of the microtubule-associated Tau protein [3], and SPs are extraneuronal aggregates composed of the amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) [4]. A $\beta$  is derived from the pathogenic proteolytic processing of the transmembrane amyloid precursor protein (APP) [5]. Mutations in APP and/or presenilins (PSEN1 and PSEN2) increase this amyloidogenic processing and represent autosomal-dominant familial cases, which account for 5 to 10% of all AD cases [6]. However, most cases of AD are sporadic, and their etiology remains unclear.

Because the brain exhibits a high oxygen consumption rate and lacks strong antioxidant defenses, it is vulnerable to oxidative stress [7]. Therefore, one unifying hypothesis suggests that oxidative processes play contributory or acceleratory roles in many of the salient features of AD (i.e., NFTs, SPs and neuronal-selective neurodegeneration). Evidence of increased oxidative stress in AD-affected brains has come from studies showing increased lipid peroxidation [8], increased carbonyl modifications of proteins [9] and increased oxidation of mitochondrial and genomic DNA [10-12]. The cumulative damage over time, especially to DNA, is thought to contribute to selective neuronal cell loss because unrepaired DNA can lead to apoptosis [13]. In addition, recent work has indicated that high levels of DNA damage in neuronal cells can activate classical cell cycle machinery and S-phase re-entry, which either promote DNA repair or initiate apoptosis [14]. Oxidative damage to DNA by reactive oxygen species (ROS) can lead to DNA-protein or DNA-DNA cross-linking, strand breaks and the generation of oxidized bases, the most common being 8-oxoguanine (8oxoG) [15]. Gabbita *et al.* [16] showed a generalized increase in the levels of purine and pyrimidine base oxidation in the DNA of AD-affected brains, highlighting the fact that 8oxoG is the most frequent of all analyzed modified bases. Another study by Lovell *et al.* [17] revealed an increase in the levels of 8oxoG in cerebrospinal fluid (CSF) from AD patients



compared to age-matched controls. Recent publications have shown significant increases in the level of oxidized purines in DNA from peripheral lymphocytes [12] and, more generally, leukocytes [18] from AD patients. It has been suggested that the accumulation of nucleic acid oxidative lesions in AD could be due not only to an increase in the production of ROS and DNA damage but also to a decreased capacity to repair the modified nucleic acids [19], especially small oxidative base lesions that are typically repaired by the base excision repair (BER) pathway. Briefly, BER is initiated by the removal of the damaged base by substrate-specific DNA *N*-glycosylases, which results in the generation of an abasic site that is subsequently cleaved by an apurinic or apyrimidic (AP) lyase or AP endonuclease [20]. Repair then proceeds either by the short-patch BER pathway, which involves the incorporation of a single nucleotide into the gap by DNA polymerase followed by strand ligation by DNA ligase, or by the long-patch BER pathway, which involves the incorporation of several nucleotides followed by cleavage of the resulting 2- to 8-nucleotide flap and ligation [21,22]. Interestingly, several BER defects have been reported in AD-affected brains. Weissman *et al.* [23] described lower 8oxoG and uracil incisions in the inferior parietal lobule (IPL) of sporadic AD patients and patients with mild cognitive impairment compared to normal age-matched controls, with a corresponding decrease in the expression levels of 8oxoG DNA glycosylase (OGG1) and uracil-DNA glycosylase (UNG). In this study, the authors also report a decrease in single gap-filling activity in the IPL and a diminished protein expression level of the associated polymerase  $\beta$  ( $\text{pol}\beta$ ). Similarly, a recent publication showed a decrease in both mitochondrial and nuclear OGG1 activities not only in the IPL but also in the frontal and temporal lobules from AD-affected patients [24]. However, another recent study reported no association between AD-like pathology and DNA repair in transgenic mice carrying the APP751 allele with the so-called double Swedish (K670M/N671L) mutation of APP ( $\text{APP}^{\text{Swe}}$ ), PSEN1<sup>M146V</sup> and Tau<sup>P301L</sup> transgenes, or the  $\text{APP}^{\text{Swe}}$  transgene alone [25].

To gain further insight into the DNA damage and repair responses related to AD, the present study investigated the effect of A $\beta$  secretion on BER gene expression levels and activity in a

neuroblastoma cell line stably transfected with human APP751, which results in an increased secretion of A $\beta$ . Here, we demonstrate that the secretion of A $\beta$  leads to an overall downregulation of BER-associated genes. Moreover, the secretion of A $\beta$  inhibits cell adaptation to a metallic or oxidative stress. BER activities were assessed in cell lysates using two different assays and were drastically decreased in response to increased A $\beta$  secretion.

## II. Materials and methods

### A. Culture of SH-SY5Y neuroblastoma cells (mock and APP751-expressing) and quantification of A $\beta$ isoforms

We used the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line either stably transfected with the empty eukaryotic expression vector pcDNA3 (mock) (Invitrogen SARL, Cergy-Pontoise, France) or containing the cDNA of human APP751 (APP751 cell line), which were kindly provided by Dr. Luc Buée [26]. Both cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Glutamax<sup>TM</sup> supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1 mM non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 (selection for cells expressing APP751 or the mock vector) in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C.

### B. Quantification of A $\beta$ isoforms

For the quantification of A $\beta$  isoforms the cell culture medium was collected in both mock and APP751-expressing cell lines, 24, 48 and 72 after plating. The media was then spun at 300 g to remove the cell debris. Concentration of A $\beta$  1-40 was determined using Colorimetric BetaMark<sup>TM</sup> x-40 ELISA Kit (Covance, Princeton, NJ, USA) and the concentration of A $\beta$  1-42 was determined using the INNOTEST<sup>TM</sup> beta-Amyloid (1-42) (Innogenetics, Ghent, Belgium).

### C. Cytotoxicity assay

Mock and APP751-expressing cells (2,500 cells per well) were plated in 96-well microtitration plates (Nunc, Dutscher, Brimath, France) in 200  $\mu$ L of medium and incubated at 37°C for 48 hours. After incubation, two stress agents were tested: hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) and copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>, Sigma). Cell lines were incubated for 24 hours at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> with 10 concentrations of each tested substance ranging from 100  $\mu$ M to 1 mM. For treatments, the cell culture media was not replaced because it would remove all of the secreted A $\beta$  from the APP751-expressing cell line. Instead, 20  $\mu$ L of 11X-concentrated solution was added to the 200  $\mu$ L already present in each well. At the end of the treatment, the spent cell culture media was replaced with 200  $\mu$ L of fresh cell culture media, and cells were incubated for another 24 hours at 37°C. At the end of the incubation, cytotoxicity was evaluated using a modified MTT (Sigma) assay [27]. Briefly, 20  $\mu$ L of MTT (5 mg/mL) in phosphate-buffered saline (PBS, Invitrogen) was added to each well. The medium was removed 2 h later, 200  $\mu$ L of DMSO (Sigma) was added to dissolve the produced formazan, and the absorbance was measured at 565 nm using a Multiskan RC microplate spectrophotometer (Labsystems, Helsinki, Finland). The absorbance at 565 nm was proportional to the number of viable cells, and survival was calculated as the percentage of specific viability. The concentration of compound leading to 10% cytotoxicity (IC<sub>10</sub>) of the mock cell line was calculated and used as a working concentration for both mock and APP751-expressing cell lines.

### D. Preparation of frozen pellets

Mock and APP751-transfected cell lines were plated in 75-cm<sup>2</sup> flasks (Becton Dickinson Biosciences, Pont-de-Claix, France) and incubated for 48 hours before treatment. Each cell line was then treated with the amount of either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or CuSO<sub>4</sub> corresponding to the IC<sub>10</sub> of the mock cell line by adding 1.5 mL of the 11X-concentrated solutions to the 15 mL of culture media already present in the flask. In control flasks, 1.5 mL of water alone was added. Cell lines were incubated for an additional 24 hours and then collected by trypsinization, recovered, counted and pelleted by centrifugation at 300 g for 10 min. The

required amount of cells for each appropriate experiment was resuspended in FCS supplemented with 10% DMSO, gently frozen to -80°C and stored in liquid nitrogen or dry-frozen.

### E. Quantification of the common deletion in mitochondrial DNA

The procedures described in the sections II.E.1 and II.E.2 were previously published [28]

#### 1. Lysate preparation

Dry-frozen pellets of Mock and APP751-expressing cell lines (1x10<sup>6</sup> cells each), treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, were disrupted using a Retsch MM 301 mixer mill (2 min, 30 Hz, 2-mm tungsten carbide bead) in 1 mL of 1X lysis buffer (Tween 20 0.005 v/v; NP40 0.05% v/v; Tris HCl 10 mM pH 8.3) and proteinase K was added to a final concentration of 0.1 mg/mL. The samples were incubated at 56°C for 30 min and the proteinase K inactivated by heating at 98°C for 15 min.

#### 2. qPCR amplification of nuclear, total mitochondrial and deleted mitochondrial DNA

Twenty  $\mu$ L of the lysate was diluted into 100 $\mu$ L of 0.5X lysis buffer and sonicated for 10 min. Again, 14  $\mu$ L of the previously diluted and sonicated lysate was diluted into 8  $\mu$ L of freshly sonicated 1X lysis buffer and 48  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (final concentration: 0.214X\_ lysis buffer). These dilution steps were made in order to homogenize the detergent present in the lysis buffer and to obtain reproducible qPCR efficiency. The LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) was used to perform qPCR analysis. Each qPCR reaction was carried out using 5 $\mu$ L of final lysate, 7 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.4  $\mu$ M for both Forward and Reverse primers (for primers sequences of GAPDH, total mitochondrial DNA (Tot. mt) and deleted mitochondrial DNA (Del. mt) see [28]). The qPCR experiments were performed on the LightCycler (Roche) and composed of a first segment of 1 cycle of 600 sec at 95°C to activate the *Taq* polymerase, a second segment of 45 cycles of 3 successive steps of 20 sec at 95°C, 5 sec at 54°C and 8 sec at 72°C and of a third and last segment of one cycle of three successive steps of 20 sec at 95°C, 30 sec at 68°C and 30 sec at 95°C to acquire the fusion

curve. GAPDH, Tot. mt and Del. mt were amplified in triplicate in the following samples: the mock and APP751-expressing cells treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and a mix of these four conditions used as a calibrator (cal). This experiment was conducted twice on two distinct biological replicates. The comparative threshold cycle method was used to perform the relative quantification. Thus, the relative abundance of each targeted sequence (GAPDH, Tot. mt and Del. mt) was calculated for each sample through the following formulas:

$$E^{\text{Ct cal(GAPDH)} - \text{Ct sample(GAPDH)}} \quad (1), \quad E^{\text{Ct cal(Tot. mt)} - \text{Ct sample(Tot. mt)}} \quad (2), \quad E^{\text{Ct cal(Del. mt)} - \text{Ct sample(Del. mt)}} \quad (3)$$

with E corresponding to the corrected PCR efficiency obtained through LinRegPCR software. Tot. mt and Del. mt were normalized to GAPDH through the (2)/(1) and (3)/(1) ratios respectively. These GAPDH-normalized values finally allowed the calculation of the Del. mt/Tot. mt ratio for each sample.

#### F. Alkaline Comet assay

The alkaline single-cell gel electrophoresis assay was used to determine the presence of single-strand breaks (SSBs) and alkali-labile sites (ALS). Additional information on the level of oxidized bases was gathered from the quantification of formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG)-sensitive sites using a modified version of the Comet assay. The assay was essentially conducted as described by Sauvaigo *et al.* [29]. Briefly, frozen pellets of mock and APP751-expressing cells treated or not by CuSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were embedded in low-melt agarose (Sigma) at 37°C (final concentration 0.6% in PBS) and spread on microscope slides coated with one dried layer of 1% normal agarose (Sigma) in PBS. After gelling on ice, the slides were immersed in a lysis solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA-Na<sub>2</sub>, 10 mM Tris, 1% sodium sarcosinate, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10; Sigma) at 4°C overnight in the dark. The slides were neutralized with three washes (5 min) in 0.4 M Tris-HCl (Sigma), pH 8, and equilibrated in the FPG digestion buffer (3 x 5 min in 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA-Na<sub>2</sub>, and 0.04 M Tris-HCl, pH 8). Digestion with FPG (1.7 µg/mL, 100 µL per slide) for the detection of oxidized purines was performed for 45 min at 37°C. Control slides were treated with the FPG digestion buffer alone.

After digestion, the slides were transferred to an electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (0.3 M NaOH and 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>) for 30 min at room temperature. Electrophoresis was performed for 30 min at 25 V and 300 mA. After migration, the slides were rinsed in neutralization buffer (3 x 5 min, room temperature). Finally, slides were stained with ethidium bromide (10 µg/mL), and comet analysis was performed using the image analysis Comet IV software (Perceptive instrument, Haverhill, UK). For each sample, the average tail intensity was determined from the analysis of 50 comets of each slide of a triplicate experiment.

