



HAL
open science

Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : de nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN

Guillaume Gines

► To cite this version:

Guillaume Gines. Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : de nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : . tel-00947524v1

HAL Id: tel-00947524

<https://theses.hal.science/tel-00947524v1>

Submitted on 19 Feb 2014 (v1), last revised 19 Feb 2014 (v2)

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 : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Guillaume GINES

Thèse dirigée par le **Dr Didier GASPARUTTO**

préparée au sein du **Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques**
SCIB (UMR-E3 CEA/UJF) / INAC / CEA Grenoble

dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : De nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN

Thèse soutenue publiquement le **04 Octobre 2013**

devant le jury composé de :

Dr. Marie DUTREIX

Directeur de recherche CNRS, Institut Curie (Présidente)

Dr. Bertrand CASTAING

Directeur de recherche CNRS, CNRS Orléans (Rapporteur)

Pr. Anthony ROMIEU

Professeur, Université de Bourgogne (Rapporteur)

Dr. Carole CHAIX

Directeur de recherche CNRS, Université Lyon 1 (Examinatrice)

Dr. Alain IBANEZ

Directeur de recherche CNRS, Institut Néel (Examineur)

Dr. Didier GASPARUTTO

Directeur de recherche CEA, CEA Grenoble (Directeur de Thèse)



Remerciements

Ces trois années et demie passées au LAN m'ont inévitablement conduit à rencontrer des personnes d'une grande richesse scientifique mais également humaine. Devant cette nouvelle page Word® vierge, c'est l'occasion pour moi de les remercier pour leur contribution à ce travail de thèse, entre autres...

Je remercie chaleureusement les membres du jury, Dr. Marie Dutreix, Dr. Bertrand Castaing, Pr. Anthony Romieu, Dr. Carole Chaix et Dr. Alain Ibanez. Merci d'avoir accepté de juger ce manuscrit et d'avoir mis en perspectives ce travail au travers de vos différentes sensibilités scientifiques. Merci également au Dr. Jean-François Constant pour sa participation aux comités de suivi de thèse.

Au Dr. Didier Gasparutto pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce sujet: Chef, merci pour ta confiance, ta disponibilité, ta curiosité scientifique qui ont permis à cette thèse d'avancer dans diverses directions et m'ont permis de m'épanouir dans la recherche. J'ai beaucoup appris à tes cotés et je retiendrais une leçon: "Si tu penses qu'une réaction n'a pas marché car tu n'as toujours qu'un seul pic en HPLC, regarde dans le lavage"...

J'en profite pour remercier l'HP1200, qui n'a eu de cesse d'analyser et de purifier mes petites sondes colorées, sans faille depuis le début de cette aventure (sauf une lampe UV à changer, mais tout le monde a ses coûts de moins bien...). Tu resteras mon éternelle confidente, celle à qui j'exprime ma joie ("j'ai l'ADN, le fluo et le quencher, plus que la masse et c'est ok !"), mes doutes (il ya a beaucoup de pics là quand même...), mes peines ("loupé, la prochaine fois je ferais sonner le timer 3 minutes plus tôt"), mes colères ("t'es sur que c'est le bon chromatogramme, parce que là, c'est n'importe quoi !").

Je remercie également l'ensemble des LANistes ou assimilés. Merci à Thierry Douki d'avoir accepté que je fasse partie de cette jolie équipe. Merci Mélanie de m'avoir mis le pied à l'étrier et pour ton éternel optimisme. Merci Christine, d'avoir essayé de (et réussi à) faire voler mes oligos purifiés par PAGE, comparable à faire décoller un A380 embourbé en fin de piste. Merci pour ta gentillesse et ton aide au cours de ces presque 4 ans. Merci Sylvain pour les anecdotes insolites du matin, pour les nombreux produits "prêtés", pour ces ballades en vélo... A quand la croix de fer ? Merci à la promo de doctorants du LAN 2010-2013. Camille, Mohamed, Ewa, Florence, ce fut un plaisir de partager cette expérience avec vous et je vous souhaite le meilleur pour la suite. Merci Charlotte, stagiaire de choc, pour ta contribution à ce travail. C'est avec toi que j'ai mis les pieds en salle culture pour la première fois et ce fut très agréable de partager ce projet. Garde à l'esprit que les bactéries sont nos amis, sauf sous la hotte ^^.

Merci à Sylvie, Serge, Thierry, Jean-Luc, Marie, Jean et Walid pour la pluridipl..., pluridiscipla..., pour la richesse des

activités scientifiques que vous portez qui est un vrai "plus" pour notre formation. Merci également à mes "co-bureau", Mélanie, Coralie, Momo, Iza et Nadège pour la richesse des conversations non scientifiques, ça ne fait pas de mal de temps en temps... Merci Zohra pour ta gentillesse et surtout ta patience: autant le BER n'a pratiquement plus de secrets pour moi, autant les démarches administratives restent un mystère à mes yeux.

Une thèse c'est aussi l'occasion de faire de nouvelles rencontres au travers de différentes collaborations/interactions. A ce titre, j'adresse mes remerciements à Florence Duclair, Yves Chenavier (message personnel: elle était excellente!), Emmanuel Picard, Nathalie Berthet, Marc C. Rideout, Xavier Gidrol, Eric Sulpice, Walid Rachidi, Patrice Rannou, Robert Ferrier, Alain Ibanez, Fabien Dubois, Ferial Melaine. De la biologie à la chimie en passant par la physique, chaque discussion a été pour moi l'occasion de m'enrichir.

J'adresse un remerciement particulier à Véronique Collin-Faure pour sa gentillesse, sa disponibilité, son expertise en cytométrie et sa patience... et il en faut pour passer les centaines d'échantillons sur ce bon vieux et fiable FACScalibur® !

Au-delà de cette thèse, cela fait maintenant 8 ans que je me suis expatrié de ma Drôme natale pour atterrir dans cette mignonne "bourgade" grenobloise et rencontrer de nouvelles personnes, des "potes", des amis ...

A la "CHBI" team, un grand merci d'être VOUS. Peu importe la chronologie de notre rencontre, vous avez une place toute particulière dans ma vie. Grazie, Chlochlo, Ococ, Patou, Jojo, Adri, Matt, Will, que la CHBI touch rayonne aux travers des continents et des siècles !

Merci à la belle brochette d'AS et pièces rapportées: Gulie, Antho, Malo, Kiki, Renaud, Virg', Brice, Laura, Flo, je le répète une dernière fois, la science ne se réduit pas aux becs bunsen, aux paillasses et aux tubes à essai !

Parfois, il a été important de passer mes nerfs sur un ballon rond. J'ai donc repris le volley et fais à cette occasion d'agréables rencontres. Merci aux Niafango, de m'avoir accepté dans cette belle équipe où le sport précède généralement une bonne soirée autour d'une bière fraîche... ou deux.

Finalement, Apo, Guillaume, *keep headbanging*, Mika, *keep believing in your dreams*, Adé, *keep ping-ponging*, Alison, *keep contrasting*, CEP, *keep rocking* ...

On choisit ses amis, son labo d'accueil, la couleur de la reliure du manuscrit, mais on ne choisit pas sa famille. Cet adage me rappelle chaque jour que je suis drôlement bien tombé. A ma famille, mes parents et mes frères, j'adresse toute ma reconnaissance. Papa, Maman, je vous remercie pour votre soutien et j'espère que vous n'êtes pas déçu de voir qu'à 26 ans, je joue encore aux billes.

Enfin, MERCI Marie, pour ta compréhension, ton soutien et ton amour.

SOMMAIRE

LISTE DES ILLUSTRATIONS	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES	11
I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1 L'ADN, de sa structure chimique à ses fonctions biologiques.....	16
2 Les lésions de l'ADN.....	21
3 Conséquences biologiques des dommages de l'ADN et réponses cellulaires associées.....	39
4 La réparation de l'ADN	43
5 La réparation par excision de base (BER)	61
6 Mesure des activités de réparation de l'ADN.....	92
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	114
I I CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES SONDÉS NUCLÉIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA RÉPARATION DE L'ADN	117
1 Conception générale des sondes.....	118
2 Séquences.....	120
3 Synthèse des oligonucléotides modifiés	123
4 Caractérisation des sondes.....	127
I I I DÉTECTION D'ACTIVITÉS DE RÉPARATION PAR EXCISION DE BASE PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE	133
1 Principe	134
2 Choix du matériel et de la chimie de greffage	135
3 Fonctionnalisation des billes magnétiques	136
4 Applications à l'étude de la réparation de l'ADN	140
5 Conclusion et Limitations	149
I V ANALYSE DE LA RÉPARATION PAR EXCISION DE BASE PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX.....	151
1 La cytométrie en flux : principe et fonctionnement.....	152
2 Stratégies	154
3 Caractérisation et calibration des billes par cytométrie en flux.	155
4 Détection « signal off » vs « signal on »	158
5 Optimisations de la détection par cytométrie en flux	166
6 Expériences applicatives.....	173
7 Conclusion	180

V	DÉTECTION MULTIPLEXÉE DES ACTIVITÉS GLYCOSYLASES ET AP-ENDONUCLÉASES	181
1	Approche « 1 sonde = 1 lésion = 1 fluorophore »	182
2	Encodage des billes magnétiques.....	187
3	Conclusion et Perspectives	203
VI	DÉTECTION DES ACTIVITÉS DE RÉPARATION PAR EXCISION DE BASE IN CELLULO.....	205
1	Définition du protocole & choix du modèle cellulaire	206
2	Conditions de transfection	208
3	Détection de l'activité APE1 in cellulo.....	212
4	Conclusion	223
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	224
5	Conception des sondes nucléiques	225
6	Détection des activités de réparation des lésions de l'ADN in vitro	226
7	Détection des activités de réparation des lésions de l'ADN in cellulo	230
VII	MATÉRIELS & MÉTHODES.....	233
1	Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques.....	234
2	Caractérisation et fonctionnalité des sondes.....	236
3	Immobilisation des sondes sur Dynabeads M-280 Strepta.....	237
4	Encodage et immobilisation des sondes sur particules magnétiques biotinylées	237
5	Digestions enzymatiques.....	238
6	Protocoles relatifs aux cellules	240
	BIBLIOGRAPHIE	245
	ANNEXES.....	295
	Annexe 1 : Chromatogrammes HPLC des oligonucléotides non lésés Pst1	296
	Annexe 2 : Rapport de stage de Charlotte Brusa (de janvier à juin 2012)	298
	Annexe 3 : Liste des communications scientifiques et publications	324

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Chronologie de la découverte à la caractérisation de l'ADN.....	17
Figure 2: Structure chimique de l'ADN	18
Figure 3: Principaux sites d'hydrolyse, d'oxydation et d'alkylation de l'ADN.....	28
Figure 4: Exemples de molécules alkylantes et dommages induits.	29
Figure 5: Principales lésions des bases de l'ADN.	33
Figure 6: Produits de photoréaction entre deux thymidines adjacentes.....	34
Figure 7: Mécanismes biochimiques impliqués dans la DDR.....	41
Figure 8: Diversité des lésions de l'ADN et systèmes de réparation associés.....	46
Figure 9: Réparation par réversion directe des bases alkylées et des lésions UV.....	48
Figure 10: Réparation par excision de nucléotides (NER)	53
Figure 11: Réparation des mésappariements (MMR).	56
Figure 12: Réparation des cassures double brin (HR et NHEJ)	59
Figure 13: Réparation par excision de base (BER)	68
Figure 14: Formation et réparation de l'uracile et de ses analogues.....	71
Figure 15: Réparation de la 8-oxoguanine chez les mammifères.....	74
Figure 16: Schéma des mécanismes de diversification des anticorps.dans l'immunité adaptative	80
Figure 17: Mécanismes de déméthylation active de l'ADN.....	82
Figure 18: Principe de détection des cassures de l'ADN par le test des comètes ou le test Halo.	95
Figure 19: Techniques chromatographiques appliquées à la détection des adduits de l'ADN.....	100
Figure 20: Principe du test de réactivation en cellule hôte (HCR).....	102
Figure 21: Détection d'activités de réparation de l'ADN par transfection de "molecular beacons"..	103
Figure 22: Détection des activités ADN <i>N</i> -glycosylases et AP-endonucléases avec des oligonucléotides synthétiques lésés.	111
Figure 23: Biopuce pour la détection d'activités du BER ; adapté de Flaender et al. 2010.....	112
Figure 24: Représentation schématique des sondes nucléiques utilisées dans cette étude.	119
Figure 25: Sites de restriction des enzymes <i>EcoR1</i> et <i>Pst1</i>	121
Figure 26: Cycle de condensation de la synthèse par la voie phosphoramidite.	123
Figure 27: Structures chimiques des synthons utilisés pour la fonctionnalisation des sondes.....	125
Figure 28: Profil chromatographique de la sonde <i>Pst1-Q</i> analysée par HPLC	127
Figure 29: Spectres d'absorbance UV-visible enregistrés pour les sondes <i>Pst1</i> fluorescentes et quenchées.	128
Figure 30: Signal d'émission de fluorescence des sondes <i>Pst1</i> fluorescentes et quenchées.....	129
Figure 31: Analyse des sondes fluorescentes par spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	130
Figure 32: Analyse MALDI-ToF de la digestion enzymatique des sondes fluorescentes.....	131
Figure 33: Principe de la détection d'activités enzymatiques par spectrofluorimétrie	134
Figure 34: Calibration du fluorimètre en goutte	137
Figure 35: Caractérisation de l'immobilisation des sondes nucléiques sur microbilles.	138
Figure 36: Détection de l'activité d'enzymes de restriction.....	139
Figure 37: Analyse comparée de la détection des activités APE1 et AAG par spectrofluorimétrie et par PAGE.....	141

Figure 38: Choix de tampon pour la détection des activités AAG/APE1	143
Figure 39: Effet de l'immobilisation des sondes sur microbilles.	144
Figure 40: Détection par spectrofluorimétrie et PAGE des activités AAG et APE1 au sein d'extraits nucléaires HeLa.	146
Figure 41: Mise en évidence de l'inhibition de l'AP-endonucléase par la méthoxyamine.....	147
Figure 42: Détermination de l'IC50 de la méthoxyamine vis-à-vis de APE1.....	148
Figure 43: Représentation schématique du fonctionnement d'un cytomètre en flux.....	153
Figure 44: Principe de détection par cytométrie en flux d'activités du BER	154
Figure 45: Analyse des microbilles D par cytométrie en flux	156
Figure 46: Calibration du cytomètre.	157
Figure 47: Comparaison des stratégies « signal on » et « signal off » pour la détection de l'activité d'enzymes purifiées.....	158
Figure 48: Cinétique de coupure des sondes <i>ODN-Q</i> supportées par les enzymes purifiées.....	160
Figure 49: Détection par cytométrie en flux (« signal on ») des activités enzymatiques ciblées au sein d'extraits nucléaires HeLa.	161
Figure 50: Normalisation des données par rapport au témoin négatif.....	163
Figure 51: Effet de la complémentation de l'extrait HeLa avec l'AAG purifiée	164
Figure 52: Mise en évidence de la dégradation de la sonde <i>Pst1-Q</i> dans un extrait nucléaire de cellules HeLa.....	165
Figure 53: Evaluation de la stabilité des sondes <i>Q2</i> dans un extrait nucléaire de cellules HeLa.	166
Figure 54: Optimisation du choix des chromophores.	168
Figure 55: Analyse par cytométrie en flux de la digestion des sondes <i>Pst1-Q4</i> et <i>THF-Q4</i> supportées sur billes K par les enzymes purifiées.....	169
Figure 56: Analyse par cytométrie en flux de la digestion de la sonde <i>Ura-Q4</i> supportée sur billes K par l'UDG purifiée.....	170
Figure 57: Validation de la spécificité des sondes pour la détection des enzymes ciblées.....	171
Figure 58: Cinétique de coupure des sondes <i>ODN-Q4</i> supportées sur billes K par les enzymes purifiées.....	172
Figure 59: Détection des activités APE1 et UNG à partir d'un extrait nucléaire de cellules HeLa.	174
Figure 60: Principe de l'inhibition de la production de la protéine APE1 par interférence à ARN. ...	176
Figure 61: Mise en évidence de la stabilité des sondes <i>Q4</i> au sein des extraits nucléaires.	177
Figure 62: Détection de l'activité APE1 à partir des extraits nucléaires de cellules KD-CTRL et KD-APE1.	178
Figure 63: Effet de la méthoxyamine sur la coupure de la sonde <i>Ino-F</i> par les extraits KD-CTRL et KD-APE1.	179
Figure 64: Principe de la détection multiplexée (« 1 sonde = 1 couleur »).....	183
Figure 65: Détection multiplexée (« 1 sonde = 1 couleur ») d'enzymes purifiées	184
Figure 66: Conditions de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET).	185
Figure 67: Mise en évidence d'un effet FRET entre la cy3 et la cy5.	185
Figure 68: Détection de l'activité APE1 au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa (« 1 sonde = 1 couleur »)	186
Figure 70: Principe de détection multiplexée par encodage des microbilles.....	191
Figure 71: Estimation du taux de greffage de streptavidines sur les billes biotinylées K.....	193
Figure 72: Mise au point de l'encodage des billes K.....	194
Figure 73: Estimation de la quantité d'oligonucléotides nécessaire pour la saturation des billes encodées.	195