#### G. Reverse transcription (RT) and real-time quantitative PCR (qPCR) analysis

Total RNA was extracted from each sample using the GenElute mammalian total RNA miniprep kit (Sigma) following the manufacturer's protocol with the optional DNase treatment step. RNA quality was assessed using native gel electrophoresis. Total RNA was considered intact if two sharp 28S and 18S rRNA bands were visualized. RNA (2 µg) from each condition was reverse-transcribed to cDNA (Superscript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase, Invitrogen), and 20 ng of each cDNA template was used in PCR reactions with gene-specific primers (supplementary data Table A). qPCR was performed in an MX3005p Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene, La Jolla, CA) using MESA Blue qPCR<sup>TM</sup> Mastermix Plus for SYBR<sup>®</sup> Assay Low ROX (Eurogentec SARL, Angers, France). The integrity of amplification, indicated by a single melt peak for each product, was verified using a dissociation curve analysis. As an endogenous control in RT-PCR analysis, we tested three different housekeeping/reference genes for optimal normalization of the target genes. 18S Ribosomal 1 (S18), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and cyclophilin B (CycloB) were amplified in triplicate in each sample and condition during the same qPCR run. Corresponding cycle threshold (Ct) values were exported to BestKeeper [30], an Excel-based pair-wise correlation tool that analyzes variability in the expression of individual genes (standard



deviation (SD) and coefficient of variation) and generates a weighted expression index (the BestKeeper Index) in the form of a geometric mean of Ct values from several candidate reference genes. Then, the correlation between each candidate and the index was calculated, describing the relationship between the index and the contributing candidate reference gene by the Pearson correlation coefficient ( $r$ ), coefficient of determination ( $r^2$ ) and the  $p$  value. Individually, S18, GAPDH and CycloB showed a SD less than 1. The analysis of the Pearson coefficient correlation showed a strong correlation for all candidates. Individual SD and Pearson coefficient correlations of the three genes were tested in each PCR run. Target gene mRNA expression was normalized to the expressed housekeeping genes S18, GAPDH and CycloB using the Relative Expression Software Tool 2006 [31], which uses the pair-wise fixed reallocation randomization test as a statistical model. Corresponding  $p$  values were analyzed to evaluate the significance of each expression ratio after each PCR run, but we used Student's t-test for comparing the means of expression ratios between two conditions after three to seven qPCR runs, which is equivalent to three to seven biological replicates, for each tested target gene.

### H. Western blot analysis

Nuclear extracts were performed as described in section 2.9.1. Protein samples, in SDS loading buffer, were electrophoretically separated by 10% SDS-PAGE and protein patterns were transferred, in Tris-glycine (25 mM Tris and 192 mM glycine) buffer containing 20% methanol, onto nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience). Membrane was blocked, for 1 h at room temperature, with 5% fat-free milk powder in TBS [100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)] containing 0.1% Tween and then incubated with either anti-OGG1 (Interchim, 1/1000), anti-APE1 (Santa Cruz, 1/3000), anti-PARP1 (Cell Signaling 1/1000), anti-XRCC1 (Abcam, 1/1000) or anti- $\beta$ -actin (1/10000) antibodies overnight at 4°C. The HRP-conjugated anti-IgG secondary antibody was then applied and band detection performed using the ECL kit (Amersham Bioscience). Each membrane was first used for detecting first one of the target proteins (OGG1, APE1, PARP1 or XRCC1) and then deshybridized for monitoring the

normalizing  $\beta$ -actin protein on the same membrane. The intensity of each band was quantified with the ImageJ software, and the ratio target protein/ $\beta$ -actin calculated for each sample. This ratio was finally compared in APP751-expressing cells versus mock, and within either mock or APP751, versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

## I. Comet-based DNA repair assays

### 1. Substrate preparation

LnCap cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C. Sub-confluent cultures of cells were incubated with 1  $\mu$ M riboflavin (Sigma) at 37°C for 20 min and then UVA irradiated at 10 J/cm<sup>2</sup> on ice to induce 8oxoG, a substrate for BER. Cells were then collected by trypsinization, suspended in freezing medium (RPMI-1640 with 20% FCS and 10% DMSO) at 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL, frozen slowly to -80°C and stored in liquid nitrogen.

### 2. Preparation of whole-cell extracts

Liquid nitrogen-stored frozen aliquots of mock and APP751-expressing cells were centrifuged at 300 g at 4°C for 5 min. The supernatant was then removed, leaving a dry pellet that was subsequently frozen by immersion in liquid nitrogen and resuspended in 33  $\mu$ L of extraction buffer (45 mM HEPES, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1 mM DTT, and 0.25x Triton, pH 7.8). The mixture was then vortexed for 30 seconds, incubated for 5 min on ice and centrifuged at 14,000 g for 5 min at 4°C. The supernatant was then combined with a 1:5 volume of reaction buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA and 0.2 mg/mL BSA, pH 8).

### 3. Measurement of DNA repair capacities

The principle of the assay is that the repair enzymes present in the cell extracts recognize the damaged DNA of the gel-embedded nucleotide substrates (damaged cells) containing high levels of 8oxoG. Repair processes incise the DNA substrate and cause single-strand breaks that can be determined using single-cell alkaline gel electrophoresis. Therefore, an increase in the tail is

proportional to the DNA repair capacities of 8oxoG lesions by the protein extracts.

Frozen pellets of the photooxidized LnCap substrate were embedded in 0.6% low-melting agarose, spread on microscope slides previously precoated with 1% normal melting point agarose, gelled on ice and immersed in lysis solution overnight at 4°C. The slides were neutralized and equilibrated in the reaction buffer (3 5-min incubations in 40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, and 2 mg/mL BSA, pH 8). A total of 50 µL of extract was placed on each slide, covered with a cover glass and incubated for 30 min at 37°C. As a positive control, we used the repair enzyme FPG (1.7 µg/mL, 100 µL per slide), and we used 50 µL of a mix of extraction and reaction buffers as a negative control. After digestion, the slides were transferred to an electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer prechilled at 4°C. The slides were left at room temperature for 30 min, and electrophoresis was subsequently performed for 30 min at 25 V and 300 mA. After migration, the slides were rinsed in neutralization buffer (3 5-min washes, room temp.) and stained with ethidium bromide.

## **J. Oligonucleotide (ODN) biochip**

### *1. Preparation of nuclear extracts*

We prepared nuclear extracts as described previously [32]. Briefly, thawed cells were washed twice in ice-cold PBS. The pellets were suspended in 1 mL of ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.01% Triton X-100, 0.5 mM DTT, and 0.5 mM PMSF). After 20 minutes on ice, lysis was completed by vortexing the tube for 30 sec. Complete lysis was confirmed using trypan blue exclusion. Nuclei were recovered by centrifugation for 5 min at 5,000 rpm at 4°C and suspended in 25 µL of ice-cold buffer B (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM DTT, protease inhibitors (Complete-mini, Roche, Meylan, France) and 0.5 mM PMSF). Lysis of the nuclear membranes proceeded for 20 minutes on ice. Two cycles of freeze-thaw in liquid nitrogen for 30 seconds and incubation at 4°C for 5 minutes were performed. The extracts were centrifuged for 10 min at 13,000 rpm at 4°C, and the supernatant was recovered. Aliquots of 10 µL were stored frozen at -80°C. The BCA kit

(Interchim, Montluçon, France) was used to measure protein concentration, which was typically 1 mg/mL.

### *2. Preparation of lesion ODN biochip*

The multiplexed ODN array, which has previously been described [33-35], was used. A schematic representation of its principles and use is given in supplementary data, Fig. A. Rapidly, biotinylated support ODNs (at optimized concentrations: 1-1.5 µM in PBS) were printed on streptavidin glass slides (Xantec bioanalytics GmbH, Germany) in duplicate in a 24-well format. The wells were subsequently individualized by setting the slides into ArrayIt® microplate hardware. Duplexes pre-formed through the specific hybridization of one Cy3-labeled lesion ODN and one long ODN were hybridized on support ODNs for 1 h at 37°C in a total volume of 80 µL. Each long ODN has a part complementary to a lesion ODN and a part complementary to a specific support ODN. This latter part directs the hybridization onto a specific location through the support ODN. Slides were then rinsed 3 times for 5 min with 80 µL of excision buffer (10 mM HEPES/KOH, pH 7.8, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 0.5 mg/mL BSA). The sequences of the support, long and lesion ODNs are listed in supplementary data, Table B.

Each well contained a control ODN and eight lesion-containing ODNs in duplicate: 8oxoG paired with cytosine (8oxoG-C), adenine paired with 8oxoG (A-8oxoG), thymine glycol (Tg) paired with adenine (Tg-A), tetrahydrofuran as an AP site substrate equivalent paired with adenine (THF-A), hypoxanthine paired with thymine (Hx-T), dihydrothymidine paired with adenine (dHT-A), ethenoadenine (EthA-T) and uracil paired with adenine (U-A).

As much as possible, the lesions were in the same sequence context to limit the possible influence of surrounding bases on cleavage efficiency.

### *3. Excision reaction*

On each 24-well slide we set 6 control wells containing excision buffer alone and 18 reaction wells for the excision reactions with the extracts. Nuclear extracts (20 µg/mL in 80 µL of excision buffer) were added to the wells in duplicate and incubated at 30°C for 30

minutes. The excision reaction was stopped by washing the slides 3 times for 5 min in PBS/0.2 M NaCl/0.1% Tween 20. The residual fluorescence of each spot was quantified at 532 nm using a Genepix 4200A scanner (Axon Instrument, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the Genepix Pro 5.1 software (Axon Instrument). Results were normalized as described previously [32]. For each slide, we used the normalized fluorescence level of the control wells as a reference (repair buffer alone), and we set the fluorescence level of each lesion ODN of the control well to 100. The excision rate of each lesion was then calculated as a percentage of the fluorescence of the corresponding lesion ODN in the control wells. In addition, each well contained a control ODN (without any lesion) that was used to assess the presence of any nonspecific degradation activity in the extracts. The maximum level of degradation was about 10% for the control ODN. For the calculation of the final lesion ODN cleavage percentage, we then applied a correcting factor that took into account the possible control ODN degradation. Consequently, the final lesion ODN excision percentage was  $100 \times (1 - \text{percentage of fluorescence of lesion ODN} / \text{percentage of fluorescence of control ODN})$ .

The results are presented as the ratio of cleavage in treated vs. untreated cells for each lesion.

### K. Statistical analysis

All of the statistical studies were performed using the Student's t-test. Differences were considered significant when the p value was < .05. The number of replicates in each experiment and the number of independent experiments are indicated in the respective figure

## III. Results

### A. Cytotoxicity assay

We used two different exogenous stress agents, hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ), to mimic the oxidative stress observed in AD-affected brains. These stresses were applied to APP751-expressing cells that endogenously produce  $\text{A}\beta$ . ELISA assay showed an increased concentration of  $\text{A}\beta_{40}$  and  $\text{A}\beta_{42}$  in the cell medium of APP751-transfected cell line after 24, 48 and 72h of cell

culture. Neither  $\text{A}\beta_{40}$  nor  $\text{A}\beta_{42}$  were detected in the cell culture of mock-transfected cell line (supplementary data, Fig. B).  $\text{H}_2\text{O}_2$ -, and  $\text{CuSO}_4$ -induced cytotoxicity was assessed in mock and APP751-expressing cell lines using an MTT assay. At 48 h after plating, both cell lines were treated with a range of concentrations of each compound from 100  $\mu\text{M}$  to 1 mM without changing the cell media. The cytotoxicity of both agents was not significantly different between the two cell lines (Supplementary data, Fig. C) (except for the higher concentrations of copper sulfate (600 $\mu\text{M}$ ) where Mock cells were more resistant than APP751), and the rate of cell growth was not affected. Thus, we used the inhibitory concentrations of 10% ( $\text{IC}_{10}$ ) of the mock cell line, which were 115  $\mu\text{M}$  and 350  $\mu\text{M}$  for  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{CuSO}_4$ , respectively, as working concentrations for the next studies.

### B. Both nuclear and mitochondrial DNA damage are increased in APP751-expressing cells

The extent of nuclear DNA damage was characterized using the alkaline comet assay. This assay evaluates the frequency of strand DNA breaks (SSBs) and of alkali-labile sites (ALS). The subsequent use of formamidopyrimidine DNA glycosylase (fpg) allowed us to gather complementary information because fpg recognizes 8oxoG and other oxidatively damaged purines. The levels of SSBs and ALS were obtained by quantifying the tail DNA in non-fpg-treated slides (Fig. 1A, 1C), and the level of oxidized purines was obtained by subtracting these SSB and ALS tail DNA values from the tail DNA values of the sample corresponding to FPG-treated slides (Fig. 1A, 1B).