Figure 74: Effet de la fonctionnalisation par les sondes sur la fluorescence des billes encodées.	196
Figure 75: Analyse des données par cytométrie en flux pour un test triplexe.....	197
Figure 76: Effet de l'encodage sur la détection de l'activité APE1 purifiée.	198
Figure 77: Test triplexe de détection d'activités enzymatiques purifiées.....	199
Figure 78: Test triplexe de détection des activités APE1 et UNG au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa.....	200
Figure 79: Mise en évidence de l'inhibiteur d'UNG par l'Ugi, dans un extrait nucléaire de cellules HeLa.	202
Figure 80: Inhibiteur d'UDG purifiée par Ugi.....	203
Figure 81: Plan d'expérience pour la détection d'activités du BER in cellulo.....	207
Figure 82: Choix de l'agent de transfection des lignées LN428	210
Figure 83: Cinétique de transfection des cellules LN428 par une sonde fluorescente.....	212
Figure 84: Cinétique de transfection des lignées KD-CTRL et KD-APE1 avec les sondes fluorescentes et quenchées.....	213
Figure 85: Stratégies de co-transfection des sondes Q4 avec un contrôle interne.	216
Figure 86: Définition d'un contrôle interne pour la normalisation des résultats de transfection.....	218
Figure 87: Analyse et normalisation des données de co-transfection.....	220
Figure 88: Détection de l'activité APE1 dans les lignées KD-CTRL et KD-APE1.	222

Tableau 1: Glycosylases humaines et leurs substrats	63
Tableau 2: Protéines impliquées dans le nettoyage des extrémités (« gap tailoring »)	65
Tableau 3 : Effet de la dérégulation de protéines du BER sur l'efficacité de la chimio- ou radiothérapie.....	88
Tableau 4: Détection de la réparation par excision de base avec des oligonucléotides synthétiques contenant une lésion.....	109
Tableau 5: Structures des lésions introduites.	121
Tableau 6: Séquences, nomenclature et représentation schématique des sondes nucléiques utilisées dans la présente étude.....	122
Tableau 7: Données générées à partir du test triplexe présenté en Figure 75.....	197
Tableau 8: Enzymes utilisées, provenance et tampons correspondants.....	239
Tableau 9: Réglages standards du cytomètre	239

Encart 1: Le cycle cellulaire.....	42
Encart 2: Fluorescence et Quenching	108

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

6-4 PP	pyrimidine (6-4) pyrimidone (<i>6-4 photoproduct</i>)
8-oxoG	8-oxoguanine
A	Adénine
AAG	Alkyl adenine <i>N</i> -glycosylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	Activation-induced (DNA-cytosine) deaminase
AOA1	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type I
AP	Apurinique/Apyrimidique
APE1	AP-endonucléase 1
APTX	Aprataxine
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
AT	Agent de transfection
A-T	Ataxie-Télangiectasie
ATLD	Ataxia Telangiectasia-Like Disorder
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related
BER	Réparation par excision de base (<i>base excision repair</i>)
BHQ2	Black Hole Quencher 2
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>bovin serum albumin</i>)
C	Cytosine
CDB	Cassure double brin
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CPD	Dimère de pyrimidines de type cyclobutane (<i>cyclobutane pyrimidine dimer</i>)
CPG	« Controlled Pore Glass »
CS	Syndrome de Cockayne (<i>Cockayne syndrome</i>)
CSB	Cassure simple brin
CSR	Commutation isotypique (<i>class switch recombination</i>)
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
dAM(D,T)P	Désoxyadénosine mono(di, tri)phosphate
dCM(D,T)P	Désoxycytidine mono(di, tri)phosphate
DDR	Réponse aux dommages de l'ADN (<i>DNA damage response</i>)
dGM(D,T)P	Désoxyguanosine mono(di, tri)phosphate
DMS	sulfate de diméthyle (<i>dimethyl sulfate</i>)
DMT	Diméthoxytrityle
dRP	Désoxyribophosphate
DTT	Dithiotréitol
dUM(D, T)P	Désoxyuridine mono(di, tri)phosphate
EC	Détection électrochimique (<i>electrochemical detection</i>)
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGTA	Acide éthylène glycol tétra-acétique (<i>ethyleneglycoltetraacetic acid</i>)
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
ESI	Ionisation par électronébuliseur (<i>electrospray ionization</i>)
FC	Cytométrie en flux (<i>flow cytometry</i>)
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FIX	Détecteur de fluorescence X

Fpg	Formamidopyrimidine DNA <i>N</i> -glycosylase
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
G	Guanine
GC	Chromatographie en phase gazeuse (<i>gas chromatography</i>)
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCR	test de réactivation en cellule hôte (<i>host-cell reactivation</i>)
HENU	2-hydroxyéthylnitrosourée
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIGM	Syndrome hyper IgM (<i>hyper IgM syndrome</i>)
HPLC	Chromatographie liquide haute performante (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	Réparation par recombinaison homologue (<i>homologous recombination</i>)
IC50	Concentration inhibitrice médiane (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
Ino	Inosine
KD	« Knock down »
KO	« Knock out »
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice (<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>)
MAP	Polypose associée à MUTYH (<i>MYH-associated polyposis</i>)
MCSZ	Microcéphalie accompagnée d'épilepsie (<i>microcephaly with seizures</i>)
MGMT	méthylguanine-ADN méthyltransférase
MMR	Réparation des mésappariements (<i>mismatch repair</i>)
MMS	méthanesulfonate de méthyle (<i>methyl methanesulfonate</i>)
MNNG	Méthylnitronitrosoguanidine (<i>methylnitronitrosoguanidine</i>)
MNU	N-méthyl-N-nitrosourée (<i>N-methyl N-nitroso urea</i>)
MS	Spectrométrie de masse (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en mode tandem
Mx	Méthoxyamine
NBS	Syndrome de Nimègue (<i>Nijmegen breakage syndrome</i>)
NER	Réparation par excision de nucléotides (<i>nucleotide excision repair</i>)
NHEJ	Réparation par suture des extrémités (<i>non-homologous end joining</i>)
NIR	Réparation par incision de nucléotide (<i>nucleotide incision repair</i>)
NLS	Signal de localisation nucléaire (<i>nuclear localisation signal</i>)
NNN	N'-nitrososornicotine
ODN	oligonucléotide
OGG1	8-oxoguanine DNA <i>N</i> -glycosylase 1
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymérase
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	Paire de bases
PNA	Acide nucléique peptidique (<i>peptide nucleic acid</i>)
PNK	Polynucléotide kinase
Ps	Photosensibilisateur
RFU	Unité de fluorescence relative (<i>relative fluorescence unit</i>)
RR	Réparation par réversion (<i>reverse repair</i>)
SAM	S-adénosylméthionine
SCAN1	Ataxie spino-cérébelleuse avec neuropathie axonale de type I (<i>spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy</i>)
SDS	dodécylsulfate de sodium (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)

shARN	Small hairpin ARN
SHM	Somatic hypermutation (<i>hypermutation somatique</i>)
siARN	ARN interférent (<i>small interfering RNA</i>)
SNP	Polymorphisme nucléotidique (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
STNR	Rapport signal sur bruit (<i>signal to noise ratio</i>)
T	Thymine
T4-PNK	T4-polynucléotide kinase
TBE	Tris-Borate-EDTA
TDG	Thymine DNA N-glycosylase
TDP1	Tyrosyl ADN-phosphodiesterase
TEAA	Acétate de triéthylammonium (<i>triethylammonium acetate</i>)
TEL	Transfert d'énergie linéique
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
THF	Tétrahydrofurane
TM(D,T)P	Thymidine mono(di, tri)phosphate
TMZ	Témazolomide
ToF	Temps de vol (<i>time of flight</i>)
Top1	Topoisomérase 1
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
TTD	Trichothiodystrophie
U	Uracile
u	Unité (enzymatique)
u.a.	Unité arbitraire
Ugi	Uracil DNA N-glycosylase inhibitor
UNG	Uracil N-glycosylase
UV	Ultra-violet
XP	Xeroderma Pigmentosum

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1	L'ADN, de sa structure chimique à ses fonctions biologiques.....	16
	1.1. <i>Un peu d'Histoire</i>	16
	1.2. <i>Structure chimique de l'acide désoxyribonucléique</i>	18
	1.3. <i>Fonctions biologiques de la biomolécule d'ADN</i>	20
2	Les lésions de l'ADN.....	21
	2.1. <i>L'Hydrolyse</i>	21
	2.2. <i>L'Oxydation</i>	23
	2.3. <i>L'Alkylation</i>	26
	2.4. <i>Les Réactions photochimiques</i>	34
	2.5. <i>Les Dommages radio-induits</i>	36
	2.6. <i>Les Mésappariements</i>	37
3	Conséquences biologiques des dommages de l'ADN et réponses cellulaires associées	39
4	La réparation de l'ADN	43
	4.1. <i>La réparation par réversion directe</i>	46
	4.2. <i>La réparation par excision de base</i>	49
	4.3. <i>La réparation par excision de nucléotides</i>	49
	4.4. <i>La réparation des mésappariements</i>	54
	4.5. <i>La réparation des cassures double brin</i>	57
5	La réparation par excision de base (BER)	61
	5.1. <i>Biochimie du système BER</i>	62
	5.2. <i>Réparation de l'uracile : des activités spécifiques et redondantes</i>	68
	5.3. <i>Réparation de la 8-oxoguanine : un arsenal protéique anti-mutation</i>	72
	5.4. <i>Réparation des purines alkylées et de l'hypoxanthine : une glycosylase unique à spectre large</i>	75
	5.5. <i>L'AP-endonucléase 1</i>	76
	5.6. <i>Le BER, au-delà de la réparation de l'ADN</i>	78
	5.7. <i>Maladies associées à des déficiences du BER</i>	83
	5.8. <i>Quand BER rime avec cancer</i>	85
6	Mesure des activités de réparation de l'ADN.....	92
	6.1. <i>Introduction</i>	92
	6.2. <i>Détection in cellulo</i>	93
	6.3. <i>Détection in vitro</i>	104

1. L'ADN, de sa structure chimique à ses fonctions biologiques

« Acide Désoxyribonucléique » : 23 lettres compactées sous l'acronyme « ADN ». Voici près d'un siècle et demi que cette molécule ne cesse de faire parler d'elle : « *Dans mes expériences avec des solutions faiblement alcalines, lors de la neutralisation de la solution, j'ai pu obtenir des précipités qui ne pouvaient pas être dissous, soit dans l'eau, l'acide acétique, l'acide chlorhydrique très dilué, ou dans des solutions de chlorure de sodium, et qui ne pouvaient donc appartenir à aucune protéine connue jusque là* »¹ (Friedrich Miescher, 1869), « *Nous souhaitons suggérer une structure pour le sel d'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette structure a de nouvelles caractéristiques qui sont d'un intérêt biologique considérable* »² (Francis Crick, 1953), « *Il semble probable que la plupart, sinon la totalité de l'information génétique dans chaque organisme est portée par l'acide nucléique - généralement par de l'ADN, bien que certains petits virus utilisent l'ARN comme matériel génétique.* »³ (Francis Crick, 1953), « *L'ADN humain est comme un programme d'ordinateur mais beaucoup, beaucoup plus avancé que n'importe quel logiciel jamais créé* »⁴ (Bill Gates, 1996), « *Et maintenant, l'annonce de Watson et Crick sur l'ADN. C'est pour moi la vraie preuve de l'existence de Dieu* »⁵ (Salvator Dali, 1991), « *La musique est dans mon ADN* »⁶ (Rihanna, 2010).

1.1. Un peu d'Histoire

La première preuve de l'existence de cette molécule est apportée en 1869 par Johann Friedrich Miescher, biologiste suisse spécialisé en histochimie. Alors qu'il travaille sur la caractérisation des composants de cellules leucocytaires provenant du pus de bandages frais de patients, il isole une substance blanche insoluble en milieu acide, soluble en milieu alcalin, dont la composition atomique est exempt de soufre mais riche en phosphore, caractéristique partagée par aucune protéine découverte jusqu'à lors. Ce précipité étant issu des seuls noyaux isolés, il le baptise

¹ "In my experiments with weakly alkaline solutions, when neutralising the solution, I could obtain precipitates that could not be dissolved either in water, acetic acid, very dilute hydrochloric acid, or in solutions of sodium chloride, and which thus could not belong to any of the hitherto known proteins."

² "We wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biologic interest."

³ "It seems likely that most if not all the genetic information in any organism is carried by nucleic acid - usually by DNA, although certain small viruses use RNA as their genetic material."

⁴ "Human DNA is like a computer program but far, far more advanced than any software ever created"

⁵ "And now the announcement of Watson and Crick about DNA. This is for me the real proof of the existence of God"

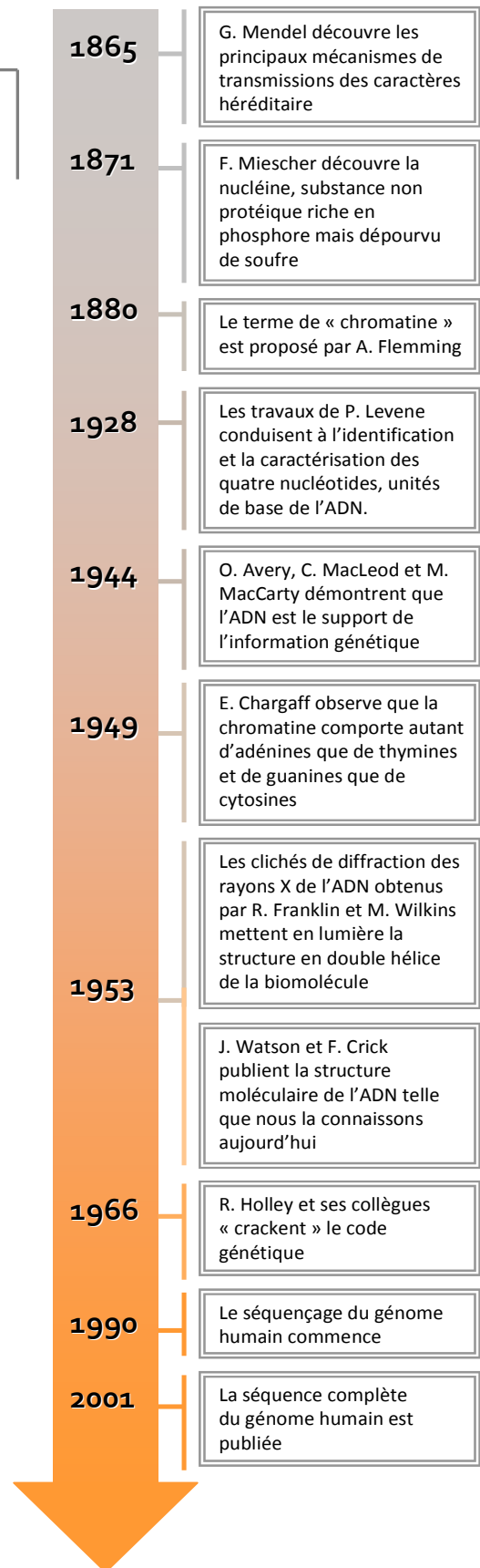
⁶ "Music is in my DNA!"

Figure 1: Chronologie de la découverte à la caractérisation de l'acide désoxyribonucléique (ADN).

« nucléine » (F. Miescher 1871). Après de nombreuses expériences menées sur ce nouveau composé, il spéculait sur le fait que cette molécule pourrait être responsable de la transmission des traits héréditaires (qu'évoquait Mendel en 1865), mais lui-même rejette cette idée.

Ce n'est que 75 ans après la découverte de cet acide nucléique particulier, que Oswald T. Avery [1] et subséquemment Alfred Hershey et Martha Chase [2], démontrent et confirment que l'ADN est le support de l'information génétique.

Une année seulement s'écoule pour que James Watson et Francis Crick publient la structure moléculaire de l'ADN [3], s'appuyant sur des décennies de recherche et de controverses. En effet, dès le début du XX^{ème} siècle, les travaux précurseurs de Phoebus Levene ont conduit à l'identification et la caractérisation des unités élémentaires composant la biomolécule, à savoir les quatre bases de l'ADN⁷ (adénine, thymine, guanine, cytosine) et de leur combinaison en « nucléotides » chacune associée à un désoxyribose et un groupement phosphate. Le terme d'« acide désoxyribonucléique » était désormais accepté. De cette découverte, il propose un modèle de la structure de l'ADN en tétranucléotide cyclique [4]. En 1949 Erwin Chargaff observe que l'ADN comporte autant d'adénines que de thymines et autant de guanines que de cytosines, ce qui tend à contredire la structure en tétranucléotide proposée



⁷ Empiriquement, on considère que l'ADN est composé de quatre unités élémentaires. Toutefois, des modifications épigénétiques peuvent conduire à d'autres bases considérées comme « naturelles ». La 5-méthylcytosine et la 5-hydroxyméthyluracile sont aujourd'hui surnommées respectivement la « cinquième » et la « sixième » base de l'ADN.

par Levene et réinstaura l'idée originale de Miescher de la structure macromoléculaire. Dès lors, plusieurs équipes commencent à étudier la structure chimique de l'ADN, notamment par diffraction des rayons X de molécules d'ADN purifiées. Les meilleurs clichés permettent d'observer que cette biomolécule est symétrique et possède des unités répétitives. Plusieurs scientifiques, tels que Pauling L. et Corey R. ou Watson J. et Crick F., proposent un modèle de l'ADN en triple hélice. Le schéma de diffraction d'ADN obtenu par Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, de meilleure qualité, tend à montrer que l'ADN serait sous la forme d'une double hélice. Des analyses complémentaires par microscopie électronique ont révélé que le diamètre de la biomolécule était de 20 Å, ce qui appuie cette hypothèse.

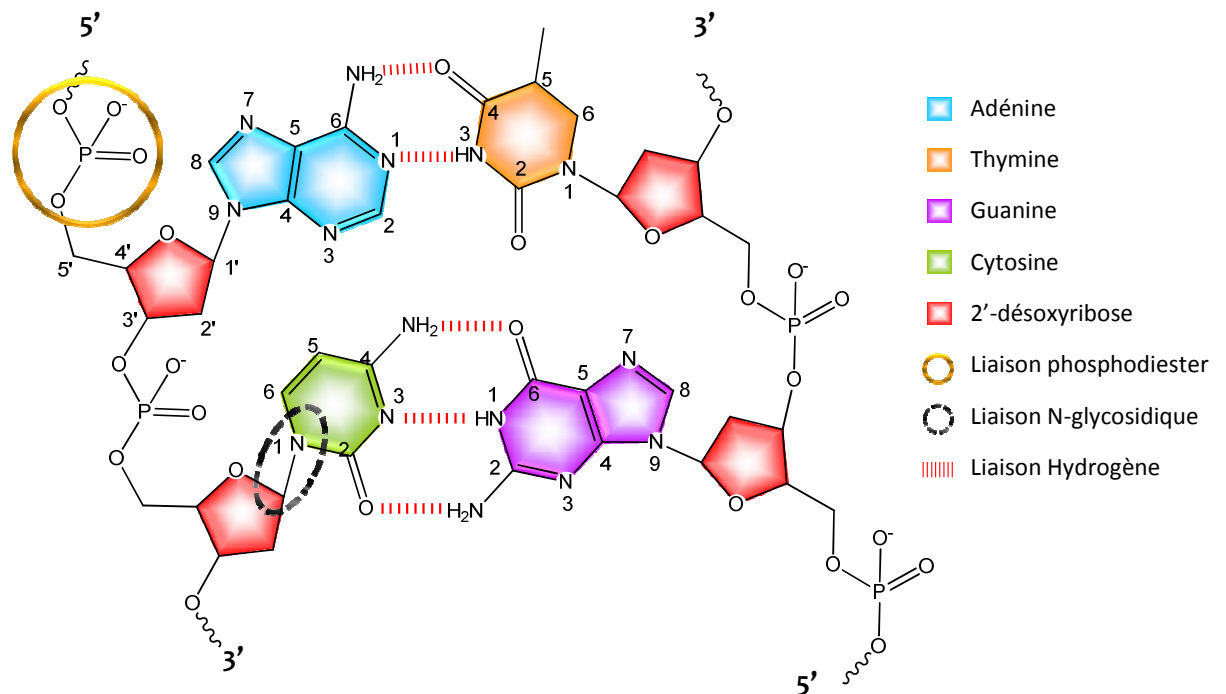


Figure 2 : Structure chimique de la complémentarité des quatre bases au sein de la molécule d'ADN

1.2. Structure chimique de l'acide désoxyribonucléique

Finalement, après plusieurs modèles erronés suggérés, Watson et Crick proposent la structure moléculaire de l'ADN communément admise aujourd'hui : cette molécule (Figure 2) est en fait composée de deux chaînes hélicoïdales « droites » enroulées l'une autour de l'autre le long d'un axe rectiligne. Le squelette de chacun des brins d'ADN est composé d'une alternance de sucres (β -D-désoxyribofuranoses ou désoxyriboses, dR) et de groupements phosphates : le carbone 1' de chaque sucre est lié covalamment à l'une des quatre bases azotées (la 5-méthyl cytosine étant équivalente à

la cytosine) par des liens 3'-5' phosphodiester. Les orientations (5' → 3') des deux brins étant antiparallèles, on distingue un grand sillon (large et profond) et un petit sillon (étroit et peu profond) qui permettent l'accès des protéines et leur fixation à la molécule bicaténaire par des interactions spécifiques (électrostatiques, van der Waals ou ponts hydrogène).

Les deux chaînes sont liées entre elles par des liaisons hydrogène entre une purine (adénine ou guanine) et une pyrimidine (thymine ou cytosine) situées perpendiculairement par rapport à l'axe de l'hélice, permettant une stabilisation supplémentaire de la double hélice par empilement des bases aromatiques (ou « π stacking »). L'antiparallélisme des brins, ainsi que la présence des formes tautomériques des bases les plus probables (forme céto plutôt que éno), privilégient deux combinaisons. Ainsi, l'adénine s'apparie à la thymine *via* deux liaisons hydrogène et la cytosine à la guanine par trois liaisons hydrogène. Cette complémentarité des bases, associée à la structure polymérique de l'ADN confèrent à cette molécule la propriété unique d'être porteuse de toute l'information génétique de chaque être vivant. *« Il s'ensuit que, dans une longue molécule de nombreuses permutations sont possibles, et il semble donc probable que la séquence précise des bases est le code qui porte l'information génétique. Si l'ordre réel des bases sur l'une des deux chaînes a été donné, on peut écrire l'ordre exact des bases sur l'autre, en raison de l'appariement spécifique. Ainsi, une chaîne est, pour ainsi dire, le complément de l'autre, et c'est cette caractéristique qui donne à penser comment la molécule d'acide désoxyribonucléique pourrait se dupliquer elle-même. »*⁸ [3]. Aujourd'hui ce mécanisme de duplication (appelé répllication pour l'ADN) est très bien caractérisé : il fait intervenir une série de protéines organisées en complexes enzymatiques appelés « réplisome ». Lors de ce processus, les deux chaînes d'ADN sont d'abord séparées puis, chaque brin sert de matrice pour que des enzymes spécialisées, les ADN polymérases, puissent synthétiser la séquence complémentaire à chacun d'eux, la polymérisation ayant toujours lieu dans le sens 5' vers 3'. La répllication permet donc la formation de deux double hélices composées chacune d'un brin parental et d'un brin néoformé. Ce processus, qualifié de semi-conservateur, permet la sauvegarde de l'information génétique lors de la mitose. Les deux cellules filles et par conséquent toutes les cellules d'un même organisme possèdent le même génome.

Chez l'humain, la totalité de l'ADN chromosomique (excluant donc l'ADN mitochondrial) est constitué de 3 milliards de paires de bases, ce qui représente 2 mètres d'ADN dans chaque noyau. Ainsi, l'ADN doit être compacté selon plusieurs niveaux : le premier degré de compaction consiste en

⁸ "It follows that in a long molecule many different permutations are possible, and it therefore seems likely that the precise sequence of the bases is the code which carries the genetical information. If the actual order of the bases on one of the pair of chains were given, one could write down the exact order of the bases on the other one, because of the specific pairing. Thus one chain is, as it were, the complement of the other, and it is this feature which suggests how the deoxyribonucleic acid molecule might duplicate itself."

l'enroulement sur environ 200 paires de bases de la double hélice autour d'une multitude de protéines nommées histones afin de former le nucléosome. L'enchaînement répétitif des nucléosomes forme une fibre de chromatine de 10 nm de diamètre qui s'enroule également sur elle-même. D'autres processus conduisent au super-enroulement de la chromatine pour atteindre un niveau de compaction le plus élevé dans le chromosome métaphasique. Durant le cycle cellulaire, la structure chromatinienne est dynamique. En effet lors de la réplication, la recombinaison, la transcription ou encore la réparation de l'ADN, il est nécessaire que la chromatine soit décompactée pour permettre l'accès des protéines. Ces phénomènes sont finement régulés au cours du cycle cellulaire, notamment grâce à des modifications post-traductionnelles des histones [5, 6].

1.3. Fonctions biologiques de la biomolécule d'ADN

Les fonctions de l'acide désoxyribonucléique sont donc multiples. Comme nous l'avons vu précédemment, cette biomolécule a été sélectionnée aux prémices de la vie pour porter l'information génétique de chaque espèce et individu (animaux, plantes, bactéries,...). Chez les eucaryotes, cette information génétique est également transmise par fécondation de génération en génération, essence même de l'hérédité mendélienne. En outre, la séquence primaire (enchaînement des monomères dAMP, dCMP, dGMP et TMP) est continuellement modifiée par des mécanismes mutationnels ou durant la maturation des gamètes (notamment durant la méiose). Ce brassage génétique conduit donc à la variation permanente de l'information génétique qui, associée à la sélection naturelle de ces modifications, est responsable de l'évolution des espèces, théorie Darwinienne largement admise aujourd'hui.

D'un point de vue biochimique, l'ADN est surtout à l'origine du fonctionnement des organismes, car il est le code pour la biosynthèse des protéines. En effet, une machinerie cellulaire permet la transcription de portions du génome (gènes) en ARN⁹ pré-messagers par des ARN polymérases, toujours en respectant la complémentarité des bases. Cet ARN subit ensuite une maturation dans le noyau avant d'être exporté vers le cytoplasme où il sera traduit en protéine. Cette traduction est réalisée par un complexe multiprotéique et nucléique, le ribosome. Chaque codon de l'ARN (groupe de 3 ribonucléotides) correspond à un acide aminé. Ainsi, les 64 possibilités de codons codent pour les 20 acides aminés formant les protéines. Ce code génétique universel fut déchiffré au milieu des années 60 grâce à la collaboration de F. Crick, M. Nirenberg, G. Khorona, H. Matthaei, R. Holey et leurs collègues [7, 8].

⁹ L'ARN, ou Acide RiboNucléique, diffère de l'ADN par deux grandes nuances structurales. Comme son nom l'indique l'unité sucre de l'ARN est un ribose (non pas un désoxyribose). De plus en série ARN, la base thymine (de l'ADN) est remplacée par son homologue non méthylé, l'uracile.

« ADN » : en somme, ces seules trois lettres - en plus de leur rôle dans le développement et le fonctionnement des organismes - définissent l'identité génétique de chaque être vivant et est le vecteur de l'hérédité adopté par le vivant. En outre, subissant les effets de la sélection naturelle, l'ADN permet l'évolution biologique des espèces.

2. Les lésions de l'ADN

En dépit de ses rôles biologiques cruciaux dans le développement, le fonctionnement et la reproduction des organismes, l'ADN n'en demeure pas moins une molécule chimique. Elle possède donc une réactivité non négligeable vis-à-vis d'agents endogènes - tels que les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou encore des produits secondaires d'acides gras polyinsaturés - et exogènes tels que le tabac, les médicaments chimiothérapeutiques, les rayonnements ionisants, *etc.* Ces multiples sources d'agression peuvent induire des modifications de la structure de la macromolécule qui peuvent avoir des conséquences biologiques importantes (cf. I.3). La suite de ce chapitre recense les processus qui peuvent endommager la molécule d'ADN, les lésions qui en résultent ainsi que les conséquences directes de ces dommages sur la réplication et la transcription. Nous verrons également des cas où les propriétés génotoxiques d'agents exogènes sont exploitées à des fins thérapeutiques.

2.1. L'Hydrolyse

La réaction chimique la plus courante, mais potentiellement dangereuse pour l'ADN est l'hydrolyse. La liaison *N*-glycosidique entre le sucre et la base y est très sensible. Ainsi, l'hydrolyse de cette liaison, induite chimiquement ou enzymatiquement, conduit au relargage de la base et par conséquent à l'apparition d'un site apurinique/apyrimidique non codant, également dit site abasique ou site AP. Lindahl, T. et ses collègues [9, 10] ont montré que la vitesse de dépurination spontanée (de dA ou dG) est 20 fois plus rapide que la dépyrimidination du fait, entre autre, du mécanisme de type SN1 pour la dépurination ($t_{1/2} = 730$ ans pour dA et dG et 14 700 ans pour dT et dC). L'équipe de Nakamura, J. a pu estimer, grâce à une sonde réagissant avec l'aldéhyde formé suite à l'hydrolyse de la liaison base-sucre, que le taux moyen de sites abasiques formés à l'état basal dans une cellule de mammifère est de 10 000 par jour, ce chiffre étant très dépendant du type cellulaire [11, 12]. De plus, l'oxydation ou l'alkylation des bases (cf. § I.2.2 et I.2.3), notamment en N7 des purines induisent la déstabilisation de la liaison *N*-glycosidique par la formation d'un meilleur groupe partant, accélérant la perte de la base de 6 ordres de grandeur [13].

Le site abasique est une lésion prépondérante et est hautement cytotoxique et mutagène. Sa cytotoxicité peut être associée en règle général à la génération de lésions secondaires de types cassures de brin ou de pontages ADN/ADN ou ADN/protéines par plusieurs mécanismes : les sites AP sont en effet très baso-labiles et peuvent ainsi se fragmenter, induisant des cassures simple brin¹⁰ [14]. La forme ouverte aldéhydique du site AP, bien que peu présente (< 1 %) [15] est cependant très réactive et peut former des adduits avec une guanine située sur le brin opposé (pontage inter-brin), avec la chaîne latérale de résidus protéiques ou encore avec des polyamines, générant un pontage inter-brin ou des adduits complexes peu réparés.

Les sites abasiques non-codants peuvent induire le dysfonctionnement des ADN et ARN polymérases durant les processus de réplication et de transcription. L'arrêt de ces processus peut également conduire à des cassures de chromosomes ou mener à l'avortement d'évènements transcriptionnels [16]. Les sites AP agissent également comme des poisons endogènes des topoisomérases, enzymes modulant la structure topologique de l'ADN, en générant des coupures transitoires au sein de cette molécule [17]. Ces enzymes sont essentielles car elles contrôlent la structure super-enroulée de l'ADN lors de la réplication, la transcription, ou la ségrégation des chromosomes [18]. Lorsqu'ils sont présents au sein du site de coupure de la topoisomérase, ceux-ci inhibent le fonctionnement de l'enzyme qui reste fixée covalamment à l'ADN, et finalement induisent des cassures double-brin hautement cytotoxiques [19, 20].