Under basal conditions without any exogenous stress, APP751-expressing cells had a higher tail intensity than the mock-transfected cell line (16.08% tail DNA  $\pm$  4.43 versus 4.75  $\pm$  1.51,  $p=0.0004$ ). After exposure to  $\text{CuSO}_4$ , the tail intensity increased by 8.59% in the mock-transfected cell line (13.34%  $\pm$  5.11 versus 4.75%  $\pm$  1.51,  $p=0.005$ ) and by 21.3% in the APP751-expressing cell line (37.38%  $\pm$  9.86 versus 16.08%  $\pm$  4.43,  $p=0.0004$ ). After exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the tail intensity increased by 9.71% in the mock-transfected cell line (14.46%  $\pm$  6.60 versus 4.75  $\pm$  1.51,  $p=0.01$ ) and by 12.05% in the APP751-expressing cell



line ( $28.13\% \pm 6.60$  versus  $16.08\% \pm 4.43$ ,  $p=0.0008$ ). Thus, the induction of SSBs was more efficient in APP751-expressing cells than in mock cells. Similarly, the level of oxidized purines in the APP751-expressing cell line was higher than in the mock cell line under basal conditions ( $6.19\% \pm 3.55$  versus  $2.39\% \pm 2.35$ ,  $p=0.03$ ). Exposure to  $\text{CuSO}_4$  increased the fpg-dependent tail intensity in the mock-transfected cell line by 7.69% ( $10.06\% \pm 2.27$  versus  $2.39\% \pm 2.35$ ,  $p=0.004$ ), and the fpg-dependent tail intensity in the APP751-expressing cell line increased by 9.93% ( $16.12\% \pm 6.60$  versus  $6.19\% \pm 3.55$ ,  $p=0.03$ ). Exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased the fpg-dependent tail intensity in the mock-transfected cell line by 8.40% ( $10.79\% \pm 7.58$  versus  $2.39\% \pm 2.35$ ,  $p=0.04$ ), and the fpg-dependent tail intensity in the APP751-expressing cell line was increased by 17.87% ( $24.06\% \pm 9.80$  versus  $6.19\% \pm 3.55$ ,  $p=0.002$ ). **Mitochondrial** DNA damage was characterized by quantifying the common deletion in mitochondrial DNA. This common deletion corresponds to a large deletion of 4977 bp which is the most common and the best characterized mutation in mtDNA. The deleted mitochondrial DNA versus total mitochondrial DNA ratio was calculated in the mock and APP751-expressing cells, under basal conditions or following treatment by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 2). This ratio was significantly higher in the APP751-expressing cell line than in the mock ( $1.39 \pm 0.27$  versus  $0.36 \pm 0.10$ ,  $p=0.0001$ ) and even higher than in the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated mock ( $1.39 \pm 0.27$  versus  $0.86 \pm 0.12$ ,  $p=0.01$ ). The  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated APP751-expressing cells ratio was also significantly higher than in the non treated APP751-expressing cells ( $2.51 \pm 0.29$  versus  $1.39 \pm 0.27$ ,  $p=0.0003$ ).

### C. *A $\beta$ secretion leads to an overall downregulation of BER-associated genes*

The expression levels of DNA repair enzymes were measured using real-time quantitative PCR, which allows for the relative quantification of a target gene under one condition compared to another condition by normalizing to one or more housekeeping genes that are considered stably expressed in both conditions. We first investigated the expression level of BER-associated genes between the mock-transfected and the APP751-expressing cell lines under basal

conditions (Fig. 3A). Several BER-associated genes were significantly downregulated by the presence of  $\text{A}\beta$ . For OGG1, the human 8oxoG-specific glycosylase, the fold change in expression in APP751-expressing cells compared to mock-transfected cells was  $0.71 \pm 0.23$  ( $p=0.0175$ ). The expression of the MutY homolog (MYH), another BER-associated glycosylase that removes misincorporated adenines in front of 8oxoG during DNA replication, changed  $0.59 \pm 0.33$  fold ( $p=0.0168$ ) in APP751-expressing cells compared to mock-transfected cells. The expression of UNG mRNA in APP751-expressing cells was also reduced compared to mock cells ( $0.05 \pm 0.31$ ,  $p=0.0047$ ). mRNA levels of apurinic endonuclease 1 (APE1) were reduced in APP751-expressing cells ( $0.63 \pm 0.26$ ,  $p=0.0088$ ). Other BER-associated genes, more likely involved in the processing of SSBs than small damaged bases, were also downregulated in APP751-expressing cells compared to mock cells: the expression ratios of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), x-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) and aprataxin (APTX) were  $0.59 \pm 0.20$  ( $p=0.0016$ ),  $0.69 \pm 0.02$  ( $p=0.0283$ ) and  $0.59 \pm 0.18$  ( $p=0.0072$ ), respectively. Proteins involved in the final step of BER, such as proliferating cell nuclear antigen (PCNA), were also downregulated in APP751-expressing cells, with an expression ratio of  $0.56 \pm 0.20$  compared to mock ( $p=0.0012$ ). However, the expression ratios of pol $\beta$ , ligase 1 (LigI) and ligase 3 (LigIII) mRNA levels were not significantly different between the two cell lines.

We further examined the gene expression profile of the two cell lines following  $\text{CuSO}_4$ - or  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced stress. After  $\text{CuSO}_4$  treatment (Fig. 3B), OGG1 was significantly overexpressed by the mock cell line ( $1.23 \pm 0.04$ ,  $p=0.0002$ ), whereas it was downregulated in APP751-expressing cells ( $0.64 \pm 0.25$ ,  $p=0.0349$ ). Moreover, the expression profile of the two cell lines was also significantly different ( $p=0.0082$ ). MYH mRNA levels were not significantly modified in the mock cell line after  $\text{CuSO}_4$ -induced stress but were significantly downregulated in the APP751-expressing cell line ( $0.64 \pm 0.28$ ,  $p=0.0441$ ). The expression of PARP1 following  $\text{CuSO}_4$  stress was significantly diminished in the mock cell line ( $0.79 \pm 0.07$ ,  $p=0.0036$ ), although it was not modified in APP751-expressing cells.

LigI was not significantly upregulated in mock cells, but it was severely downregulated in APP751-expressing cells ( $0.50 \pm 0.05$ ,  $p=0.0002$ ). XRCC1 was overexpressed in both mock ( $1.10 \pm 0.08$ ,  $p=0.0310$ ) and APP751-expressing ( $1.25 \pm 0.16$ ,  $p=0.0456$ ) cell lines after  $\text{CuSO}_4$  treatment.

Next, we compared BER gene expression between the two cell lines following  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress (Fig. 3C). OGG1 mRNA expression levels were significantly upregulated in the mock cell line following stress ( $1.76 \pm 0.07$ ,  $p=0.00002$ ), while they were downregulated in APP751-expressing cells ( $0.70 \pm 0.21$ ,  $p=0.0338$ ), and these ratios were significantly different ( $p=0.0006$ ). APE1 was slightly downregulated ( $0.81 \pm 0.14$ ,  $p=0.0398$ ) in the mock cell line and even more diminished ( $0.62 \pm 0.06$ ,  $p=0.0002$ ) in the APP751-expressing cell line. APE1 mRNA levels were significantly different in the two cell lines ( $p=0.0465$ ). UNG was significantly downregulated in the mock cell line following hydrogen peroxide treatment ( $0.60 \pm 0.22$ ,  $p=0.0166$ ) but not in the APP751-expressing cell line. However, the levels of UNG in both cell lines after  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress were not significantly different. MYH was upregulated in the mock cell line after stress ( $2.09 \pm 0.67$ ,  $p=0.0240$ ), but it was not significantly downregulated in APP751-expressing cells. Nevertheless, following treatment, the two responses were significantly different from each other ( $p=0.0171$ ). PARP1 was significantly downregulated in the APP751-expressing cell line after stress ( $0.61 \pm 0.20$ ,  $p=0.0135$ ). The expression of LigI, LigIII and XRCC1 was not modified in the mock cell line after stress but was strongly downregulated in the APP751-expressing cell line, with expression ratios of  $0.43 \pm 0.13$  ( $p=0.0017$ ),  $0.51 \pm 0.11$  ( $p=0.0018$ ) and  $0.92 \pm 0.02$  ( $p=0.0031$ ), respectively. Only LigIII expression profiles were significantly different between the two cell lines after stress ( $p=0.0282$ ).

#### D. Protein expression analysis

In order to determine whether modulation in gene expression was reflected at the protein level, Western blot experiments were performed to compare the level of protein expression between mock and APP751-expressing cells after  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress or not. For OGG1, under basal conditions, the level of protein was half as much elevated in the

APP751-expressing as in the mock cell line (0.48). On the other hand, for APE1, PARP1 and XRCC1, the level of protein was slightly higher in the APP751-expressing cells than in the mock ones (1.19; 1.37; 1.65 respectively; Fig. 4A, 4B). Except for OGG1, the induction of protein expression after  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 4A, 4C) treatment was stronger in the mock cell line than in the APP751-expressing cells.

#### E. $\text{A}\beta$ secretion decreases 8oxoG excision capacity

Thus far, our results suggested that the level of DNA damage was higher in APP751-expressing cells and that the expression of BER-related genes was reduced. Moreover, OGG1 protein level was reduced in those cells. Therefore, we investigated whether the capacity to excise major oxidative lesions was also affected. We used a comet-based assay, which assesses the ability of protein extracts to excise 8oxoG from control or specifically damaged cellular substrates. We showed (Fig. 5) that protein extracts from the mock cell line had a significantly higher excision potential ( $22.93 \pm 6.72$ ) than the APP751 cell line ( $15.37 \pm 5.36$ ,  $p=0.0009$ ) under basal conditions. In addition, there was no significant increase in the 8oxoG excision capacity in the mock cell line after copper- or hydrogen peroxide-induced stress. In contrast, we observed that  $\text{CuSO}_4$ -induced stress led to a significant decrease ( $p=0.0151$ ) in excision activity ( $15.37 \pm 5.36$  versus  $12.74 \pm 4.58$ ) in APP751-expressing cells, and the difference was even higher after  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress ( $15.37 \pm 5.36$  versus  $10.48 \pm 4.35$ ,  $p=0.0060$ ).

#### F. Evaluation of small damaged base excision capacity using a multiplex assay: ODN biochip

To obtain further information about the BER capacity in the APP751 cell line, we used a miniaturized assay that allows for the quantification of excision of several specific sugar/base damage repaired by the BER. We investigated the average excision percentage for each lesion in the two cell lines with and without a stress stimulus. Then, for each cell line, we calculated the  $\text{CuSO}_4$ - or  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated/untreated ratios to focus on the inhibition or induction of excision capacity of each cell line following stress (Fig. 6). The 8oxoG-C excision capacity was enhanced



13.65 and 2.27 fold in the mock cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively, while it was decreased 0.12 and 0.26 fold in the APP751-expressing cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. A-8oxoG recognition was induced 3.19 and 1.58 fold following copper and hydrogen peroxide stress, respectively, in the mock cell line, while it was inhibited 0.28 and 0.38 fold in the APP751-expressing cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. The Tg-A excision capacity was increased 1.25 and 3.39 fold in the mock cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. In contrast, Tg-A excision capacity was decreased 0.57 and 0.51 fold in the APP751-expressing cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. The THF-A excision capacity was not modulated following copper or hydrogen peroxide stress in any cell line: treated/non-treated ratios were 1.02, 0.99, 1.02 and 0.9 for mock-CuSO<sub>4</sub>/mock, mock-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mock, APP751-CuSO<sub>4</sub>/APP751 and APP751-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/APP751, respectively. The Hx-T excision capacity was enhanced 5.17 and 1.55 fold in the mock cell line following copper and hydrogen peroxide stresses, respectively, while it was decreased 0.45 and 0.57 fold in the APP751-expressing cell line in response to the same treatments. dHT-A repair was increased 7.02 and 1.86 fold following copper and hydrogen peroxide stress, respectively, in the mock cell line, and it was inhibited 0.10 and 0.07 fold in the APP751-expressing cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. EthA-T excision capacity was increased 2.39 and 2.07 fold in the mock cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. In contrast, EthA-T excision capacity was decreased 0.17 and 0.16 fold in the APP751-expressing cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively. The U-A excision capacity was enhanced 1.54 and 1.81 fold in the mock cell line following copper and hydrogen peroxide stress, respectively, while it was decreased 0.65 and 0.59 fold in the APP751-expressing cell line following CuSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress, respectively.