La mutagénicité des sites abasiques est une conséquence directe de la perte d'information codante portée par la base. Ainsi, certaines ADN polymérases sont capables de contourner le dommage en incorporant un nucléotide en face du site abasique. Le désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) incorporé est très dépendant du type de polymérase. Chez *Escherichia Coli* par exemple, il a été montré que la désoxyadénosine est préférentiellement insérée en face d'un site AP, ce mécanisme de sélection faisant référence à la règle du A, ou « A-rule » [21, 22]. Cette sélectivité induit donc des transversions G : C → T : A lorsque la dépurination provient d'une désoxyguanosine. Toutefois, cette règle n'est pas universelle et de nombreuses études ont été menées *in vitro* pour caractériser la sélectivité appliquée par les différentes polymérases répliquatives, translésionnelles et de la réparation de bactéries, de levures ou de mammifères [23]. Occasionnellement, l'ADN polymérase peut contourner la lésion en la « sautant », ce qui induit la délétion d'un nucléotide, mutation ayant des conséquences bien plus importantes qu'une simple mutation ponctuelle [24]. La mutagénèse des sites abasiques est donc très complexe et dépend, entre autres, de l'induction et du recrutement des différentes polymérases sur le site endommagé.

¹⁰ L'abstraction du proton en α de l'aldéhyde (ou hémiacétal) conduit à une rupture du lien phosphodiester en 3' du site AP par β -élimination et peut subséquemment conduire à la perte du phosphate en 5' par γ,δ -élimination

Les amines exocycliques des bases azotées sont également sujettes à l'hydrolyse. La désamination de l'adénine, de la guanine, de la cytosine et de la 5-méthylcytosine (formée par méthylation épigénétique de la cytosine) forme respectivement l'hypoxanthine, la xanthine, l'uracile et la thymine [25]. Chimiquement, cela implique le remplacement d'un groupement donneur de liaison H « *amino* » par un groupement accepteur « *oxo* », ce qui modifie les propriétés d'appariement des bases et peut donc conduire à des altérations de la séquence codante. L'hypoxanthine, bien que peu formée dans la double hélice, est mutagène en vertu de son appariement stable avec la cytosine plutôt qu'avec la thymine [26]. Cependant, la principale lésion issue de cette réaction est l'uracile, formée entre 100 et 500 fois par cycle dans une cellule humaine [27]. L'uracile s'appareillant préférentiellement avec l'adénine, sa conservation dans la séquence mène à une transition G : C → A : T. De même la désamination de la 5-MeC, plus favorable encore, conduit à la même mutation ponctuelle [28]. Certes ces lésions sont très mutagènes, notamment dans les régions régulatrices de gènes¹¹, toutefois la désamination médiée par une enzyme spécialisée, une (désoxy) cytidinedésaminase, contribue au renforcement de nos défenses immunitaires par la diversification des anticorps au sein des globules blancs (cf. § I.5.6 et [31]).

Enfin, l'hydrolyse de la liaison phosphodiester du squelette sucre-phosphate est également une réaction spontanée ($\Delta G^{\circ} = -5.3$ kcal/mol) [32]. Cependant, la cinétique d'hydrolyse dans des conditions de pH et de température physiologiques est très lente [33]¹². Nous pouvons alors considérer que l'hydrolyse spontanée des liens phosphodiester dans l'ADN, dans ces conditions, ne se produit pas significativement, bien que cette réaction puisse être catalysée enzymatiquement.

2.2. L'Oxydation

La vie telle que nous la connaissons aujourd'hui n'est que rarement possible sans oxygène. Paradoxalement, dans ce chapitre, nous allons voir que cette molécule diatomique et ses dérivés réactifs peuvent endommager l'ADN par des processus oxydatifs divers, incompatibles avec le maintien de la vie si les cellules n'étaient dotées d'un arsenal antioxydant.

La plus grande source de stress oxydant est l'oxygène et ses dérivés produits continuellement comme sous-produits du métabolisme, ou générés par l'action de composés exogènes ou des radiations. Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) les plus courantes sont le

¹¹ Chez les eucaryotes, ces régions régulatrices sont riches en dinucléotides désoxycytidine-phosphate-désoxyguanosine (abrégié CpG). La transcription des gènes est régulée par la méthylation de ces régions promotrices au niveau des cytosines [29]. Ces régions sont donc très sensibles à la désamination et constitue des points chauds pour les mutations de type transitions C : G vers T : A [30]

¹² Par extrapolation des données obtenues pour l'hydrolyse du dinéopentylphosphate. Cette réaction a un temps de demi-vie de 30 millions d'années)

radical anion superoxyde (O_2°), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO°) ou leurs dérivés alkylés (ROO° , RO° ,...). Parmi ces molécules, le radical hydroxyle, produit *via* la réduction de l'oxygène médiée par un métal (réaction de Fenton), par radiolyse de l'eau ou encore par décomposition de peroxydes (nitrés ou alkylés), est particulièrement réactif vis-à-vis des nucléobases et du désoxyribose et peut mener à la formation de nombreuses et diverses lésions (pour revue, voir [34]). Ainsi, le radical hydroxyle peut soit s'additionner sur une double liaison, soit abstraire un proton par des mécanismes radicalaires. La guanine est particulièrement sensible à l'oxydation. L'addition du radical sur les carbones C4 et C5 est réversible par la captation d'un électron de l'eau et la déshydratation de l'adduit [35]. En revanche, l'adduit radicalaire C8-OH conduit à la 8-oxoguanine (ou 7,8-dihydro-8-hydroxyguanine, 8-oxoG) par oxydation à un électron. Cette réaction, très majoritaire en condition oxydante, est en compétition avec l'ouverture réductrice du cycle imidazole conduisant à la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FAPyG) [34, 36]. La 8-oxoG est la lésion prédominante due au stress oxydatif, qui est de plus très mutagène : elle s'apparie préférentiellement avec une adénine par des liaisons H de type « Hoogsteen » (et non « Watson-Crick »), conduisant durant la réplication à des transversions $G \rightarrow T$ (cf. § I.5.3 et [37-39]). La FAPyG quant à elle est très alcali-labile et possède également des propriétés de mauvais codage de l'ADN [40] et d'inhibition de la réplication [41]. Dans une moindre mesure, le radical hydroxyle peut, de la même manière, endommager l'adénine pour former la 8-oxoA et la FapyA [42]. La 8-oxoG et la 8-oxoA possèdent un potentiel d'oxydation plus bas que leur base normale et sont donc sujettes à une suroxydation par arrachement d'électron ou *via* l'oxygène singulet, formant les spirohydantoïnes et allantoinés correspondantes ainsi que l'acide oxalorique [43-45].

Une pléthore de lésions est également issue de la réaction de HO° avec les bases pyrimidiques [34, 46]. L'addition de l'hydroxyle forme majoritairement les radicaux C5-OH et C6-OH, qui peuvent subséquemment subir plusieurs réactions en fonction de leurs propriétés oxydo-réductrices et de leur environnement, évoluant en dommages hétéroclites : l'hydratation de ces radicaux mènent aux diols correspondants, glycol de thymine (Tg) et cytosine glycol (Cg). La perte de l'aromaticité du cycle accélère la désamination et la déshydratation de la Cg qui se décompose rapidement en uracile glycol (Ug), 5-hydroxycytosine (5-OHC) et 5-hydroxyuracile (5-OHU) [47, 48].

En condition anaérobique, les radicaux formés par addition de HO° sur la double liaison C5=C6 conduisent aux dérivés 5-hydroxy-6-hydro- et 6-hydroxy-5-hydropyrimidines. Egalement, la radiolyse de l'eau par rayonnement ionisant (cf. § I.2.5) peut conduire à la réduction de cette double liaison formant la 5,6-dihydrothymine (5,6-DHT) et la 5,6-dihydrocytosine (5,6-DHC) qui est désaminée efficacement en son analogue uracile (5,6-DHU) [49]. En présence d'oxygène, ces réactions sont inhibées et les radicaux pyrimidiques C6-OH peuvent se décomposer en dérivés d'hydantoïne stables (5-OH-5-MeHyd et 5-OH-Hyd) [50, 51]. Le radical hydroxyle peut également

abstraire un proton méthylique de la thymine pour former un radical allyle. En présence d'eau ou d'oxygène ce dernier est oxydé en 5-(hydroxyméthyl)uracile (5-hmU) ou en 5-formyluracile (5-FoU) [52].

Les conséquences biologiques de ces lésions varient énormément (pour revue, voir [53]). Par exemple, les adduits hydroxylés en position 5 de la thymine (Tg, 5-OH DHT), et les dérivés d'hydantoïnes sont très peu mutagènes mais sont létaux car ils créent une distorsion locale importante de la double hélice entravant la synthèse d'ADN par les polymérase [54, 55]. La DHT quant à elle est une lésion bénigne car elle garde sa préférence d'appariement avec l'adénine et ne bloque pas la réplication ou la transcription [56, 57]. En règle générale, les dommages oxydatifs de la cytosine sont promutagènes : les trois principales lésions, l'Ug, la 5-OHC et la 5-OHU conduisent souvent à des transitions C → T par leur appariement favorisé avec l'adénine et la capacité des polymérase à passer outre ses lésions [58]. De plus, la plupart des réactions conduisant à la saturation du cycle pyrimidine rendent leurs produits plus alcali-labiles. Ces derniers peuvent mener à la formation de sites abasiques, également toxiques et mutagènes (cf. I.2.1).

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)¹³ et les radicaux hydroperoxydes (par exemple issus de la peroxydation lipidique) sont également des sources d'oxydation de l'ADN. Ils forment quasi exclusivement la 8-oxoG [59, 60] qui peut se décomposer en spiroiminodihydantoïne [61].

Le fragment désoxyribose n'est pas épargné par le stress oxydatif. Une espèce radicalaire peut facilement abstraire un proton porté par les carbones C1' à C5'. Il s'ensuit généralement une cascade de réarrangements et de fragmentations conduisant à des cassures simple brin dont la nature des extrémités varie suivant l'oxydant et le site déprotoné initialement. Ces cassures peuvent être délétères pour la cellule du fait de la perte d'information codante apportée par la base et de la cytotoxicité de ces clivages souvent mal pris en charge par les enzymes de réparation. L'abstraction du proton C1' conduit également à la formation de sites abasiques oxydés comme la 2'-désoxyribonolactone [62].

La plupart de ces lésions, générées par les espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote, engendrent des intermédiaires réactionnels radicalaires très réactifs qui peuvent parfois réagir eux-mêmes avec d'autres fragments de biomolécules pour donner des lésions tandem [63, 64]. Les cyclopurines, par exemple, sont issues de l'attaque d'un radical formé en position C5' du sucre sur le C8 de l'adénine (5'-R/S cyclodA) ou de la guanine (5'-R/S cyclodG) [65]. Ce lien covalent déstabilise l'appariement de la base en question et crée une distorsion locale importante de l'ADN double brin [66, 67]. Cette déformation bloque la transcription et inhibe donc l'expression de gènes [68]. De la

¹³ L'oxygène singulet est produit par excitation de l'oxygène moléculaire (triplet) via un photosensibilisateur soumis à un rayonnement UV. Il est également produit par décomposition du peroxyde d'hydrogène, présent naturellement dans les cellules.

même façon le radical allyle de la thymine peut mener à un pontage ADN/protéine (e.g. histone) par un couplage covalent avec une tyrosine [69]. Le radical hydroperoxyde, intermédiaire dans la formation du diol de thymine, peut pareillement oxyder une guanine adjacente ou abstraire un proton sur le C1' du désoxyribose situé en 3' pour former un site abasique désoxyribonolactone [70, 71]. Ces lésions tandem ont souvent une toxicité accrue car elles sont mal prises en charge par les systèmes de réparation (cf. § 1.4).

2.3. *L'Alkylation*

Une autre grande classe de réactions chimiques pouvant léser l'ADN est l'alkylation. Il existe une multitude d'agents alkylants qui proviennent du métabolisme cellulaire ou sont présents dans l'environnement (l'air, l'eau, la nourriture,...). D'autres encore ont été développés spécifiquement dans le but même d'endommager l'ADN, et sont notamment utilisés dans les thérapies anticancéreuses. Il existe différents sites d'alkylation sur les acides nucléiques, principalement au niveau des sites nucléophiles de la molécule. La sélectivité de l'alkylation est dictée par plusieurs paramètres comme le mécanisme réactionnel (SN1 ou SN2), la disponibilité du site nucléophile (si l'ADN est simple ou double brin) et le type de molécule alkylante. Il serait difficile de faire une liste exhaustive de tous les adduits à l'ADN formés par alkylation tant le nombre d'agents auxquels la biomolécule est exposée est grand. Dans ce paragraphe, nous nous contenterons de mentionner les grands types d'adduits formés et leurs conséquences biologiques.

Les sites d'alkylation potentiels des acides nucléiques sont les azotes endo- ou exocycliques et les oxygènes des nucléobases ou des liens phosphodiester (cf. Figure 3 et [72]). Plus marginalement, le carbone 8 de la guanine est également sujet à cette réaction [73].

2.3.a. *Méthylation*

L'alkylation simple (méthylation, éthylation), bien que peu destructurante représente un réel danger pour les cellules si elle n'est pas contrôlée. De façon générale, le site d'attaque préférentiel est l'azote endocyclique 7 de la guanine (N7G) [74-76]. Ainsi, la régiosélectivité de cette position pour divers agents comme le méthanesulfonate de méthyle (MMS), la N-méthyl-N-nitrosourée (MNU) ou le sulfate de diméthyle (DMS) est de 70 à 80 % de la totalité des adduits formés par alkylation [77]. Bien que la N7-alkylguanine soit relativement inoffensive en elle-même car ses propriétés codantes restent inchangées par rapport à la guanine et qu'elle n'entrave pas les processus de réplication et de transcription, la charge positive portée par l'azote 7 accélère considérablement la dépurination, menant à des intermédiaires sites AP cytotoxiques [16].

La S-adénylméthionine est un donneur de méthyle cellulaire utilisé enzymatiquement dans de nombreuses voies de biosynthèse. Cette molécule peut également réagir avec l'ADN générant principalement la N7MeG et la N3MeA. Bien que cette dernière lésion ne soit pas particulièrement mutagène, elle est cytotoxique en vertu de sa capacité à inhiber la réplication par des interactions stériques entre le groupement méthyle et la polymérase [78-80]. La substitution nucléophile impliquée dans la réaction d'alkylation par la SAM est de type SN2. Ainsi, cette molécule réagit de façon négligeable avec les nucléophiles durs comme l'oxygène en position 6 de la guanine [81, 82]. D'autres composés alkylant l'ADN selon le même mécanisme comme le MMS ou les halogénures de méthyle ou d'éthyle, naturellement présents dans la nourriture ou plus intensivement utilisés comme pesticides, forment aussi les adduits N1AlkylA et N3AlkylC [83, 84]. Ces positions sont protégées par des ponts hydrogène dans la double hélice d'ADN mais sont assez nucléophiles lorsque l'ADN est présent sous sa forme simple brin comme dans les fourches de réplication [85]. Ainsi, ces lésions toxiques entravent l'appariement des bases et par conséquent bloquent la réplication [86].

Les agents alkylant l'ADN avec un mécanisme de type SN1 réagissent également avec les azotes mais aussi de façon non négligeable avec les oxygènes. Parmi ces molécules on retrouve les composés N-alkyl-N-nitrosamides (MNU, méthylnitronitrosoguanidine MNNG,...) ou encore les nitrosamines issus de la nourriture ou de la combustion du tabac (e.g. N-nitrosornicotine NNN), reconnus depuis des décennies comme cancérigènes de type 1¹⁴ (IARC MONOGRAPH 1986; [87]. L'exposition de l'ADN à ces composés métabolisés forme en quantité significative l'O⁶MeG et, plus anecdotiquement, l'O⁴MeT [77, 88, 89]. Ces lésions sont hautement mutagènes et cytotoxiques : l'O⁶MeG s'apparie avec une thymine ce qui donne lieu à des transitions de G → A [90]. En plus de ses propriétés pro-mutagène, il semble que l'O⁶MeG soit également cytotoxique du fait que le mésappariement O⁶MeG:T soit mal pris en charge par la voie de réparation spécifique (« mismatch repair », cf. § I.4.4), provoquant des cassures simple et double brin [91]. L'O⁴MeT, quant à elle, mime la cytosine et s'apparie donc préférentiellement avec une guanine induisant des transitions T → C [92, 93].

Comme mentionné précédemment, la position 8 de la guanine peut également être alkylée par des mécanismes radicalaires. Il a été montré que ces lésions sont formées *in vitro* et *in vivo* par des agents tels que la 1,2-diméthylhydrazine ou le *ter*-butylhydroperoxyde [94-96]. La 8-MeG se trouve être une lésion potentiellement létale car elle est capable de générer des transversions G → C

¹⁴ Le classement des agents carcinogènes officiel est réalisé par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, en anglais International Agency for Research on Cancer, IARC) : <http://www.iarc.fr/>. Les composés du groupe 1 sont cancérigènes avérés tandis que ceux du groupe 4 ne sont probablement pas cancérigènes pour l'homme.

et G → T ainsi que des délétions [97]. De plus, il semble que les cellules de mammifères ne soient pas capables de réparer cette lésion efficacement [73].

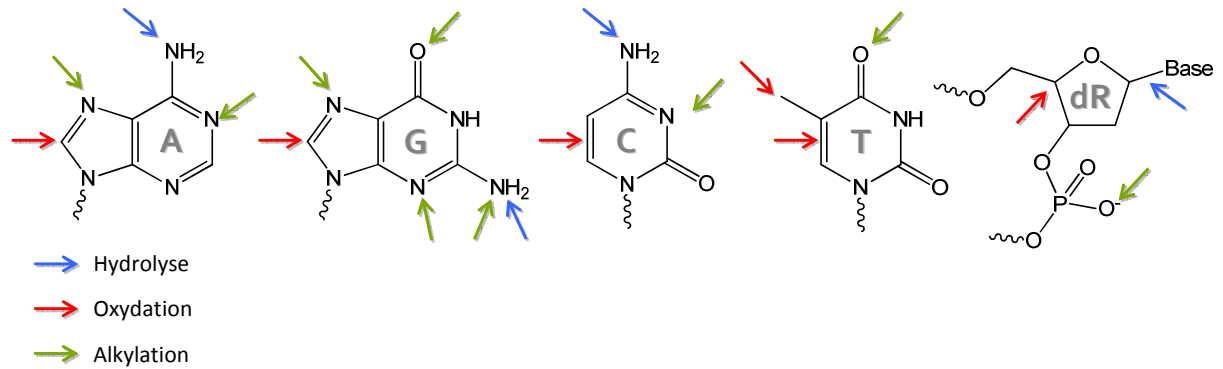


Figure 3: Principaux sites d'hydrolyse, d'oxydation et d'alkylation de l'ADN.

Le squelette phosphodiester de l'ADN est également sujet aux dommages alkylants. Par exemple, 17 % de la totalité des adduits formés par le MNU dans l'ADN double brin se produisent sur le phosphate. Bien que cette méthylation accélère l'hydrolyse du lien sucre-phosphate, elle reste relativement lente. D'autres agents comme le 2-hydroxyéthylnitrosourée (HENU) créent des liens phosphotriester beaucoup moins stables et par conséquent induisent des cassures de chaînes qui seraient responsables de leur carcinogénicité [98].

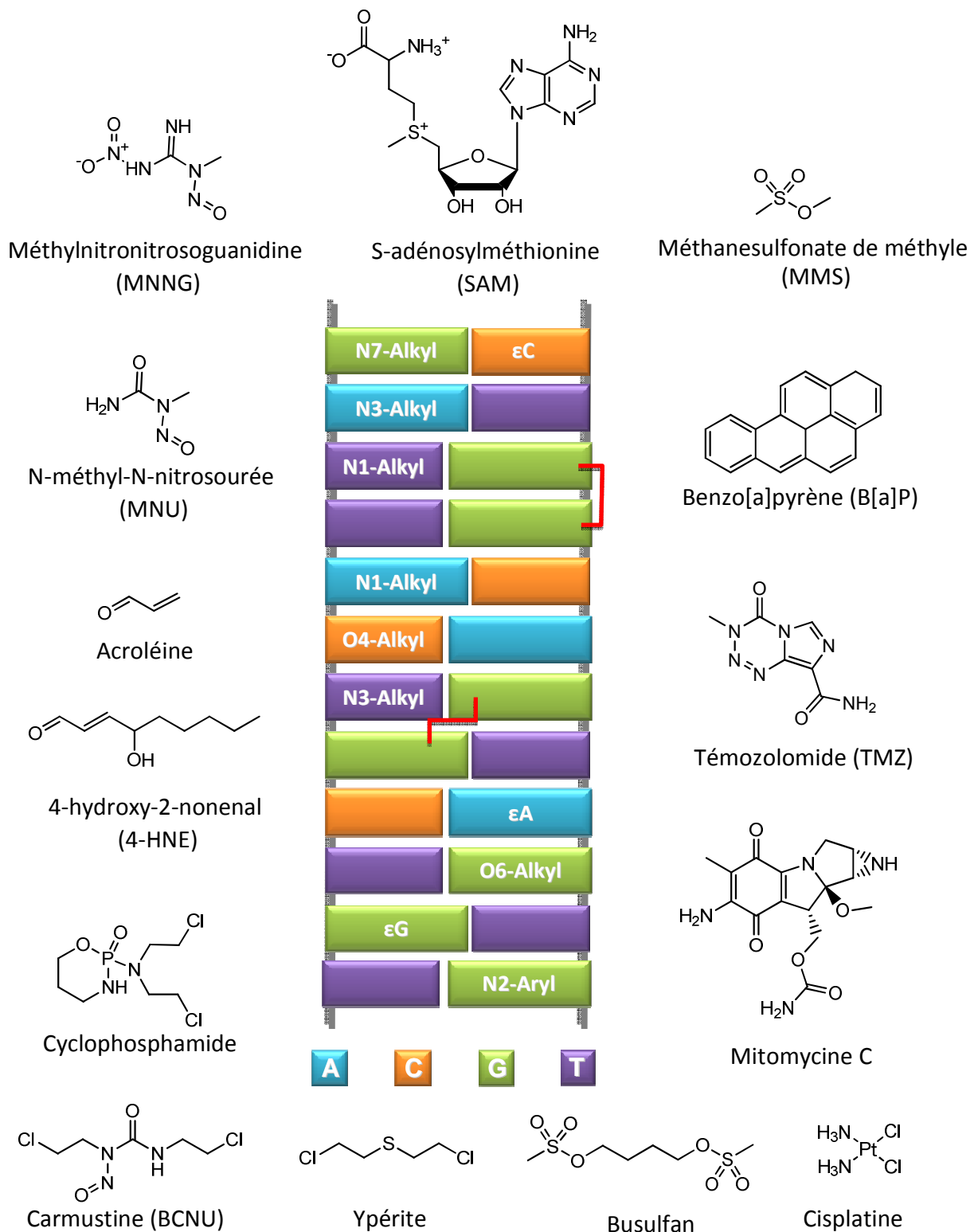


Figure 4: Exemples de molécules alkylantes et dommages induits.

2.3.b. Adduits volumineux

D'autres composés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques¹⁵, sont métabolisés intra-cellulairement par les enzymes de détoxification et peuvent alors réagir avec les bases azotées [100, 101]. Ce sont très majoritairement les amines exocycliques des purines, notamment de la guanine qui réagissent sur ces composés activés pour former des adduits volumineux [102]. Ces adduits sont stables et mutagènes s'ils ne sont pas éliminés.

2.3.c. Alkylants bifonctionnels

Toutes les molécules énoncées précédemment (SAM, MNU, MMS, HAPs,...) sont des alkylants monofonctionnels, c'est à dire qu'elles n'ont qu'un seul site électrophile pouvant réagir avec les biomolécules. Certains composés bifonctionnels sont capables de ponter deux centres nucléophiles dans le duplexe d'ADN. Les aldéhydes α,β -insaturés, produits endogènement lors de la peroxydation lipidique (malonaldéhyde, 4-hydroxy-2-nonenal, acroléine,...) ou de sources exogènes (chlorure de vinyle,...), peuvent ainsi cycliser par le biais des azotes endo- et exocycliques des bases G, A et C, générant propano- ou éthèno-adduits [103, 104]. Les éthèno-adduits sont formés par addition de ces mêmes composés, souvent peu réactifs vis-à-vis de l'ADN, préalablement métabolisés par époxydation [103]. Ainsi, quatre types d'éthénobases peuvent être obtenus : la N²,3-éthénoguanine (N²,3- ϵ G), la 1,N²- ϵ G, l' ϵ A et l' ϵ C. Ces adduits exocycliques modifient les propriétés d'appariement des bases et sont souvent promutagéniques [105]. Ainsi, le type de mutations engendrées par ces lésions a été intensément étudié *in vitro*, *in cellulo* ou *in vivo* (pour revue, voir [106]). Il en ressort que l' ϵ A induit plutôt des transitions A \rightarrow G, l' ϵ C est mutée en A ou en T durant la réplication, la N²,3- ϵ G s'apparie préférentiellement avec une thymine et la 1,N²- ϵ G est mutée en A, C ou T et induit des délétions suivant le modèle de polymérase ou d'organisme étudié. De nombreuses études tendent à démontrer l'implication de ces dommages dans le développement de certains cancers [107, 108] et leur lien étroit avec le niveau de stress oxydatif [109, 110]. En outre, l'exposition professionnelle au chlorure de vinyle utilisé dans la fabrication du PVC est, depuis son utilisation, associée au développement d'angiosarcomes du foie chez les travailleurs [111]. Le spectre mutationnel de ces tumeurs peut être attribué à la formation des éthénobases dans l'ADN [112].

¹⁵ Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont issus de la combustion (pyrolyse) incomplète de la matière organique. Cette décomposition thermique peut être d'origine naturelle (feux de forêts,...) anthropique (industrie, sources domestiques,...). Certains d'entre eux, dont le plus connu Benzo[a]pyrène, sont reconnus cancérigènes par le CIRC depuis plus de 30 ans [99]

D'autres agents alkylants bifonctionnels peuvent créer des pontages intra- ou inter-brin ou encore des pontages ADN-protéines. C'est le cas par exemple de l'ypérite, aussi connu sous le nom de gaz moutarde et utilisé comme arme chimique, entre autres pendant la première guerre mondiale. En plus de former des mono-adduits [113], le sulfure de 2,2'-dichloroéthyle peut réagir successivement par l'intermédiaire d'ions carbénium avec une prédilection pour les azotes N7 de deux guanines [114] formant en quantité significative des pontages intra-brin et inter-brin [115, 116] qui affectent la synthèse d'ADN [117, 118]. Les pontages inter-brin sont d'autant plus toxiques du fait qu'ils empêchent la séparation des 2 chromatides nécessaire pour la division cellulaire et que leur réparation difficile crée des cassures double brin [119].

2.3.d. Alkylants thérapeutiques

Les agents alkylants sont la plus vieille classe de médicaments anticancéreux [120]. Bien que ces agents chimiques soient capables de réagir avec tous les composants cellulaires, les conséquences biologiques (cytotoxicité, mutagénèse, clastogénèse) peuvent être attribuées à leur capacité à endommager l'ADN. Parmi les médicaments classiquement utilisés en chimiothérapie, on retrouve les tétrazines comme le témozolomide ou la dacarbazine utilisées notamment dans le traitement des tumeurs cérébrales (glioblastomes) et des mélanomes de par leur propriété lipophile [121]. Leur effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses peut être attribué à la formation de O⁶-méthylguanines dont nous avons mentionné l'effet mutagène accru (cf. § I.2.3 et [122, 123]).

Le gaz moutarde est historiquement le premier agent alkylant utilisé à des fins thérapeutiques pour traiter des tumeurs superficielles [124]. En raison de son action vésicante, celui-ci a très vite été abandonné pour ses analogues azotés. Ainsi, les dérivés du précurseur méchloroéthamine (ou chlorméthine), comme le melphalane, la chlorambucile ou le cyclophosphamide sont toujours utilisés cliniquement pour le traitement de nombreux cancers [125-127]. La génotoxicité des moutardes à azote est assignée à leur capacité à former des pontages inter- et intra-brin N7G-N7G et N3A-N7G selon un mécanisme analogue à celui de l'ypérite énoncé précédemment [128, 129].

Dans les années 60, d'autres dérivés de molécules alkylantes cancérigènes ont été développés paradoxalement pour des applications antitumorales. Ainsi, les chloroéthylnitrosourées, telles que la carmustine (ou BCNU), la lomustine (ou CCNU) et la fotemustine ont la capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et sont donc utilisées dans le traitement de tumeurs cérébrales [130, 131]. Ces molécules doivent leur effet anticancéreux à la formation de pontages

covalents entre le N1 d'une guanine et le N3 d'une cytosine appariée par un mécanisme multi-étapes [132].

D'une découverte fortuite en 1965, le cis-platine et ses dérivés comptent parmi les agents antinéoplasiques les plus utilisés dans le monde, notamment dans le traitement des tumeurs solides. [133, 134]. A l'instar des moutardes azotées, le cis-platine et les générations suivantes comme le carboplatine ou l'oxaliplatine forment des produits d'addition entre deux bases proches de l'ADN génomique, bien qu'avec des proportions différentes pour les différents adduits. A l'inverse des alkylants bifonctionnels mentionnés précédemment, qui forment majoritairement des mono-adduits, les adduits mono-platinés restent faibles et la majeure partie des réactions aboutissent à la chélation de deux bases. Ainsi, ces complexes de platines forment en très grande proportion des pontages intra-brin N7G-N7G N7A-N7G et N7G-X-N7G (X correspondant à un résidu nucléique) qui bloquent les processus biologiques de réplication et de transcription [135-137]. Les pontages inter-brin représentent quelques pourcents de la totalité des adduits platinés et sont également responsables de la cytotoxicité de ces molécules [138].

D'autres agents pontants sont également utilisés en chimiothérapie. Le busulfan, utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques, crée des lésions N7G-N7G intra et inter-brin [139, 140]. La mitomycine C, utilisée en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques dans le traitement de divers cancers, est métabolisée avant de réagir avec les groupements amino exocycliques de deux guanines. Ces réactions forment majoritairement des pontages inter-brin stables hautement cytotoxiques [141-144].

Les di-adduits causés par l'ensemble des alkylants pontants ont des conséquences néfastes pour les cellules. D'une part, ils inhibent les processus biologiques nécessitant la séparation des deux brins d'ADN tels que la transcription et la réplication [145]. La déformation importante de la double hélice induite par ces dommages peut physiquement bloquer les ADN et ARN polymérases mais également modifier l'affinité de facteurs de transcription pour leurs cibles. Egalement, la rigidité du nucléosome peut influencer l'avancement de la synthèse d'acides nucléiques [146]. D'autre part ces lésions peuvent évoluer en cassures de brin du fait de l'instabilité qu'elles génèrent ou durant les processus de réparation [147].

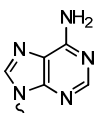
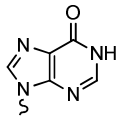
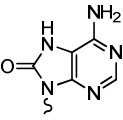
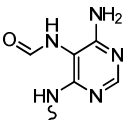
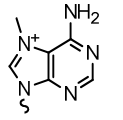
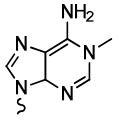
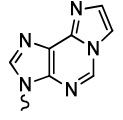
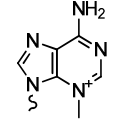
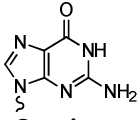
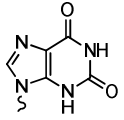
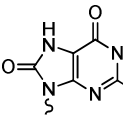
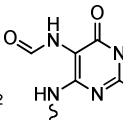
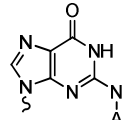
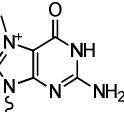
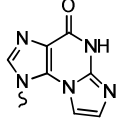
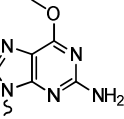
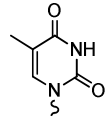
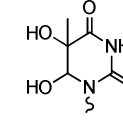
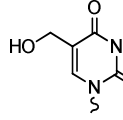
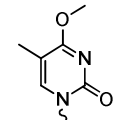
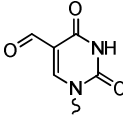
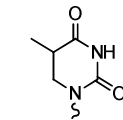
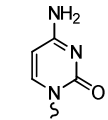
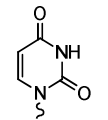
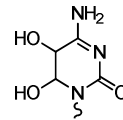
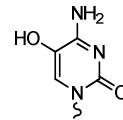
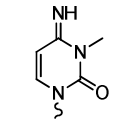
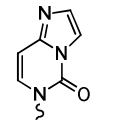
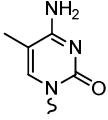
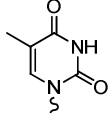
Base normale	Désamination	Oxydation/Réduction		Alkylation	
 <p>Adénine (A)</p>	 <p>Hypoxanthine (Hx)</p>	 <p>8-oxoadénine (8-oxoA)</p>	 <p>2,6-diamino-5- formamidopyrimidine (FAPyA)</p>	 <p>N7-méthyladénine (7-MeA)</p>	 <p>1-méthyladénine (1-MeA)</p>
				 <p>1, N6-éthénoadénine (εA)</p>	 <p>3-méthyladénine (3-MeA)</p>
 <p>Guanine (G)</p>	 <p>Xanthine (Xa)</p>	 <p>8-oxoguanine (8-oxoG)</p>	 <p>2,6-diamino-4-hydroxy- 5-formamidopyrimidine (FAPyG)</p>	 <p>N2-arylguanine (N2-ArG)</p>	 <p>7-méthylguanine (7-MeG)</p>
				 <p>N2,3-éthénoguanine (N2,3-εG)</p>	 <p>O6-méthylguanine (O6-MeG)</p>
 <p>Thymine (T)</p>		 <p>Thymine glycol (Tg)</p>	 <p>5-hydroxyméthyl uracile (5-HOMeU)</p>	 <p>O4-méthylthymine (O4-MeT)</p>	
		 <p>5-formyluracile (5-FoU)</p>	 <p>5,6-dihydrothymine (DHT)</p>		
 <p>Cytosine (C)</p>	 <p>Uracile (U)</p>	 <p>Cytosine glycol (Cg)</p>	 <p>5-hydroxycytosine (5-OHC)</p>	 <p>3-méthylcytosine (3-MeC)</p>	 <p>3,N4-éthénocytosine (εC)</p>
 <p>5-méthylcytosine (5-MeC)</p>	 <p>Thymine (T)</p>				

Figure 5: Principales lésions issues de la désamination, l'oxydation ou l'alkylation des bases nucléiques.