#### IV. Discussion

Alzheimer's disease is characterized by two major pathologic hallmarks, one of which is the extracellular accumulation of the neurotoxic peptide A $\beta$  [1], which has been reported to generate ROS [36]. In addition to the augmentation of the oxidative stress naturally present in the aging brain [37], it has been proposed that oxidation of various biological macromolecules, including DNA, could play an important role in selective neuronal death affecting patients with AD [38]. A high level of DNA damage could be particularly deleterious in post-mitotic cells because they do not self-renew through cell proliferation. Therefore, oxidative base modifications in nuclear and mitochondrial DNA could lead to selective loss of damaged neurons, and they may play a significant role in aging and neurodegeneration [37]. It is still unclear how oxidative DNA damage increases in the tissues of AD patients. Although genetic defects in several DNA repair-related diseases (xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome) are often acquired in progressive neurological degeneration, it is also not known whether DNA repair and/or the response to DNA damage play significant roles in the pathogenesis of AD [39].

In this study, we explored the consequences of an endogenous secretion of A $\beta$ , coupled to AD-characteristic oxidative or metallic stresses [40] on the DNA damage and repair responses of an APP<sup>Swe</sup>-transfected cell line [26]. Indeed, the endogenous secretion of A $\beta$  by the APP751-expressing cells constituted a great advantage for this cell line by avoiding the cytotoxicity associated with the addition of exogenous A $\beta$  peptide and allowed the addition of other compounds that are important to the pathogenesis of AD, such as copper and hydrogen peroxide, at very low doses, thereby more accurately depicting the neuronal environment of the AD-affected brain.

Because an increase in oxidative DNA damage has been widely documented in AD [41,42], we first investigated if the level of DNA damage was also higher in our APP751-expressing cells compared to the mock cell line. To assess the deleterious effects of A $\beta$  on nuclear DNA, we used the well-known alkaline comet assay, which allows for the measurement of SSBs and ALS and the assessment of oxidized purines through the use

of the fpg enzyme. We showed that the basal levels of SSBs, ALS and oxidized purines, including 8oxoG, were significantly higher in APP751-expressing cells than in the mock cell line. These findings corroborate the fact that the endogenous secretion of A $\beta$  itself is able to damage DNA through the generation of ROS [43]. Accordingly, we observed that the level of ROS was higher in the APP751-expressing cells (Data not shown), i.e. A $\beta$ -secreting cells, than in their mock counterparts. Differences in DNA damage between the cell lines were also observed following exposure to a stress. Indeed, applying a CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment to the cells drastically increased the level of DNA damage in the APP751-expressing compared to mock cell line. A $\beta$  augmented the effects of copper and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It has been shown that copper interacts with APP and A $\beta$  to potentiate neuronal degeneration in AD by promoting deposition and ROS production [44].

Our observation of an increase sensitivity of APP751-expressing cells to oxidative stress was not limited to nuclear but also to mitochondrial DNA, as shown by the frequency of common deletion in mtDNA. Indeed, deleted mtDNA represents a sensitive and early marker for mitochondrial mutations and suffering [28]. We established that the level of deleted mtDNA was considerably higher in the APP751-expressing cells than in the mock cells, and moreover higher than in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated mock cells, depicting that the A $\beta$  peptide secretion alone was capable of inducing a higher suffering state to the APP751-expressing cell line than an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in the mock cell line. Accordingly, the level of deleted mtDNA within the APP751-expressing cells was higher after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

We then hypothesized that SSBs and the oxidized purine-associated DNA repair pathway might also be affected by A $\beta$ . Therefore, we investigated the expression level of BER-associated genes in the two cell lines. When we compared the basal expression profile of BER genes between APP751-expressing cells and mock cells, we were surprised to observe that, in spite of increased oxidative damage, the presence of secreted A $\beta$  in the cell culture media induced an overall downregulation of BER-associated genes. Interestingly OGG1 and MYH, both of which are involved in 8oxoG repair, were significantly downregulated, although the level

of 8oxoG was higher in APP751-expressing than in mock cells according to the comet assay. Interestingly, several changes or defects in the expression of the oxidative stress-sensitive OGG1 have been reported [23,24,45] but not necessarily at the mRNA level. The decrease of OGG1 in presence of A $\beta$  was also observed in our study at the protein level. MYH has barely been studied or associated with AD, perhaps because it is an indirect secondary actor in the repair of 8oxoG, functioning downstream of OGG1 and removing adenine bases mispaired with 8oxoG. Altogether, these results highlight the fact that there is a strong impairment of 8oxoG repair, as OGG1 is downregulated in the APP751-expressing cell line and the downstream glycosylase MYH does not either function properly. Another BER glycosylase involved in the removal of uracil misincorporated into DNA also appeared to be downregulated in the presence of A $\beta$ . Interestingly, a previous study reported that depletion of UNG in cultured rat hippocampal neurons triggered neuronal apoptosis [14]. APE1 mRNA levels were also diminished in our experiments. Interestingly, it has been shown that reduced APE1 expression (using siRNA) decreased neuronal cell viability 24 h after exposure to 25-300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in culture compared with scrambled siRNA controls [46]. However, previous studies have shown increased abasic site incision activity [47] or no differences between AD samples and age-matched controls [23]. Other BER-associated proteins, particularly those involved in SSB repair, such as PARP1 and XRCC1, were also significantly reduced at the mRNA level in our study, corroborating the findings of Boerrigter *et al.* [48], who showed a decrease in SSB repair in patients with a familial form of AD. Other studies using adult male CD-1 mice have indicated that XRCC1 expression is decreased early following either focal cerebral ischemia or cold injury-induced brain trauma, implying that a failure of DNA repair may contribute to neuronal cell death in these processes [49,50]. The comparison of the expression profile of mock and APP751-expressing cells following stress furthered our understanding. As expected, after CuSO<sub>4</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress (both generating oxidative stress within the cell), the mock cell line overexpressed genes encoding proteins involved in the BER of small damage, including oxidative damage

such as OGG1 and MYH (the latter during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress only). Interestingly, the expression of APP751 significantly downregulated OGG1 after both kinds of stress, which is confusing because the level of 8oxoG was higher in CuSO<sub>4</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated APP751-expressing cells than in mock cells. These results suggest that, at least at the mRNA level, the presence of A $\beta$  leads to severe deregulation of the BER pathway. To complete our observations, we used a Comet-based assay to measure the 8oxoG excision activity of our two cell lines. We did not observe a significant increase in excision after stress in the mock cell line, but, basally, the APP751-expressing cell line exhibited a significant reduction in excision capacity, in agreement with the reduced mRNA levels of OGG1 and MYH. In addition, after either copper or hydrogen peroxide-induced stress, the excision capacity of the APP751-expressing cell line was significantly lower than untreated cells. The ODN biochip confirmed these findings, revealing an inhibition of the excision capacity of many small lesions in the APP751 cell line following stress, while mock cells showed an induction of excision capacity after the same stress. Our results suggest that the increase in DNA damage in the APP751-expressing cell line compared to the mock cells could be explained by a decrease in BER-associated enzymes, which is in agreement with a decrease in the excision activity of small lesions typically repaired by BER.

Our data confirmed that the A $\beta$  peptide is a source of enhanced oxidative damage to DNA. The impaired BER capacities in AD-affected neurons that we observed worsen this phenomenon by leading to an accumulation of lesions in the genome because of an increased induction and poorer repair of DNA lesions. This dual and synergistic effect of A $\beta$  is likely to facilitate apoptotic cell death because both oxidative stress and unrepaired damage can trigger apoptosis as a result of blocked replication, subsequent replication fork breakdown and DSB generation [51]. The mechanisms underlying the reduced DNA repair capacities in the presence of A $\beta$  remain to be elucidated and may be of crucial interest to avoid this deleterious process. Moreover, the fact that an entire DNA repair system was affected led us to consider signaling issues within the APP751-expressing cell line in the

presence of A $\beta$ . It has been reported that AD-affected neurons re-enter the cell cycle and subsequently die [52]. A recent publication has shown that following exposure of post-mitotic neurons to DNA-damaging agents (known to form DSBs), the DNA-damage recognition protein ataxia telangiectasia mutated (ATM) is activated through phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk5. This Cdk5-induced ATM phosphorylation leads to activation of cell cycle-related Cdk2 and Cdk6 as well as apoptosis [53].

## CONCLUSIONS

In this study we showed that the endogenous secretion of A $\beta$  in a human APP751-expressing neuroblastoma cell line led to an increase in oxidative DNA damage and concomitantly to an overall downregulation of BER genes, compared to the mock control. We also observed that A $\beta$  prevented the APP751-expressing cells from adapting and responding to additional metallic or oxidative stresses. These results were obtained at the levels of both gene expression and protein activities. Moreover, preliminary data from our laboratory showed that the expression levels of some BER-associated genes were also impaired in the brains of doubly transgenic mice (APPk670N, M671L- PS1M146L) compared to their controls (Data not shown). The BER impairment we report in our APP-751 cell line is concordant with numerous other studies describing a BER decrease in AD-affected brains. BER defects could lead to an accumulation of DNA damage over time and further lead to the massive apoptotic neuronal death responsible for Alzheimer's disease.

## REFERENCES

- [1] M.P. Mattson Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature* 430 (2004) 631-639.
- [2] H.K. Edelberg and J.Y. Wei The biology of Alzheimer's disease, *Mech Ageing Dev* 91 (1996) 95-114.
- [3] J. Hardy Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci*, 1997, pp. 154-159.
- [4] M.S. Forman, D.G. Cook, S. Leight, R.W. Doms and V.M. Lee Differential effects of the swedish mutant amyloid precursor protein on beta-amyloid

- accumulation and secretion in neurons and nonneuronal cells, *J Biol Chem* 272 (1997) 32247-32253.
- [5] S.Y. Park, H.S. Kim, E.K. Cho, B.Y. Kwon, S. Phark, K.W. Hwang and D. Sul Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation, *Food Chem Toxicol* 46 (2008) 2881-2887.
- [6] L. Migliore and F. Coppede Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases, *Mutat Res* (2008).
- [7] W.R. Markesbery The role of oxidative stress in Alzheimer disease, *Arch Neurol* 56 (1999) 1449-1452.
- [8] K.V. Subbarao, J.S. Richardson and L.C. Ang Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro, *J Neurochem* 55 (1990) 342-345.
- [9] M.A. Smith, M. Rudnicka-Nawrot, P.L. Richey, D. Praprotnik, P. Mulvihill, C.A. Miller, L.M. Sayre and G. Perry Carbonyl-related posttranslational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease, *J Neurochem* 64 (1995) 2660-2666.
- [10] E. Kadioglu, S. Sardas, S. Aslan, E. Isik and A. Esat Karakaya Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Biomarkers* 9 (2004) 203-209.
- [11] P. Mecocci, M.C. Polidori, T. Ingegneri, A. Cherubini, F. Chionne, R. Cecchetti and U. Senin Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients, *Neurology* 51 (1998) 1014-1017.
- [12] M. Morocz, J. Kalman, A. Juhasz, I. Sinko, A.P. McGlynn, C.S. Downes, Z. Janka and I. Rasko Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 23 (2002) 47-53.
- [13] J. Wang, S. Xiong, C. Xie, W.R. Markesbery and M.A. Lovell Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease, *J Neurochem* 93 (2005) 953-962.
- [14] Kruman, II, E. Schwartz, Y. Kruman, R.G. Cutler, X. Zhu, N.H. Greig and M.P. Mattson Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis, *J Biol Chem* 279 (2004) 43952-43960.
- [15] M.A. Lovell and W.R. Markesbery Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 7497-7504.
- [16] S.P. Gabbita, M.A. Lovell and W.R. Markesbery Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease, *J Neurochem* 71 (1998) 2034-2040.
- [17] M.A. Lovell, S.P. Gabbita and W.R. Markesbery Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF, *J Neurochem* 72 (1999) 771-776.
- [18] L. Migliore, I. Fontana, F. Trippi, R. Colognato, F. Coppede, G. Tognoni, B. Nucciarone and G. Siciliano Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients, *Neurobiol Aging* 26 (2005) 567-573.
- [19] P.I. Moreira, A. Nunomura, M. Nakamura, A. Takeda, J.C. Shenk, G. Aliev, M.A. Smith and G. Perry Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease, *Free Radic Biol Med* 44 (2008) 1493-1505.
- [20] E. Fonfria, I.C. Marshall, I. Boyfield, S.D. Skaper, J.P. Hughes, D.E. Owen, W. Zhang, B.A. Miller, C.D. Benham and S. McNulty Amyloid beta-peptide(1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures, *J Neurochem* 95 (2005) 715-723.
- [21] H.E. Krokan, H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei and G. Slupphaug Base excision repair of DNA in mammalian cells, *FEBS Lett* 476 (2000) 73-77.
- [22] S.S. David, V.L. O'Shea and S. Kundu Base-excision repair of oxidative DNA damage, *Nature* 447 (2007) 941-950.
- [23] L. Weissman, D.G. Jo, M.M. Sorensen, N.C. de Souza-Pinto, W.R. Markesbery, M.P. Mattson and V.A.