2.4. Les Réactions photochimiques

Depuis que la vie s'est étendue des mers aux continents, l'ADN a dû faire face à une nouvelle source de dommages : le soleil, plus particulièrement le rayonnement ultra-violet (UV). Le spectre UV est découpé en trois domaines en fonction de leur longueur d'onde : les UVC (200-280nm), les plus énergétiques sont absorbés dans la stratosphère par l'ozone et sont peu pertinents biologiquement [148]; les UVB (280-320 nm) représentent quelques pourcents du rayonnement UV solaire mais sont responsables en grande partie de la génotoxicité de ces radiations; les UVA (320-400 nm), moins énergétiques, sont d'une intensité bien supérieure aux UVB à la surface de la Terre et leur rôle dans la cancérogénèse ne doit pas être écarté [149].

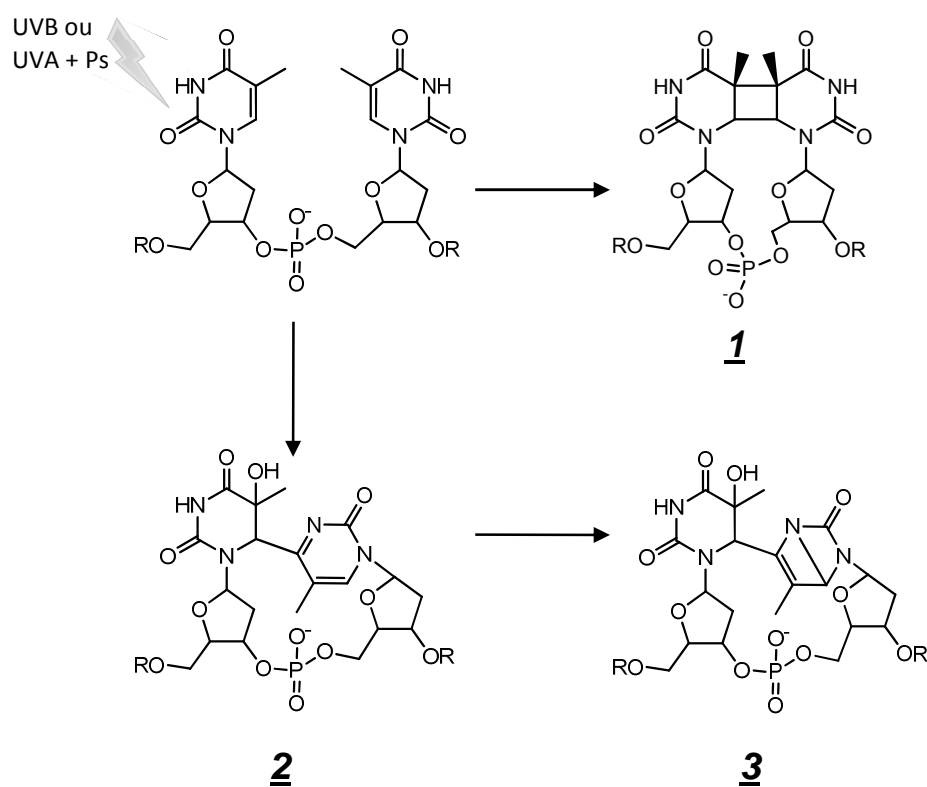


Figure 6: La photoréaction entre deux thymines adjacentes conduit à la formation du dimère de pyrimidines de type cyclobutane **1**, ou du photoproduit pyrimidine (6-4) pyrimidone **2** et de son isomère de valence Dewar **3**.

De façon générale, les UVB ont un effet direct sur l'ADN, dû à l'absorption de photons par les thymines ou les cytosines menant à la formation de dimères sur les sites bipyrimidiques. La réaction de cycloaddition [$2\pi + 2\pi$] entre 2 double liaisons C5=C6 de pyrimidines adjacentes mène à la formation de cyclobutanes (CPD), photoproduits majoritaires avec dans l'ordre de prédominance *in vivo* les 5'-TT > 5'-TC > 5'-CT > 5'-CC. En revanche, la cycloaddition entre la double liaison C5=C6 et le groupement carbonyle en C4 du 3'-nucléoside conduit à la formation de pyrimidine (6-4) pyrimidone

(6-4 PP) et de leur isomère de valence Dewar. Cette réaction produit en majorité des photoproduits 6-4 TC [150]. Les CPD ou les 6-4 PP correspondent à la saturation des bases impliquées et donc à une perte d'interaction π (« π stacking ») entre les bases adjacentes d'un même brin, augmentant la flexibilité de l'ADN [151]. Cela a pour conséquence de créer une distorsion locale de la double hélice qui bloque la progression de la fourche de réplication [152, 153]. Certaines polymérases sont cependant capables de passer sans erreur outre ces lésions, comme la polymérase translésionnelle η [154]. Cependant, la perte d'aromaticité de la cytosine accélère considérablement la désamination de cette base [155] et conduit donc à des transitions C \rightarrow T ou CC \rightarrow TT, mutations faisant référence à la signature UV [156, 157].

Les UVA endommagent l'ADN par des mécanismes directs et indirects. Récemment, il a été montré que l'irradiation aux UVA de cellules de la peau conduit majoritairement à la formation de dimères de pyrimidines, exclusivement des cyclobutanes 5'TT¹⁶, toutefois dans des proportions bien moindres qu'avec la même dose d'UVB [159, 160]. Les photons UVA peuvent également être absorbés par un photosensibilisateur (Ps) exogène ou endogène (riboflavine, tryptophane, porphyrines, psoralène,...) qui endommagent l'ADN selon plusieurs mécanismes [61, 161]. Certains Ps comme l'acétophénone forment des CDP TT par transfert d'énergie triplet vers la biomolécule [162]. D'autres réactions photochimiques conduisent à la formation d'oxygène singulet ou d'espèces réactives de l'oxygène radicalaires (O₂[°], HO[°],...) créant des bases oxydées (8-oxoG), des sites abasiques et des cassures de chaînes [163, 164]. Comme énoncé précédemment, les EROs peuvent également conduire à la peroxydation des lipides dont les intermédiaires sont susceptibles d'altérer l'ADN [165].

Non prises en charge, ces lésions ont des conséquences non négligeables sur la mutagenèse et la survie des cellules (détaillé § 1.2.2).

La photosensibilisation est par ailleurs utilisée pour le traitement de certaines tumeurs peu profondes, connu sous le nom de thérapie photodynamique (PDT). Un composé pro-photosensible, comme l'acide aminolévulinique, est administré au patient [166]. Après sa distribution dans la tumeur et sa métabolisation, la zone est irradiée avec la lumière correspondante pour l'excitation du Ps qui permet la mort des tissus pathologiques, notamment par des réactions photochimiques de type I (produits de réduction de l'oxygène moléculaire, O₂[°], HO[°],...) et II (production d'oxygène singulet par transfert d'énergie) [167, 168].

¹⁶ La thymine possède en effet l'état triplet de plus faible énergie parmi les quatre bases [158]

2.5. *Les Dommages radio-induits*

Les radiations ionisantes correspondent à un rayonnement capable de pénétrer la matière et de déposer une énergie suffisante pour ioniser les molécules avec lesquelles il interagit. On distingue les rayonnements électromagnétiques, classiquement des photons de hautes énergies comme les rayons X ou γ , et les rayonnements particuliers, incluant les particules α et β et les ions lourds. Ces différents types de rayonnement sont caractérisés à la fois par leur énergie (en électronvolts, eV) et par la valeur du transfert d'énergie linéique qui correspond à la quantité d'énergie déposée par unité de distance (TEL, en eV/ μm) [169]. Les rayonnements ionisants peuvent avoir un effet direct sur l'ADN par ionisation du biopolymère. Le plus souvent, l'effet de ces rayonnement est indirect, dû à l'omniprésence du solvant. Ainsi, la radiolyse de l'eau conduit à la formation locale d'espèces réactives comme des radicaux hydroxyles HO^\bullet , des radicaux proton H^\bullet des électrons solvatés e^-_{aq} . Les lésions résultantes incluent des cassures simple et double brin, des oxydations ou réductions de bases (8-oxoG, Tg, 5-FoU, DHT,...), des sucres modifiés, des pontages et des sites AP (cf. § 1.2, [59, 170, 171]).

Notons que dans le cas des radiations à haut TEL (particules α ou ions lourds opposés aux rayonnements de faible TEL, tels les rayons X ou γ), l'augmentation de l'effet direct et de la production d'intermédiaires réactifs due à l'accroissement de la dose déposée multiplie la probabilité de former au moins 2 dommages très proches dans le double brin. Ces lésions multiples sont nommées lésions « clustered »¹⁷ et potentialisent les effets néfastes de ces dommages, par rapport à leur présence seule dans l'ADN [172, 173]. Parmi ces lésions, on retrouve évidemment les cassures double brin mais aussi des modifications de bases et sites AP situés dans 1 à 2 tours d'hélice. La réparation de ces dernières lésions est retardée et génèrent des cassures double brin additionnelles [174, 175]. En outre, il est avéré que plus le TEL est élevé, plus le rayonnement génère des dommages complexes, mal réparés et souvent associés à l'efficacité biologique relative¹⁸ élevée de ces radiations [175].

Des molécules sont aujourd'hui connues pour favoriser le même type de dommages que les radiations ionisantes et sont qualifiées de « radiomimétiques ». C'est le cas par exemple de la bléomycine et de ses analogues ou des ènediynes utilisés comme agents antinéoplasiques [176, 177]. Ces composés se fixent à l'ADN avec une grande spécificité, et abstraient directement ou par le biais

¹⁷ « groupées »

¹⁸ L'efficacité biologique relative permet de comparer l'efficacité d'un rayonnement pour produire un effet biologique (i.e. 10 % de survie cellulaire) par rapport à une référence (rayon X). Il correspond au rapport des doses absorbées de rayonnement de référence sur le rayonnement comparé pour produire un même effet biologique donné.

de radicaux oxygénés (HO°) le proton C4 du désoxyribose de façon sélective. En conséquence, le sucre se fragmente générant des cassures de brin, à l'instar des radiations ionisantes [178].

2.6. Les Mésappariements

Les mésappariements (ou « mismatches » en anglais) peuvent également être considérés comme des dommages de l'ADN, bien qu'ils ne correspondent pas à des modifications chimiques des nucléotides. Ils résultent la plupart du temps de l'incorporation d'un mauvais dNTP par une ADN polymérase lors de la réplication ou de la réparation. Ces erreurs d'insertion peuvent avoir plusieurs causes et dépendent de nombreux facteurs cellulaires. Si elles ne sont réparées, ces erreurs seront répliquées et persisteront dans les générations cellulaires suivantes.

Ainsi, le pool de précurseurs nucléotidiques d'ADN peut être modifié de façon à induire l'incorporation de nucléotides triphosphates anormaux lors de la duplication de l'ADN. Par exemple, un stress oxydant important peut contribuer à l'induction de mutations dans les cellules par la formation et l'incorporation de 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine-5'-triphosphate dont les propriétés mutagènes ont été détaillées précédemment [179]. Egalement, l'inhibition de la thymidylate synthase responsable de la conversion du dUTP en TTP par la 5-fluorouracile ou 5-fluorodésoxyuridine induit une augmentation du ratio $[\text{dUTP}]/[\text{TTP}]$, responsable de l'accumulation de paires de bases U:A [180]. Bien que non mutagène dans ce contexte, il a été montré que cette accumulation est cytotoxique [180, 181].

Les mésappariements peuvent aussi être induits par la présence d'un dommage non bloquant sur le brin parent qui « trompe » la polymérase en modifiant les propriétés d'appariement de la base mais qui peut également induire des erreurs de synthèse au niveau des nucléotides adjacents [37]. Plusieurs exemples de lésions mutagènes ont été mentionnés dans les paragraphes précédents : l' O^6MeG est reconnue comme une adénine et guide l'incorporation d'une thymine ; la 8-oxoG s'apparie préférentiellement à une adénine par des liaisons de type Hoogsteen, de même que l'uracile et la thymine produites par désamination hydrolytique de la cytosine et de la 5-MeC respectivement [31, 39, 90].

Dans tous les cas, la fidélité des polymérases, étroitement liée à leurs caractéristiques structurales, est un facteur important qui guide le taux d'erreurs des enzymes en fonction du contexte de synthèse d'ADN [182, 183]. Avant la division de chaque cellule de mammifère, les processus de réplication doivent dupliquer six milliards de bases. Les ADN polymérases répliquatives, bien que qualifiées de hautement fidèles, ne sont pas infaillibles et peuvent faire des erreurs lors de la polymérisation. Afin de limiter ces phénomènes mutagènes, la plupart de ces polymérases (ADN polymérases δ et ϵ) sont dotées d'une activité de relecture (« proofreading »). Lorsqu'une erreur est

commise dans le site actif de l'enzyme, une activité enzymatique 3'→5' exonucléase leur permet d'hydrolyser le dernier résidu afin de reprendre la polymérisation. Ce processus permet d'augmenter la fidélité de la réplication d'un facteur 100 par rapport à une polymérase dépourvue de cette activité de relecture [184]. D'autres ADN polymérases, qualifiées de translésionnelles, assurent un mécanisme de tolérance des lésions lors de la réplication permettant de maintenir les fourches de réplication au niveau de lésions bloquantes. Contrairement aux polymérases répliquatives, dont l'étroitesse du site actif assure une spécificité maximale - mais une incapacité à accepter des bases modifiées comme « template » - les polymérases translésionnelles possèdent un site actif plus large et relâché leur permettant d'inclure l'ADN lésé et d'incorporer la base complémentaire avec une précision raisonnable. De plus ces enzymes ne possèdent pas d'activité exonucléasique. Chez l'homme, on recense cinq ADN polymérases impliquées dans la synthèse translésionnelle : pol η, ι, κ, et Rev-1 appartenant à la famille Y et pol ξ des polymérases B. De ce fait, ces enzymes sont dites peu fidèles, mais il faudrait plutôt voir ces polymérases comme des enzymes spécifiques d'un type de lésions. Leur fidélité dépend donc de la séquence sur laquelle elles sont recrutées. A titre d'exemple, pol η est capable de synthétiser la séquence complémentaire au niveau des dimères de pyrimidines CPD avec un taux d'erreur très faible [154, 185, 186]. De nombreuses expériences *in vitro* ont décortiqué la spécificité de ces différentes polymérases face à des lésions hétéroclites (lésions UV, 8-oxoguanines, sites abasiques, pontages intra-brin,...) [154, 187-192]. *In vivo*, il est important pour le maintien de l'intégrité chromosomique que les différentes polymérases répliquatives et translésionnelles soient recrutées au bon endroit, au bon moment, et dans un bon enchaînement pour faire face aux milliers de lésions générées chaque jour dans les cellules [193, 194].

3. Conséquences biologiques des dommages de l'ADN et réponses cellulaires associées

Etant donnée la grande diversité des lésions listées dans le chapitre précédemment, les conséquences biologiques de ces dommages seront tout aussi diverses, dépendant du contexte dans lequel elles apparaissent (phase du cycle cellulaire et type cellulaire entre autres). Ainsi, les lésions de l'ADN ont généralement des conséquences dramatiques à court et à long terme. Les effets aigus résultent de la perturbation des processus qui engagent la biomolécule, telles que la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN ou la ségrégation chromosomique qui peuvent déclencher l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Les effets à long terme découlent de l'apparition de mutations irréversibles induisant la perte ou l'altération de la fonction de gènes intimement liées au vieillissement, à de nombreuses maladies dégénératives ou auto-immunes ou aux cancers (cf. § I.5.7 et I.5.8).

En fonction du type et du taux de dommages ainsi que de la phase du cycle cellulaire (cf. Encart 1), la cellule tentera d'apporter la réaction adéquate pour le maintien de son intégrité et de l'être qu'elle compose. Plusieurs réponses peuvent être déclenchées suite à l'altération de la structure chimique de l'ADN :

- La réparation du dommage en fonction de la nature de ce dernier. Les différents mécanismes de réparation seront détaillés dans le chapitre 4.
- La tolérance du dommage : dans le cas d'une lésion bloquant la synthèse d'ADN par les polymérase répliquatives, ces dernières peuvent être remplacées par des polymérase translésionnelles, plus ou moins spécialisées dans l'incorporation de dNTP adéquats en face de la séquence endommagée (cf. § I.2.6). Dans ce cas, le dommage initial n'est pas réparé [195].
- L'activation des points de contrôle (« checkpoints ») du cycle cellulaire : les points de contrôle du cycle cellulaire sont des voies de régulation qui régissent l'ordre et la durée des transitions du cycle cellulaire afin d'assurer l'achèvement d'un événement cellulaire avant le début d'un autre. Différents points de contrôle de l'état de la cellule avant la phase S (G1/S), au cours de la phase S et avant la mitose (G2/M), permettent de retarder ou de stopper la progression du cycle pour permettre la réparation des dommages avant qu'ils ne soient convertis en mutations permanentes [196].

- Le remodelage de la chromatine : la détection des lésions et leur réparation ont lieu dans le contexte chromatinien. La réorganisation de cette structure est souvent indispensable pour permettre l'accès des protéines à la zone altérée et permettre la signalisation du dommage. La modification des histones, et la régulation de la compaction des nucléosomes sont nécessaires pour cette signalisation [197-199].
- La mort cellulaire : le plus souvent, dans le cas où les dommages sont trop nombreux ou toxiques pour la cellule, l'activation d'une voie de signalisation spécifique permet de programmer la mort de la cellule par apoptose [200]. L'apoptose est donc un processus de mort cellulaire, régulé par une machinerie intrinsèque de la cellule qui reflète sa décision de mourir en réponse à un stimulus (dommages à l'ADN). La nécrose ou l'autophagie peuvent également être déclenchées à la suite de dommages [201, 202]. Plusieurs paramètres tels que le type et l'intensité du stimulus, le type cellulaire et l'environnement physiologique de la cellule déterminent quel processus de mort est entrepris [203].

L'ensemble des processus mentionnés ci-dessus résulte de la détection du dommage et de la transduction du signal généré à la suite de l'altération de l'ADN. La biochimie de ces événements, regroupés sous le terme « réponse aux dommages de l'ADN » (« DNA Damage Response », DDR) est extrêmement complexe et finement régulée [204]. De façon simplifiée, le dommage est d'abord détecté par des protéines « senseurs », puis le signal relayé à des protéines « transductrices » qui vont elles-mêmes activer des protéines « effectrices » responsables de l'arrêt du cycle cellulaire, de la régulation de la réparation et de la transcription de l'ADN, de l'apoptose, en fonction de l'état du génome. A titre d'exemple, lorsqu'une cassure de brin est générée, ou qu'une fourche de réplication est avortée, le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) ou 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) sont recrutés respectivement au site d'ADN endommagé et mobilisent à leur tour les protéines ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad-3-related), chefs d'orchestre de la DDR [205-207]. Plus de 700 protéines ont été identifiées comme substrats de ces deux sérine/thréonine kinases. Parmi elles, on retrouve des enzymes impliquées dans la réplication, des polymérases translésionnelles, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et dans le remodelage de la chromatine, des suppresseurs de tumeurs et de nombreux facteurs de transcription [208]. Il s'ensuit une cascade de phosphorylation qui permet l'arrêt du cycle cellulaire notamment *via* l'activation des Checkpoint kinases (Chk) 1 et 2 et l'inhibition des « Cyclin dépendant kinases » (Cdk), et la réparation du site endommagé [196, 209]. Si cette dernière est inefficace, l'activation du suppresseur de tumeur p53 permet, *in fine*, l'entrée en sénescence de la cellule ou, dans le cas fatal, à son apoptose [210, 211].

En résumé l'ensemble des processus antérieurs (réplication, transcription) ou consécutifs (réparation, arrêt du cycle cellulaire, apoptose, ...) à l'agression de la molécule support de l'hérédité est hautement régulé et coordonné de façon à limiter les conséquences pathologiques des dommages résultants (cancérogénèse, vieillissement naturel, maladies neurodégénératives ou auto-immunes,...). Après la détection des dommages, ceux-ci peuvent être directement réparés. Dans le cas où la cellule nécessite un délai supplémentaire, elle peut activer les points de contrôle qui vont permettre de retarder ou de mettre en pause la progression du cycle cellulaire. En parallèle, la réponse aux dommages à l'ADN conduit à l'induction de programmes transcriptionnels, permettant le renforcement de la réparation de l'ADN, et lorsque le niveau de dommages est trop sévère, à l'initiation de l'apoptose [196, 212].

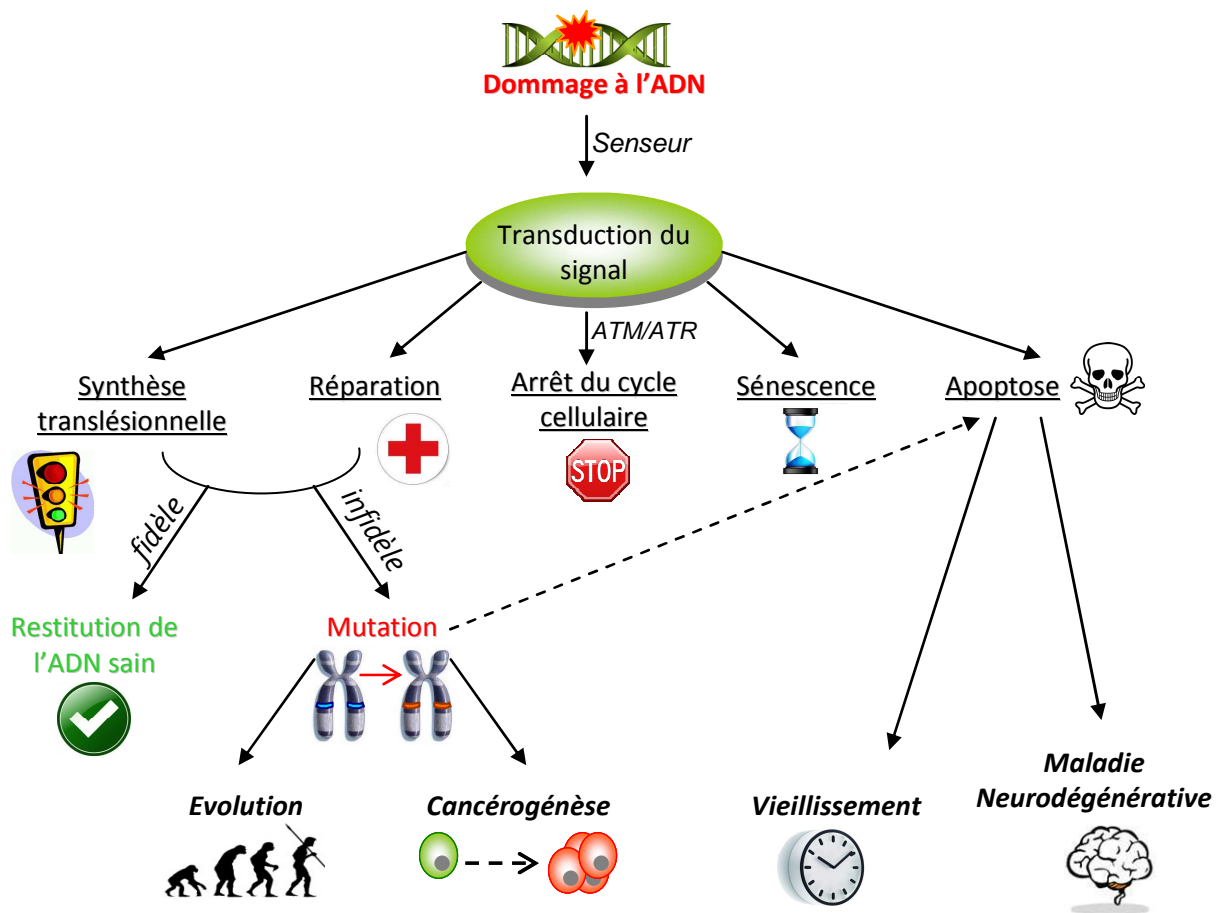


Figure 7: Principaux mécanismes biochimiques impliqués dans la Réponse aux Dommages de l'ADN (DDR).

Encart 1 : Le cycle cellulaire

Le cycle de division cellulaire, ou cycle cellulaire, est un processus vital par lequel une bactérie se multiplie, un zygote se développe en organisme, mais aussi par lequel les cellules sanguines ou des organes se renouvellent. Chez les procaryotes le cycle cellulaire consiste simplement en la duplication du matériel génétique et la croissance de la cellule qui aboutit à sa division par scissiparité, également appelée division binaire. Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est plus complexe et, bien que continu, peut être divisé en quatre phases discrètes durant lesquelles la cellule va croître, dupliquer son matériel génétique et se diviser :

La phase G_1 (Gap 1), dite aussi phase de croissance : la cellule prépare la phase S ; elle biosynthétise les protéines nécessaires ainsi que les organelles, sa taille augmente. A la fin de cette étape un point de contrôle (G_1/S) décide du devenir de la cellule. Cette dernière pourra sortir du cycle cellulaire (phase G_0) ou bien continuer vers l'étape suivante. Dans ce cas, la cellule s'assure que tout est prêt pour la synthèse d'ADN et que ce dernier n'est pas endommagé.

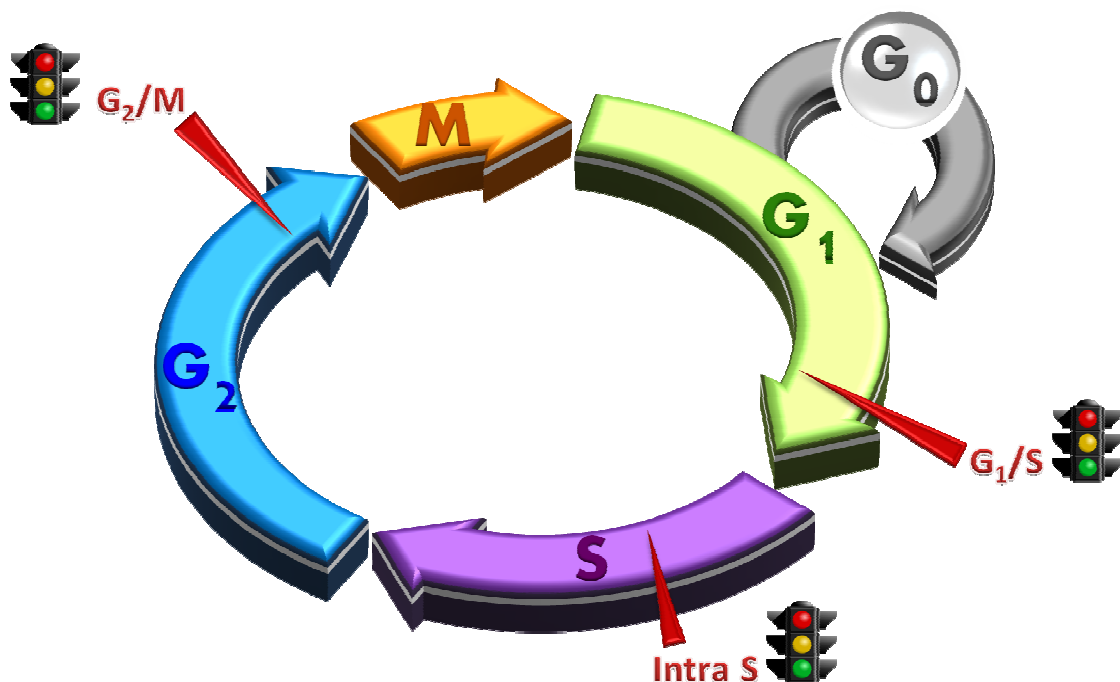
La phase S (Synthesis) : l'intégralité de l'ADN chromosomique est dupliquée par la machinerie répliquative. Chez les mammifères la quantité d'ADN passe donc de $2n$ (2 chromosomes à 1 chromatide) à $4n$ (2 chromosomes à 2 chromatides). La cellule peut également

activer des systèmes de contrôle intermédiaires si l'ADN subit des dommages afin de ralentir la progression de la synthèse pour lui permettre de les réparer [213]. Notons ici que la réplication de l'ADN mitochondrial n'est pas limitée à la phase S. La machinerie répliquative particulière des mitochondries régule la multiplication de ces organelles en fonction des besoins énergétiques de la cellule [214].

La phase G_2 (Gap 2) : la cellule synthétise et assemble les composants nécessaires à la ségrégation des chromosomes notamment les microtubules. Un dernier point de contrôle (G_2/M) assure l'intégrité des chromosomes avant que la cellule n'entre en mitose et ne se divise.

La phase M (Mitosis) : étape ultime du cycle cellulaire, c'est au cours de celle-ci qu'a lieu la répartition des chromosomes (séparation des chromatides de chaque chromosome) et des organelles de part et d'autre de la cellule pour, finalement, donner naissance à deux cellules filles par cytotédière.

La phase G_0 : mentionnée précédemment, cette phase correspond à un état sénescence ou quiescent (non prolifératif) transitoire ou définitif de la cellule au cours de laquelle la cellule peut entamer ou poursuivre sa différenciation.



4. La réparation de l'ADN

La sauvegarde de l'intégrité génomique est essentielle pour la survie des organismes. Afin de préserver la biomolécule, les cellules disposent d'un arsenal de dispositifs cellulaires qui permettent de prévenir la formation des dommages. La liste suivante, bien que non exhaustive, rend compte de la diversité de ces mécanismes chez les eucaryotes.

- Comme évoqué précédemment, l'ADN nucléaire n'est pas « nu », mais compacté en association avec un ensemble de protéines sous forme de chromatine. La structure chromatinienne fournit une protection physique des bases de l'ADN contre divers agents génotoxiques [215-217]. Toutefois, cette structure est dynamisée grâce, entre autres, à un ensemble de modifications post-traductionnelles des histones [5]. Ces remaniements permettent de réguler le niveau de compaction des nucléosomes afin d'autoriser l'accès des protéines indispensables aux processus cellulaires impliquant la biomolécule (réplication, transcription, réparation,...) [218, 219]. De plus, certaines protéines sont capables de se lier à l'ADN dans le but de protéger sa structure contre une source de dommages. Par exemple, il a été montré que la protéine Tau (tubule-associated-unit), principalement impliquée dans la modulation de la stabilité des microtubules axonaux, est transloquée en masse dans le noyau suite à un choc thermique ou un stress oxydatif. Cette protéine se lierait à l'ADN et favoriserait sa protection en induisant un changement structural du biopolymère [220]. Ce mécanisme de protection de l'ADN par la fixation de petites protéines solubles se retrouve chez les procaryotes [221, 222]. En outre, il a été montré que certaines molécules organiques telles que des polyamines (putrescine, spermidine,...) protègent la biomolécule contre de multiples sources d'agression [223, 224].
- Le stress oxydatif généré par la chaîne respiratoire ou par des sources exogènes a conduit les cellules à développer des systèmes anti-oxydants pour contrer les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène. Par exemple, plusieurs enzymes telles que la catalase ou les superoxyde dismutases sont chargées de décomposer le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde respectivement [225, 226]. Les cellules biosynthétisent ou accumulent par le biais de la nutrition un ensemble de molécules réductrices capables de capter les radicaux libres hautement réactifs. C'est le cas par exemple du glutathion ou de plusieurs vitamines et provitamines [227, 228].