- Bohr Defective DNA base excision repair in brain from individuals with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 5545-5555.
- [24] C. Shao, S. Xiong, G.M. Li, L. Gu, G. Mao, W.R. Markesbery and M.A. Lovell Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain, *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 813-819.
- [25] L. Weissman, N.C. de Souza-Pinto, M.P. Mattson and V.A. Bohr DNA base excision repair activities in mouse models of Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 30 (2009) 2080-2081.
- [26] V. Vingtdeux, M. Hamdane, M. Gompel, S. Begard, H. Drobecq, A. Ghestem, M.E. Grosjean, V. Kostanjevecki, P. Grognon, E. Vanmechelen, L. Buee, A. Delacourte and N. Sergeant Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism, *Neurobiol Dis* 20 (2005) 625-637.
- [27] A.A. van de Loosdrecht, R.H. Beelen, G.J. Ossenkoppele, M.G. Broekhoven and M.M. Langenhuijsen A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia, *J Immunol Methods* 174 (1994) 311-320.
- [28] A. Peinnequin, T. Poyot, A. Dib, A. Aubourg, C. Mouret and C. Demeilliers Direct quantification of mitochondrial DNA and its 4.9-kb common deletion without DNA purification, *Anal Biochem* 409 298-300.
- [29] S. Sauvaigo, C. Petec-Calin, S. Caillat, F. Odin and J. Cadet Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions, *Anal Biochem* 303 (2002) 107-109.
- [30] M.W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet and T.P. Neuvians Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol Lett* 26 (2004) 509-515.
- [31] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan and L. Dempfle Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res* 30 (2002) e36.
- [32] J.F. Millau, A.L. Raffin, S. Caillat, C. Claudet, G. Arras, N. Ugolin, T. Douki, J.L. Ravanat, J. Breton, T. Oddos, C. Dumontet, A. Sarasin, S. Chevillard, A. Favier and S. Sauvaigo A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates., *Lab Chip* 8 (2008) 1713-1722.
- [33] S. Sauvaigo, V. Guerniou, D. Rapin, D. Gasparutto, S. Caillat and A. Favier An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage., *Anal. Biochem.* 333 (2004) 182-192.
- [34] V. Guerniou, D. Rapin, J.F. Millau, E. Bufflier, A. Favier, J. Cadet and S. Sauvaigo Repair of oxidative damage of thymine by HeLa whole-cell extracts: simultaneous analysis using a microsupport and comparison with traditional PAGE analysis., *Biochimie* 87 (2005) 151-159.
- [35] B. Pons, A.S. Belmont, G. Masson-Genteuil, V. Chapuis, T. Oddos and S. Sauvaigo Age-associated modifications of Base Excision Repair activities in human skin fibroblast extracts, *Mech Ageing Dev* 131 661-665.
- [36] A. Nunomura, T. Tamaoki, K. Tanaka, N. Motohashi, M. Nakamura, T. Hayashi, H. Yamaguchi, S. Shimohama, H.G. Lee, X. Zhu, M.A. Smith and G. Perry Intraneuronal amyloid beta accumulation and oxidative damage to nucleic acids in Alzheimer disease, *Neurobiol Dis* 37 731-737.
- [37] T. Lu, Y. Pan, S.Y. Kao, C. Li, I. Kohane, J. Chan and B.A. Yankner

- Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain, *Nature* 429 (2004) 883-891.
- [38] W.R. Markesbery Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease, *Free Radic Biol Med* 23 (1997) 134-147.
- [39] K.H. Kraemer, N.J. Patronas, R. Schiffmann, B.P. Brooks, D. Tamura and J.J. DiGiovanna Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship, *Neuroscience* 145 (2007) 1388-1396.
- [40] Y.H. Hung, A.I. Bush and R.A. Cherny Copper in the brain and Alzheimer's disease, *J Biol Inorg Chem* 15 61-76.
- [41] D.L. Zhang, Y.Q. Chen, X. Jiang, T.T. Ji and B. Mei Oxidative damage increased in presenilin1/presenilin2 conditional double knockout mice, *Neurosci Bull* 25 (2009) 131-137.
- [42] Y. Du, M.C. Wooten, M. Gearing and M.W. Wooten Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease, *Free Radic Biol Med* 46 (2009) 492-501.
- [43] S. Varadarajan, S. Yatin, M. Aksenova and D.A. Butterfield Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity, *J Struct Biol* 130 (2000) 184-208.
- [44] P.A. Adlard and A.I. Bush Metals and Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis* 10 (2006) 145-163.
- [45] G. Mao, X. Pan, B.B. Zhu, Y. Zhang, F. Yuan, J. Huang, M.A. Lovell, M.P. Lee, W.R. Markesbery, G.M. Li and L. Gu Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 2759-2766.
- [46] M.R. Vasko, C. Guo and M.R. Kelley The multifunctional DNA repair/redox enzyme Ape1/Ref-1 promotes survival of neurons after oxidative stress, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 367-379.
- [47] Z. Tan, N. Sun and S.S. Schreiber Immunohistochemical localization of redox factor-1 (Ref-1) in Alzheimer's hippocampus, *Neuroreport* 9 (1998) 2749-2752.
- [48] M.E. Boerrigter, C.M. van Duijn, E. Mullaart, P. Eikelenboom, C.M. van der Togt, D.L. Knook, A. Hofman and J. Vijg Decreased DNA repair capacity in familial, but not in sporadic Alzheimer's disease, *Neurobiol Aging* 12 (1991) 367-370.
- [49] M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, T. Sugawara and P.H. Chan Early decrease of XRCC1, a DNA base excision repair protein, may contribute to DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice, *Stroke* 30 (1999) 2456-2462; discussion 2463.
- [50] M. Fujimura, Y. Morita-Fujimura, N. Noshita, T. Yoshimoto and P.H. Chan Reduction of the DNA base excision repair protein, XRCC1, may contribute to DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice, *Brain Res* 869 (2000) 105-111.
- [51] W.P. Roos and B. Kaina DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends Mol Med* 12 (2006) 440-450.
- [52] K. Herrup, R. Neve, S.L. Ackerman and A. Copani Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death, *J Neurosci* 24 (2004) 9232-9239.
- [53] B. Tian, Q. Yang and Z. Mao Phosphorylation of ATM by Cdk5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death, *Nat Cell Biol* 11 (2009) 211-218.

## FOOTNOTES

We are grateful to Luc Buée, Nicolas Sergeant and Malika Hamdane (INSERM U837, Lille, France) for APP751 and Mock cell lines. Also, we are grateful to Pr Alain Buisson for the doubly transgenic mice. This work was supported by Univesity Joseph Fourier and the CEA. Some methods have been developed through LODORA project which is funded by the National Research Agency.

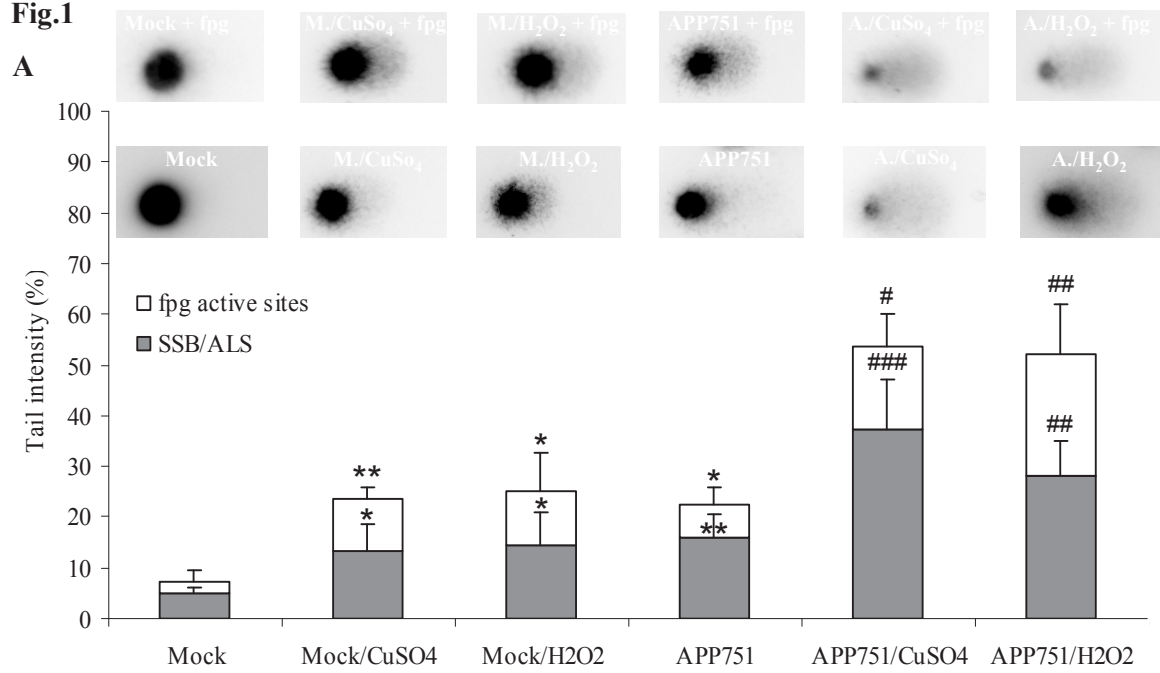
## FIGURES and FIGURES LEGENDS

### **FIGURE 1: A $\beta$ , CuSO<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced nuclear DNA damage.**

Mock and APP751-expressing cell lines were treated or not with CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The comet assay was then performed to detect SSB and ALS, and the fpg enzyme was further used to get information on the level of oxidized purines (fpg active sites) in each sample. The upper line of comet pictures represents the fpg-treated slides with a characteristic image for each sample. The observable tail migration corresponds to fpg active sites (oxidized purines) and also SSB/ALS. The second line represents the non fpg-treated slides, and the tail migration corresponds to the SSB/ALS alone. Figure **1A** displays the graphical representation of the mean tail intensities for each sample, for both fpg active sites (white) and SSB/ALS (grey). Calculated values are displayed in figure **1B** and **1C**, respectively. Under basal conditions and following a metallic or oxidative stress, the level of DNA damage is higher in the APP751-expressing cells than in the mock ones.

\*data significantly different ( $p < 0.05$ ) from mock cells, \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ ; #data significantly different ( $p < 0.05$ ) from APP751-expressing cells, ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$

**Fig.1**



**B**

	fpg active sites					
	Mock	Mock CuSO <sub>4</sub>	Mock H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	APP751	APP751 CuSO <sub>4</sub>	APP751 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tail DNA values	2.39	10.06**	10.79*	6.19*	16.12#	24.06##
S.D.	±2.35	±2.27	±7.58	±3.55	±6.60	±9.80

**C**

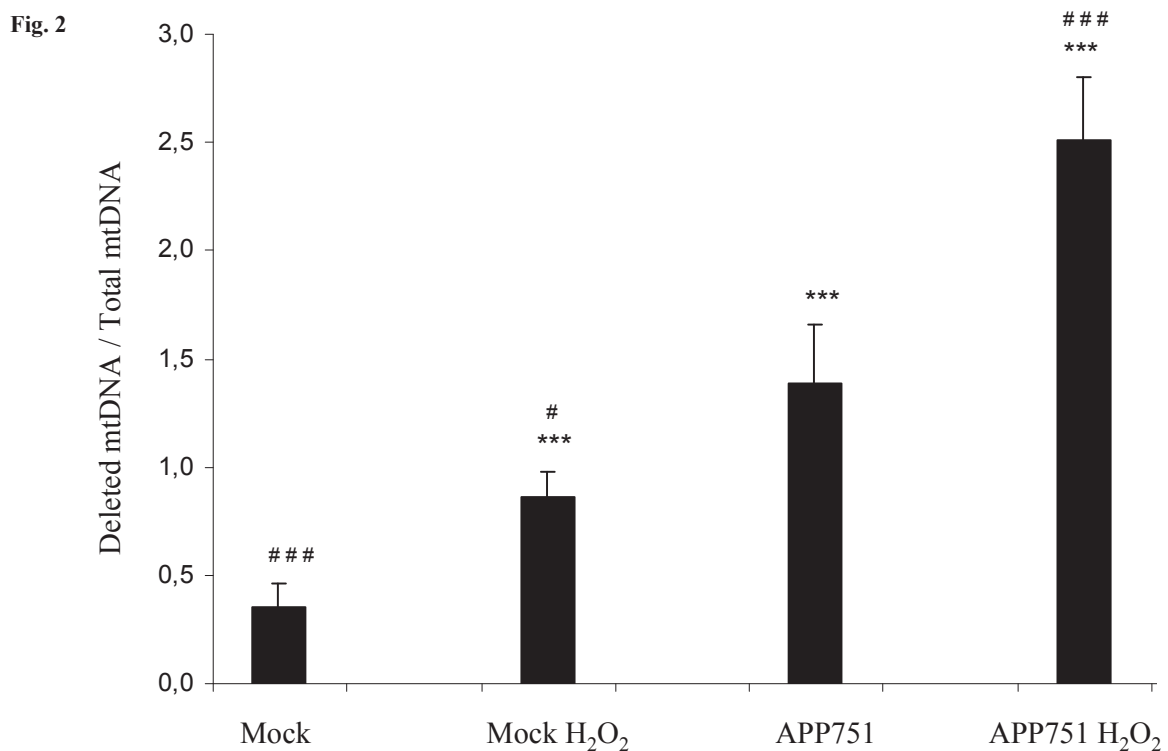
	SSB and ALS					
	Mock	Mock CuSO <sub>4</sub>	Mock H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	APP751	APP751 CuSO <sub>4</sub>	APP751 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tail DNA values	4.75	13.34*	14.46*	16.08**	37.38###	28.13##
S.D.	±1.51	±5.11	±6.60	±4.43	±9.86	±6.89



**FIGURE 2: Quantification of the common deletion in mitochondrial DNA.**

Mock and APP751-expressing cells were treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A cell lysate was then prepared to allow qPCR-based quantification of nuclear GAPDH, total mitochondrial DNA (Tot. mtDNA) and deleted mitochondrial DNA (Del. mtDNA). After normalization to GAPDH, the ratios Del. mtDNA/Tot. mtDNA were obtained. Under basal conditions and following an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress, the APP751-expressing cell lines exhibits higher rates of deleted mtDNA than the mock cell line.

\*data significantly different ( $p < 0.05$ ) from mock cells, \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ ; #data significantly different ( $p < 0.05$ ) from APP751-expressing cells, ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$

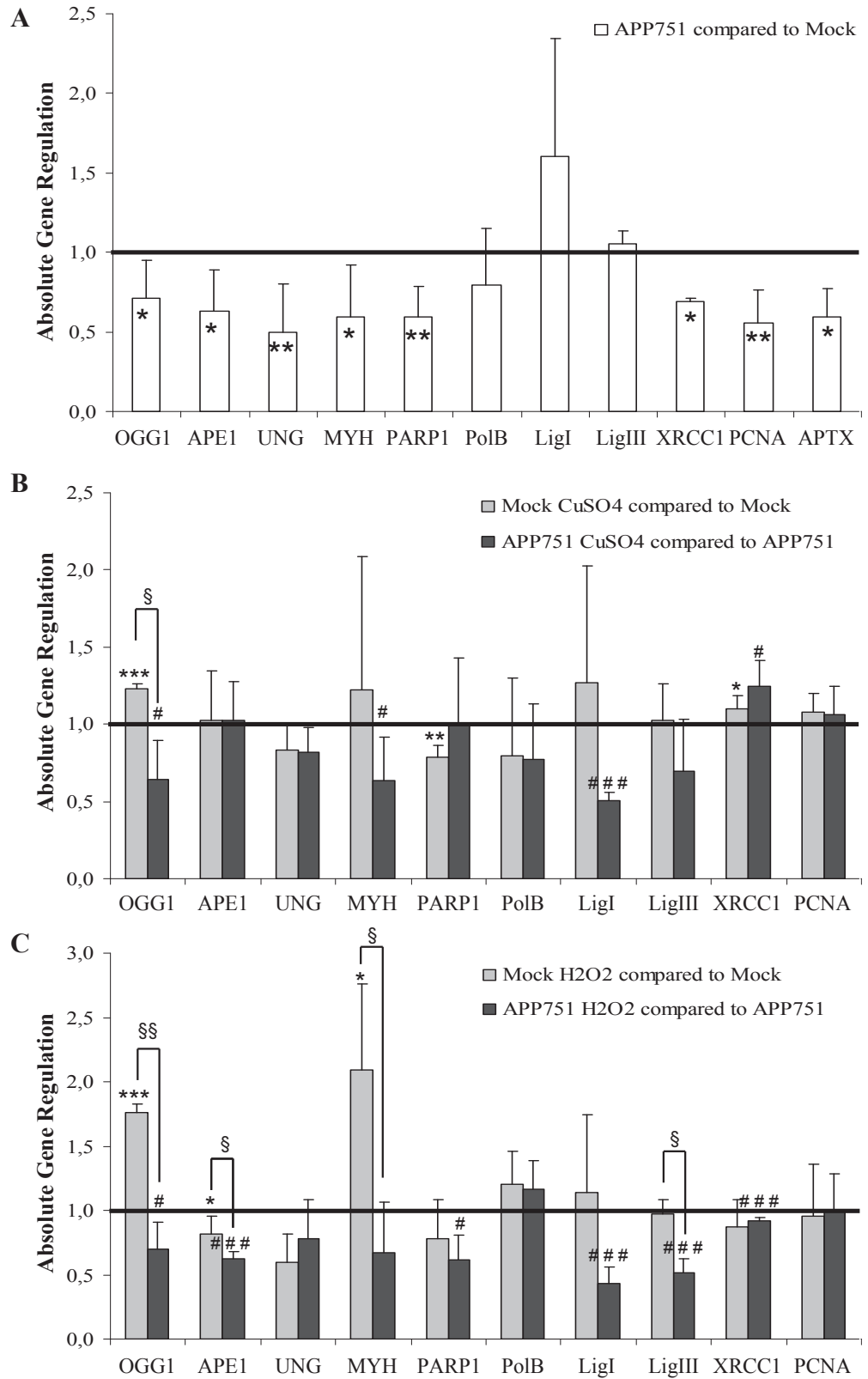


**FIGURE 3: A $\beta$ , CuSO<sub>4</sub>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced BER gene expression.**

Mock and APP751-expressing cell lines were cultured for 48 h and CuSO<sub>4</sub> (350  $\mu$ M) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115  $\mu$ M) were added to the cell culture media. Total RNA was extracted and subsequently reverse-transcribed. A total of 20 ng of corresponding cDNA were used to detect specific gene expression using real-time qPCR. Absolute gene expression in APP751-expressing cells compared to mock cells (**3A**, N=7), in mock CuSO<sub>4</sub>-treated cells compared to mock cells and in APP751-expressing CuSO<sub>4</sub>-treated cells (**3B**, N=3) or mock H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells compared to mock cells and in APP751-expressing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells (**3C**, N=3) were calculated using REST. The mean of the corresponding expression ratios was calculated, and a Student's t-test was performed. A $\beta$  secretion in APP751-expressing cells significantly downregulated OGG1, MYH, UDG, PARP1, XRCC1, PCNA and APTX. The expression profile following CuSO<sub>4</sub>-induced stress was different between mock and APP751-expressing cells. As the most salient features, note that OGG1 was upregulated in mock cells, while APP751-expressing cells showed downregulation. Mock cells did not overexpress MYH, but APP751-expressing cells showed downregulation. The expression profile following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress was different between mock and APP751-expressing cells. Mock cells showed upregulation of OGG1, while APP751-expressing cells showed downregulation. A few genes were not modulated after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure in mock cells, but they were downregulated in APP751-expressing cells (PARP1, LigI, LigIII, and XRCC1). Mock cells overexpressed MYH, but it did not appear to be modulated in APP751-expressing cells after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure.

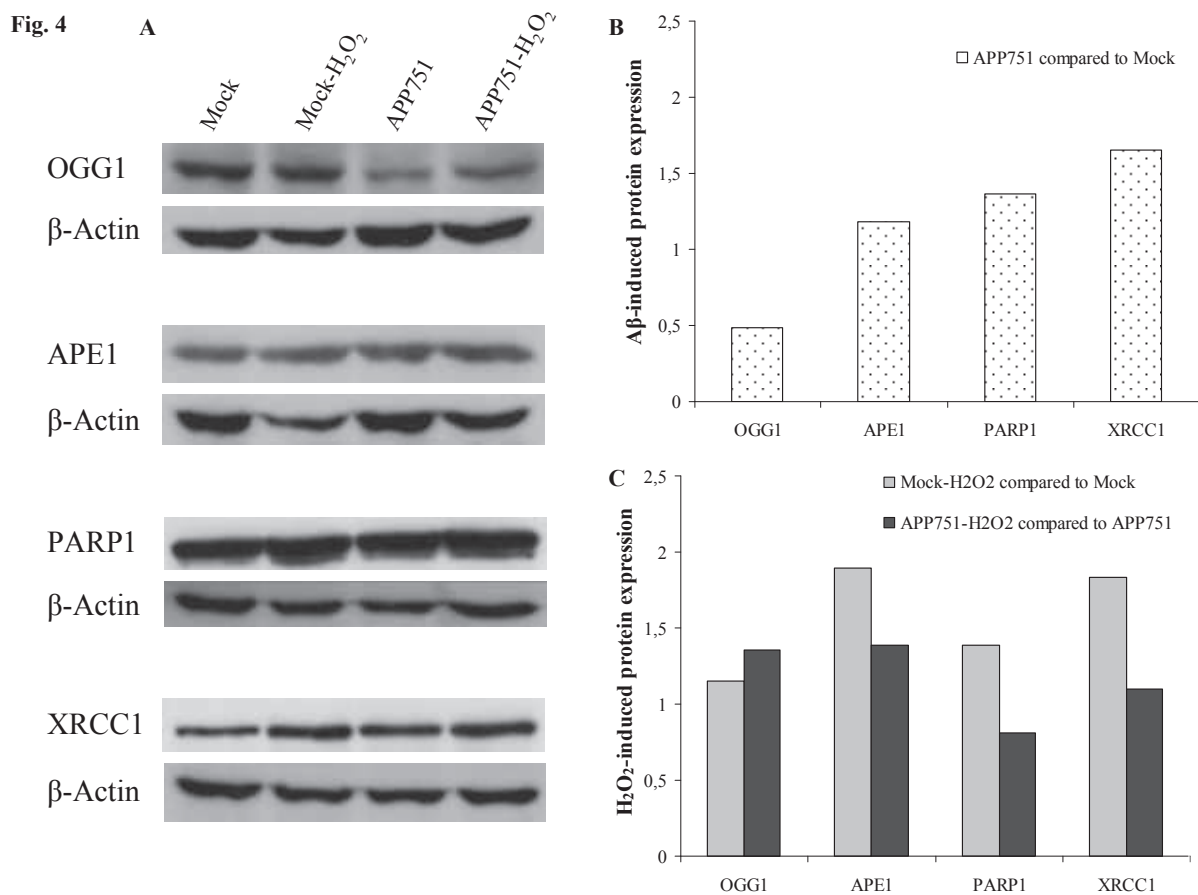
\*data significantly different ( $p < 0.05$ ) from mock cells, \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ ; #data significantly different ( $p < 0.05$ ) from APP751-expressing cells, ## $p < 0.005$ , ### $p < 0.0005$  and §data significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other, §§ $p < 0.005$ , §§§ $p < 0.0005$

Fig. 3



**FIGURE 4: Comparison of the protein expression level between mock and APP751-expressing cells.**

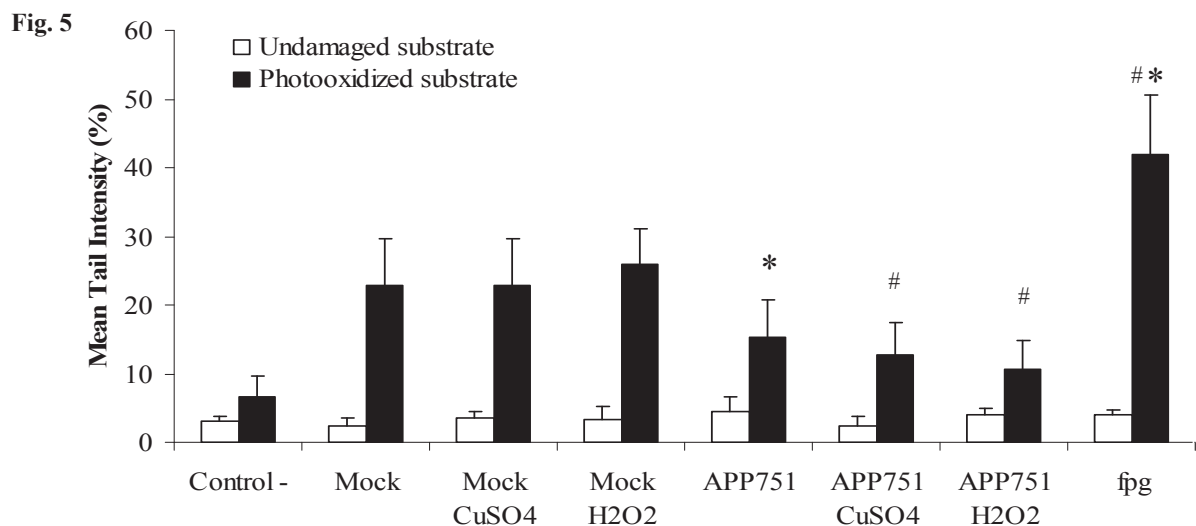
Western blot analysis was performed on nuclear extracts from mock and APP751-expressing cells exposed or not to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Representative pictures showing the relative abundance of each targeted protein are displayed in **4A** with their corresponding same membrane-revealed  $\beta$ actin controls. Band quantification allowed the comparison between mock and APP751 under basal conditions (**4B**), and revealed that OGG1 was half as higher in APP751 as in mock cells, while the expression of APE1, PARP1 and XRCC1 appeared slightly enhanced. However, after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treatment (**4C**), the induction of APE1, PARP1 and XRCC1 was higher in the mock cell line than in the APP751-expressing one. For both cell lines, OGG1 expression level was not modified after oxidative stress.



**FIGURE 5: Analysis of 8oxoG excision activity.**

Mock and APP751-expressing cells were cultured for 48 h and either left untreated or incubated with CuSO<sub>4</sub> (350 μM) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 μM) in the cell culture media for an additional 24 h. Total cell extracts were generated, and 8oxoG excision capacity was analyzed on damaged genomic DNA substrates for 30 min using a modified version of the comet assay. The excision capacity of cell extracts was defined as the mean tail intensity of the comet. Three biological replicates were tested in triplicate in three independent experiments. The mean tail intensity of each cell extract (N=3) was calculated and then a Student's t-test was performed. There was no increase in the mock cell line following either CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress, but there was a significant decrease in the APP751-expressing cell line following both kinds of stress.

\*data significantly different (p<0.05) from mock cells; #data significantly different (p<0.05) from APP751-expressing cells

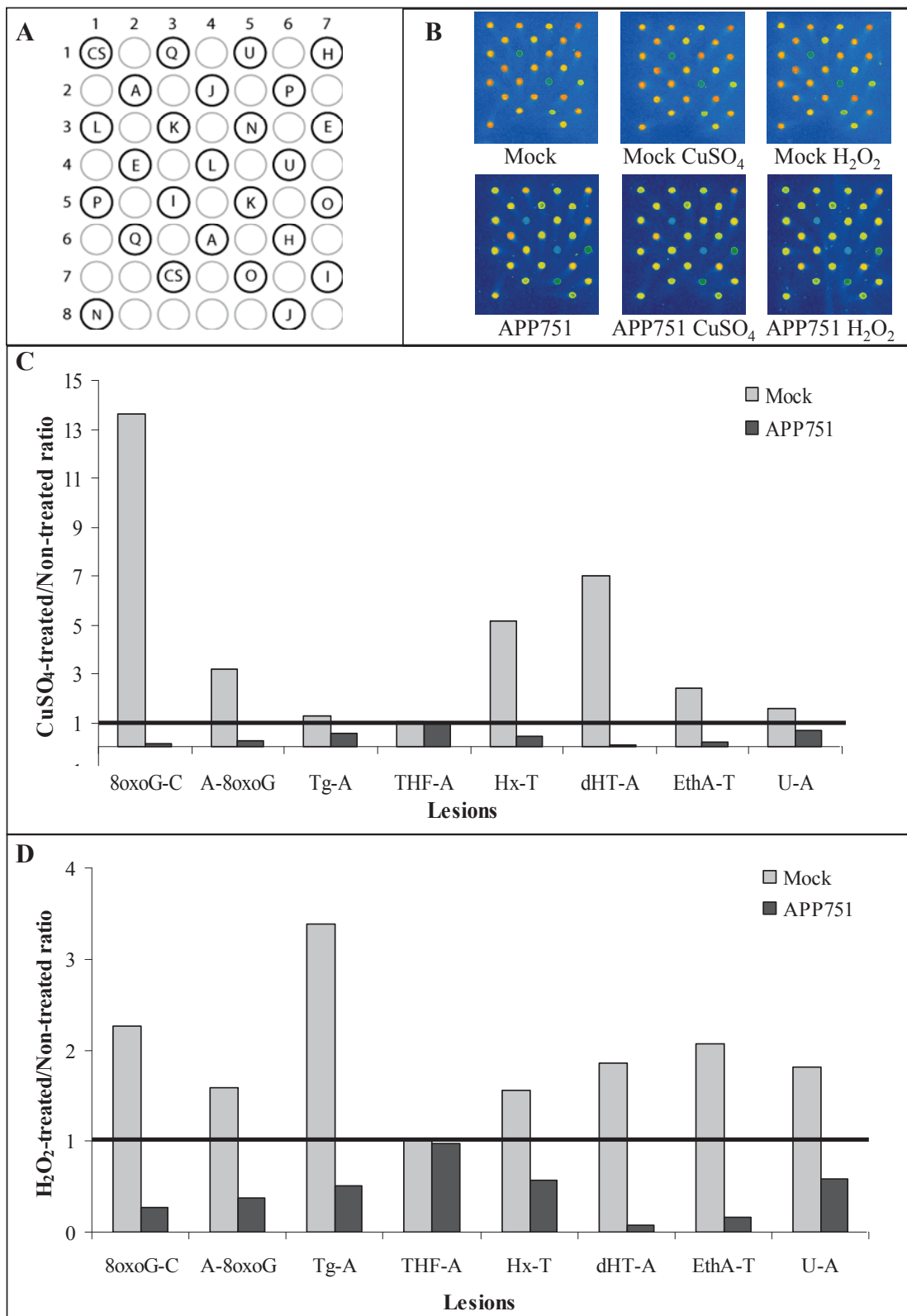


**FIGURE 6: CuSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced excision activity.**

Mock and APP751-expressing cells were cultured for 48 h, and CuSO<sub>4</sub> (350 μM) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115 μM) was added to the cell culture media. Nuclear proteins (20 μg/mL) were then extracted and tested for their excision capacity on the ODN biochip for 30 min. The localization of the spots in each well of the biochip is represented in **6A** (see supplementary data table B) for correspondence between spot I.D. and lesion I.D). A characteristic picture of the spot and the residual fluorescence after incubation with each cell extract is given in **6B**. The mean percentages of excision capacity (N=3) were generated and the mean ratios of treated/non-treated were calculated for each lesion. Both CuSO<sub>4</sub> **6C** and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **6D** treatments stimulated the excision activity in the mock cell line, and they inhibited the excision activity in the APP751-expressing cell line.

**8oxoG-C:** 8oxoG paired with Cytosine; **A-8oxoG:** Adenine paired with 8oxoG; **dHT-A:** dihydrothymidine; **EthA-T:** ethenoadenine; **Hx-T:** hypoxanthine paired with Thymine ; **U-A:** uracil paired with Adenine; **Tg-A:** Tg paired with Adenine; **THF-A:** THF paired with Adenine

Fig. 6



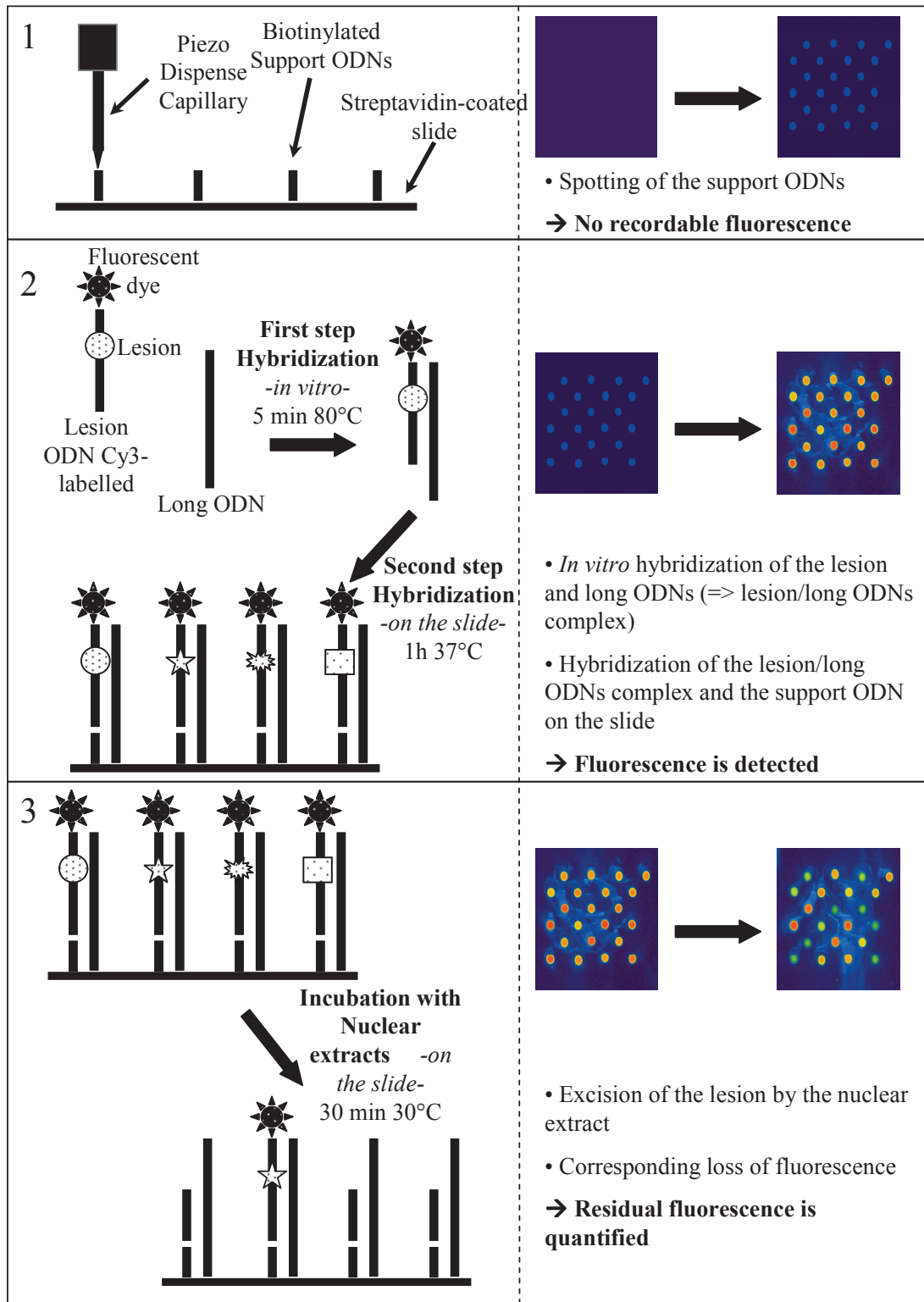
## SUPPLEMENTARY DATA

### **SUPPLEMENTAL FIGURE A: The ODN biochip – principles**

(1) Biotinylated Support ODNs are spotted on streptavidin glass slide, through a piezo dispense capillary. At that point, no fluorescence can be recorded after scanner reading, but the localization of the spots can be discerned (blue circles). (2) A first step of hybridization of the long and lesion ODNs is performed for 1h at 37°C *in vitro*, to form the long/lesion ODN complex. The long/lesion ODN complex is hybridized to the support ODN during a second step of hybridization on the slide. The fluorescence for each spot is then maximal. (3) Finally, the excision reaction is performed by incubating nuclear extracts on the slides. The residual fluorescence is quantified and proportional to the excision capacity of the nuclear extract.



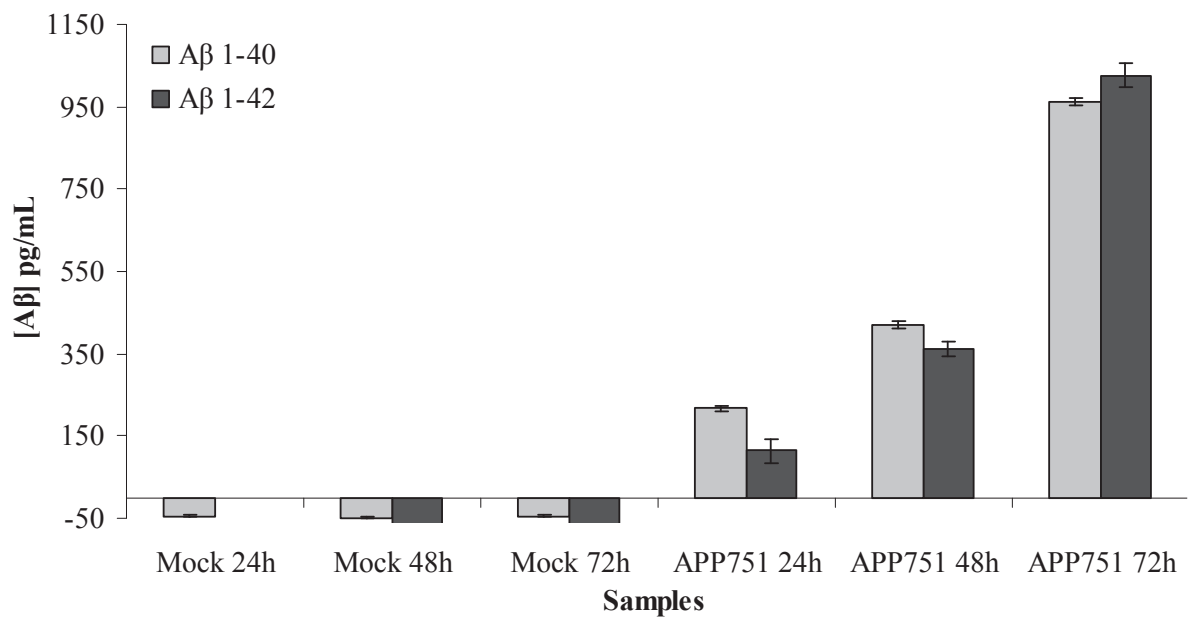
Supplemental Fig. A



**SUPPLEMENTAL FIGURE B: Quantification of A $\beta$  isoforms in the cell culture media**

The cell culture medium was collected in both mock and APP751-expressing cell lines, 24, 48 and 72 after plating. The media was then spun at 300 g to remove the cell debris. Concentration of Abeta 1-40 was determined using Colorimetric BetaMark™ x-40 ELISA Kit (Covance, Princeton, NJ, USA) and the concentration of Abeta1-42 was determined using the INNOTEST™ beta-Amyloid (1 – 42) (Innogenetics, Ghent, Belgium).

**Supplemental Fig. B**

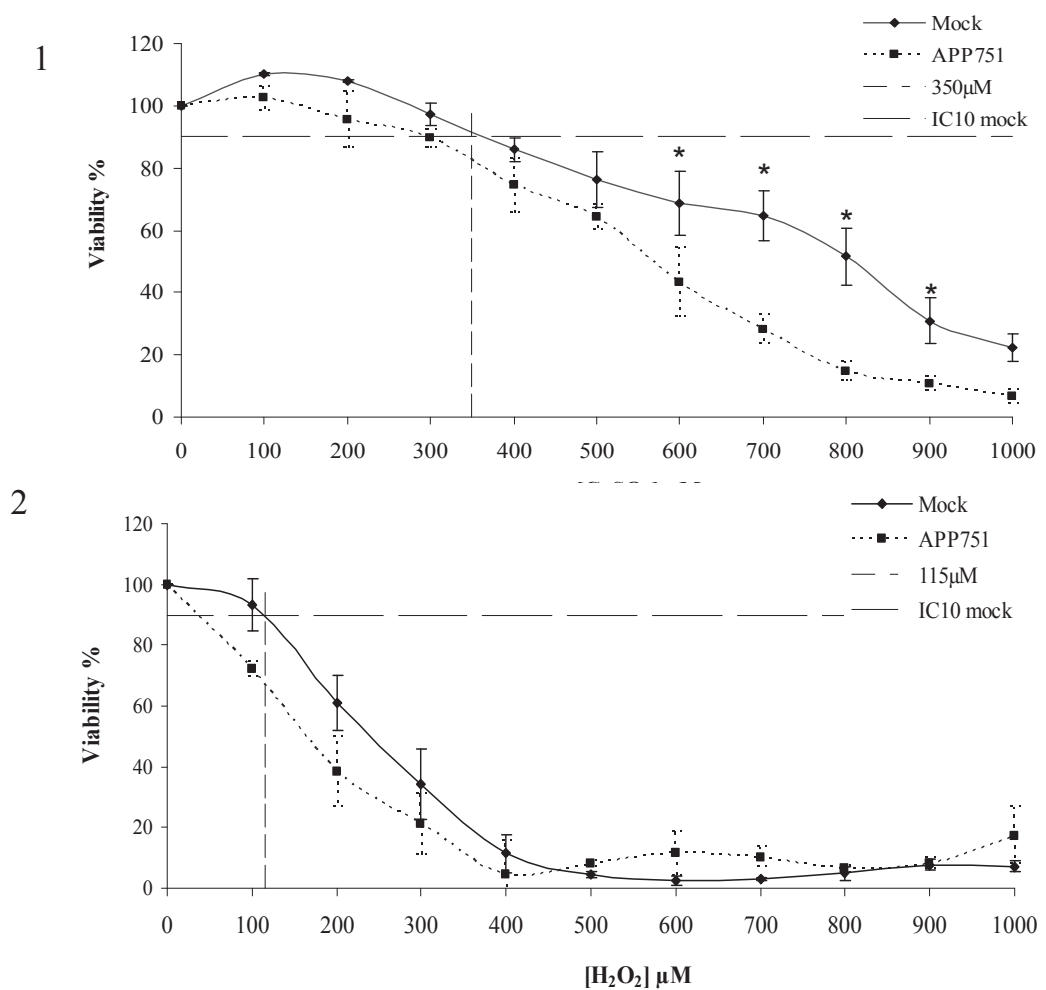


**SUPPLEMENTAL FIGURE C: CuSO<sub>4</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity**

After plating, mock and APP751-expressing cells were allowed to grow for 48h. Subsequently, 10 concentrations of either CuSO<sub>4</sub> (1) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) ranging from 100µM to 1 mM were added to the cell culture media, for additional 24h. Media was then removed and replaced by fresh one for 24h. MTT was added to the cell culture media at a final concentration of 0.5 mg/mL and left for 2h. MTT-containing media was removed and replaced by 200 µL DMSO. Absorbance was finally read at 565 nm and allowed calculation of the percentage of viable cells. No significant differences in cell viability were found for either CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -induced stress. Thus IC<sub>10</sub> of the mock cell line was used for further treatment for both compounds.

\*data significantly different ( $p < 0.05$ ) from APP751 cells

**Supplemental Fig. C.**



**TABLE A: Primer sets used for real-time quantitative PCR.** T<sub>m</sub> (melting temperature) is expressed in °C. Product size is expressed in base pairs (bps).

Gene	GenBank entry	Forward primer sequence	T <sub>m</sub>	Reverse primer sequence	T <sub>m</sub>	Product size
APE1	<a href="#">NM_001641.2</a>	gctgcctggactctctcatc	64	gctgttaccagcacaacga	60	180
APTX	<a href="#">NM_175073.1</a>	cagcgaatcagactccaca	60	gagtcaatgctggtgggatt	60	167
CycloB	<a href="#">NM_000942.4</a>	gcaagatcagagtgagaag	62	cttggaatgtgaggggagt	62	171
GAPDH	<a href="#">NM_002046.3</a>	gagtcaacggatttggtcgt	60	ttgattttggaggatctcg	58	238
LigI	<a href="#">NM_000234.1</a>	aggagtggaatggagtggtg	62	aggtgtcagagaggaagca	62	207
LigIII	<a href="#">NM_013975.2</a>	gctcagcaggagatggttc	62	tctaggtcccgtccatatac	62	160
MYH	<a href="#">NM_012222.2</a>	ccagagagtggagcaggaac	64	tttctggggaagttgaccac	60	156
OGG1	<a href="#">NM_002542.5</a>	aagaaattcccaagcacct	64	ttagecgtgtctccctcaat	64	176
PARP1	<a href="#">NM_001618.3</a>	gctcctgaacaatgcagaca	60	cattgtgtgtggttgcata	58	233
PCNA	<a href="#">NM_002592.2</a>	ggctctagcctgacaaatgc	62	gcctccaacaccttctgag	62	224
polβ	<a href="#">NM_002690.1</a>	gagaagaacgtgagccaagc	62	cgtatcatcctgccaatct	60	204
S18	<a href="#">NR_003286.2</a>	aacgtctgcctatcaacttt	60	tggatgtggtagccgttttct	62	117
UNG	<a href="#">NM_080911.1</a>	aatggcagctgtatccaacc	60	cacccaacatctgtcactg	62	247
XRCC1	<a href="#">NM_006297.2</a>	cagccctacagcaaggactc	64	gctgtgactggggatgtctt	62	209

**TABLE B: Sequences of the modified oligonucleotides used.** The 5'-3' sequences of the spotted support ODNs, long ODNs and lesion ODNs are listed here. All of the lesion ODNs were labeled with Cy3 at the 3'-end. The lesions were located 6-9 bases from the 3'-end of the ODNs and, when possible, positioned within an identical sequence context. X= modified base; in bold: cleaved base; \*: lesion analyzed in this study

Spot I.D.	Support ODNs	Long ODNs	Lesion ODNs	Lesion I.D.
<b>CS</b>	Control Sup	-	Compl	Control Sup.
<b>H</b>	<b>H20</b> TTT TT CCA CAC GGT AGG TAT CAG TC	<b>H42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GGA CTG ATA CCT ACC GTG TGG	<b>8oxoG-v2</b> CAC TTC GGA TCG <b>TXA</b> CTG ATC T	<b>8oxoG-C*</b>
<b>I</b>	<b>I20</b> TTT TT ATC CGT TCT ACA GCC GTA CA	<b>icMYH</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GTG TAC GGC TGT AGA ACG GAT	<b>Control</b> CAC TTC GGA TCG TGA CTG ATC T	<b>A8oxoG*</b>
<b>J</b>	<b>J20</b> TTT TT ACC ATC GCT TCC AGA GAC TC	<b>J42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GGA GTC TCT GGA AGC GAT GGT	<b>Tglycol</b> CAC TTC GGA TCG TGA CXG ATC T	<b>Tg-A*</b>
<b>K</b>	<b>K20</b>	<b>K42</b>	<b>THF</b> CAC TTC GGA TCG TGA CXG ATC T	<b>THF-A*</b>
<b>L</b>	<b>L20</b> TTT TT ACG TCA TGT GCG TCT TGA CC	<b>L42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GGG TCA AGA CGC ACA TGA CGT	<b>Control</b> CAC TTC GGA TCG TGA CTT ATC T	<b>Control*</b>
<b>N</b>	<b>N20</b> TTT TT CGA GTA GTG CTA TCG ACG TT	<b>N42TDG6</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GAA CGT CGA TAG CAC TAC TCG	<b>Control</b> CAC TTC GGA TCG TGA CTT ATC T	<b>T-CpG</b>
<b>P</b>	<b>P20</b> TTT TT GCA GGT TCG GTA CAC GCA TT	<b>P42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GAA TGC GTG TAC CGA ACC TGC	<b>Hypoxanthine</b> CAC TTC GGA TCG TGX CTG ATC T	<b>HxT*</b>
<b>Q</b>	<b>Q20</b>	<b>Q42</b>	<b>dHT</b> CAC TTC GGA TCG TGA CXG ATC T	<b>dHT-A*</b>
<b>A</b>	<b>ZIPA20</b> TTT TT TGA CCT CAG CAC TGA CCT CA	<b>ZIPA42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GTG AGG TCA GTG CTG AGG TCA	<b>EthdA</b> CAC TTC GGA TCG TGX CTG ATC T	<b>EthA-T*</b>
<b>E</b>	<b>ZIPE20</b>	<b>ZIPE42-TDG</b>	<b>TDG</b>	<b>T-G</b>
<b>O</b>	<b>ZIPO20</b> TTT TT AGC ACC TGA CAT CGA TCG CA	<b>ZIPO-42</b> AGA TCA GTC ACG ATC CGA AGT GTG CGA TCG ATG TCA GGT GCT	<b>Uracil</b> CAC TTC GGA TCG TGA <b>XTG</b> ATC T	<b>U-G</b>
<b>U</b>	<b>ZIPU20</b>	<b>ZIPU-42</b> AGA TCA ATC ACG ATC CGA AGT GAA GGT AGG TGC TGT ACC GCA	<b>Uracil</b> CAC TTC GGA TCG TGA <b>XTG</b> ATC T	<b>U-A*</b>