- Egalement, nous avons énoncé précédemment que la modification du pool de nucléotides triphosphates, précurseurs de la synthèse d'ADN, est source de dommages lorsque ceux-ci sont incorporés par erreurs par une ADN-polymérase. Certaines enzymes ont pour substrats ces nucléotides modifiés et les désactivent en hydrolysant la liaison phosphodiester. Notons par exemple la dUTPase ou MTH-1 qui dégradent spécifiquement la désoxyuridine triphosphate et la 8-oxo-désoxyguanosine triphosphate en nucléotides monophosphates [229-231].
- L'activité de relecture (3'→5' exonucléasique) des polymérases répliquatives peut également être considérée comme un mécanisme de sauvegarde du génome dans le sens où elle augmente considérablement la fidélité de la réplication (cf. § 1.2.6).

Les systèmes de protection « amont » de l'ADN listés ci-dessus ne sont pas infaillibles et des milliers de dommages menacent chaque jour l'intégrité du génome. Afin de contrecarrer les conséquences de ces lésions, le plus souvent délétères pour les cellules, les organismes ont mis en place différents systèmes de réparation de l'ADN, qui feront l'objet de la suite de ce chapitre.

“ DNA is, in fact, so precious and so fragile that we now know that the cell as evolved a whole variety of repair mechanisms to protect its DNA from assaults by radiation, chemicals and other hazards. This is exactly the sort of thing that the process of evolution by natural selection would lead us to expect. ”

Francis Crick

Intrinsèquement, l'évolution, au sens de modification du génome, est paradoxale. Plus le taux de mutations est élevé, plus la sélection naturelle opère sur de courtes périodes et donc l'évolution est rapide et permet une adaptabilité accrue de l'organisme aux changements environnementaux. A l'inverse, plus le taux de mutations est faible, plus l'évolution est lente mais garantit une meilleure survie des organismes [232]. La plus évidente façon de modifier le taux de mutations est d'altérer les activités de la réplication et de la réparation de l'ADN elles-mêmes. En effet, l'évolution des activités enzymatiques, des interactions entre constituants cellulaires et des mécanismes de régulation a joué un rôle central dans la création et le remodelage des différents systèmes de réparation [233]. L'ensemble des êtres vivants des trois super-règnes (bactéries, archées et eucaryotes) ainsi que certains virus sont dotés de différents systèmes enzymatiques plus ou moins

spécialisés dans la réparation des dommages de leur ADN. La création de nouvelles activités enzymatiques a probablement eu lieu selon des processus évolutifs divergents, complexes et lents. De façon générale, on note chez la plupart de ces enzymes une spécificité de substrat non exclusive qui leur permet de prendre en charge plusieurs dommages. Cette large spécificité de substrats aurait permis aux organismes de reconnaître et de réparer de nouveaux types de dommages et pourrait fournir une force de sélection à travers l'évolution, en réponse aux changements d'environnement intra et extra cellulaire [234]. Cette même caractéristique entretient une certaine redondance entre les différentes voies de réparation qui garantit une meilleure stabilité des génomes.

Chez les mammifères, on dénombre six voies distinctes de la réparation de l'ADN, chacune possédant un type de substrat particulier et un mécanisme qui lui est propre (cf. Figure 8) :

- La **réparation par réversion directe** regroupe quelques enzymes capables de réparer les lésions, notamment les adduits alkylés en position 6 de la guanine, sans exciser la portion d'ADN endommagée.
- La **réparation par excision de base** prend en charge une large variété de « petites lésions de l'ADN », à savoir les oxydations, alkylations, désaminations de bases mais également les sites abasiques.
- La **réparation par excision de nucléotides** reconnaît et répare les lésions plus volumineuses qui induisent une déformation structurelle conséquente de la double hélice.
- La **réparation des mésappariements** répare les lésions du même nom. Ces trois derniers points, bien qu'étant caractérisés par des mécanismes de réparation différents et distincts, rassemblent néanmoins certaines similitudes mécanistiques : chacun de ces systèmes de réparation implique l'excision du dommage (la base, le nucléotide ou un oligonucléotide) suivie d'une étape de resynthèse de la partie excisée en utilisant le brin non lésé comme matrice.
- La **réparation par recombinaison homologue** et la **réparation par suture des extrémités** sont deux voies distinctes remédiant aux cassures double brin et aux pontages inter-brins.

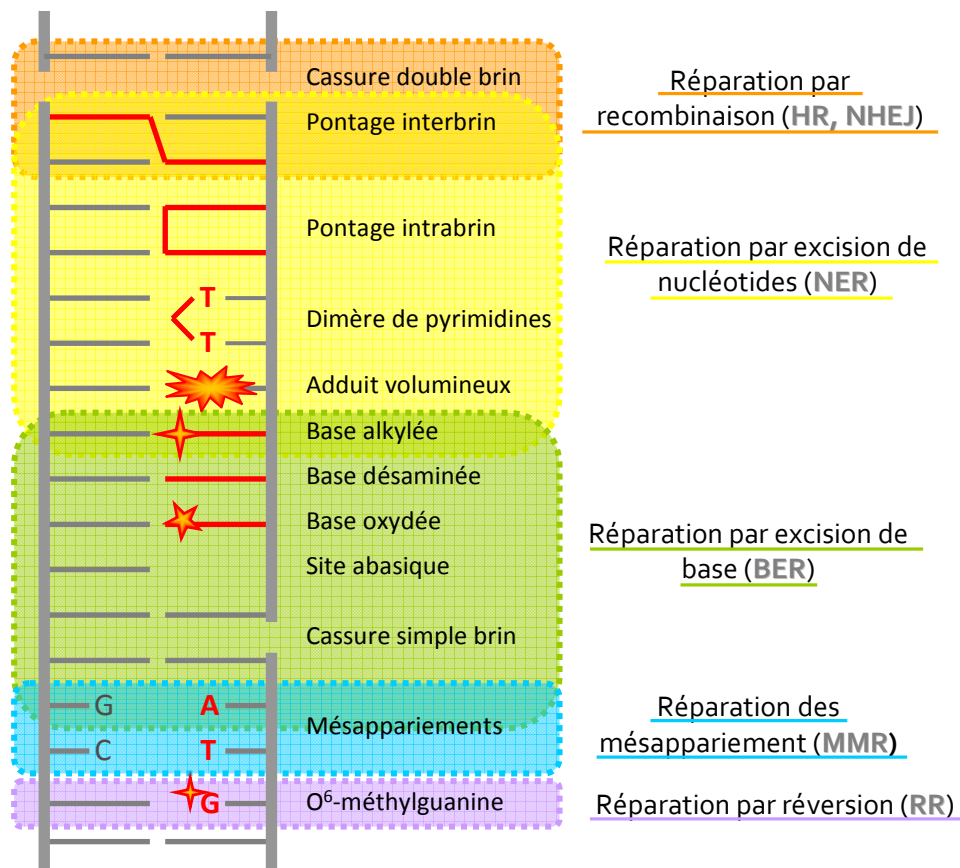


Figure 8: Illustration schématique de la diversité des lésions de l'ADN et des systèmes de réparation associés, chez les mammifères.

4.1. La réparation par réversion directe

Cette voie de réparation concerne majoritairement, voire exclusivement chez les mammifères, les produits d'alkylation (méthylation). Il existe deux mécanismes de déméthylation directe de l'ADN, dont les enzymes impliquées sont retrouvées aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Le premier mécanisme (Figure 9a et b) implique le transfert irréversible du groupement alkyle vers une cystéine de la protéine de réparation. Chez *E. Coli*, on retrouve l'enzyme Ada, constituée de deux sous-domaines catalytiques distincts : le domaine N-terminale (N-Ada) de l'enzyme catalyse la déméthylation des lésions méthylphosphotriester du squelette de l'ADN et la partie C-terminale (C-Ada) réverse les lésions O⁶MeG et O⁴MeT [235]. Il a été montré que la déméthylation de la lésion méthylphosphotriester, pourtant inoffensive, permet la signalisation de l'agression de l'ADN. En effet, une fois méthyliée, la protéine N-Ada active la transcription des enzymes impliquées dans la réparation des méthylation non physiologiques de l'ADN [236, 237]. Ceci constitue une réponse adaptative de la bactérie suite à l'endommagement de l'ADN [238].

E. Coli possède une seconde O⁶-méthylguanine transférase encodée par le gène *ogt*, constitutivement exprimé. L'enzyme fournit donc un moyen de protection permanent de la bactérie contre les faibles taux de méthylation alors que le système Ada sert comme senseur de plus forts taux de méthylation afin d'invoquer la surexpression des autres protéines de déméthylation inductibles [235]. Ce double système procure à l'organisme une défense efficace pour éviter la persistance de ces lésions hautement mutagènes.

Chez l'homme la réversion directe de la lésion O⁶MeG est conduite par la O⁶-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT aussi nommée AGT, Figure 9a). Cet homologue de C-Ada reconnaît également, bien qu'avec une affinité moindre, les produits d'alkylation plus volumineux en position O⁶ de la guanine (groupements chloroéthyle, benzyle,...) ainsi que la O⁴MeT [236, 239]. Cette protéine possède un mécanisme identique aux méthyltransférases bactériennes qui induit la désactivation de l'enzyme « suicide », une fois le méthyle déplacé vers la cystéine (C145). Celle-ci est finalement dirigée vers le protéasome par la voie ubiquitine-dépendante, afin d'être dégradée [240].

Une autre famille d'enzymes, les dioxygénases α -cétoglutarate-dépendantes, permet de déméthyliser les adduits plus stables par désalkylation oxydative (Figure 9c). Ces enzymes catalysent l'oxydation à deux électrons du méthyle en hydroxyméthyle en utilisant l'oxygène moléculaire et une molécule de cétoacide comme co-substrats, et un ion ferreux comme cofacteur [236]. Il s'en suit la décomposition spontanée de l'adduit hydroxylé par déformylation afin de restaurer la base non endommagée. La protéine AlkB d'*E. Coli* ainsi que ses homologues humains ABH2 et ABH3 réparent donc préférentiellement la 1-méthyladénine et la 3-méthylcytosine [241-243]

Il existe également des mécanismes de réparation directe des lésions UV conservés chez les plantes et les bactéries, bien que la plupart des organismes aient acquis le système de réparation par excision de nucléotides pour enlever les adduits volumineux (cf. § 1.4.3). Chez ces deux types d'organismes on retrouve des enzymes spécialisées, des photolyases, spécifiques des 6-4 PP_s ou des CPDs (Figure 9d). Ces flavoprotéines catalysent la réversion de la lésion grâce à l'activation du cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) par un photon bleu [235]. La photochimie de ces réactions de réparation est notamment détaillée dans les revues de Sancar A. et Essén L. O. [244, 245]. Bien que des homologues structuraux aient été identifiés chez les mammifères, ceux-ci ne présentent pas d'activité de photoréactivation mais sont impliqués dans la régulation du rythme circadien [246, 247].

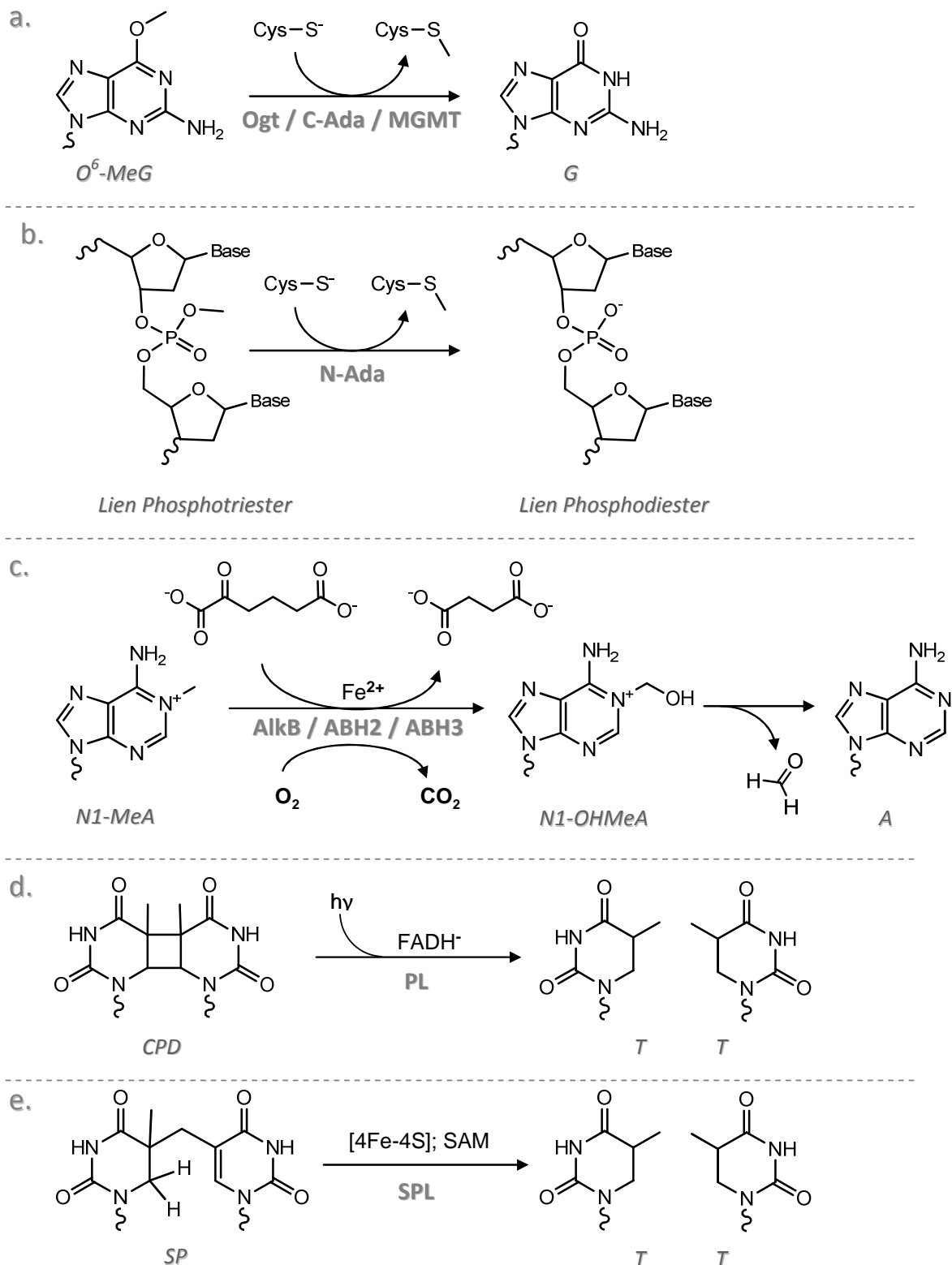


Figure 9: Mécanismes de réparation par réversion directe des bases alkylées et des lésions UV : A) Réparation de l' $O^6\text{-MeG}$ (et $O^4\text{-MeT}$) par transfert irréversible du groupement méthyle vers une cystéine activée d'une méthyltransférase (Ogt ou C-Ada chez la bactérie, MGMT chez les mammifères) ; B) Réparation des lésions phosphotriester selon le même mécanisme par l'enzyme N-Ada (bactéries) ; C) Réparation de la N1-MeA (et N3-MeC) par désalkylation oxydative catalysée par les dioxygénases AlkB (bactéries), ABH2 et ABH3 (mammifères) ; D) Réparation des lésions UV CPDs (ou 6-4 PPs) par photoréaction catalysée par une photoproduit lyase PL présente chez les bactéries et les plantes ; E) Réparation du spore photoproduit catalysée par la spore photoproduit lyase SPL, spécifique des spores bactériennes.

De façon intéressante, les adduits CPDs et 6-4 PPs ne sont pas observés dans les spores bactériennes [248]. Ces formes dormantes de bactéries sont induites en conditions de stress, comme le manque de nutriments, d'humidité ou l'exposition à certains rayonnements. Elles sont caractérisées par une déshydratation accrue et la présence en grandes proportions de petites protéines solubles acides (« Small Acid Soluble Proteins », SASPs) et d'acide dipicolinique (DPA). Ces conditions physiologiques particulières modifient les propriétés photochimiques de l'ADN (246, 247). Ainsi, l'irradiation UV (UVB et UVC) promeut la formation d'une lésion particulière, la 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine, aussi surnommée spore photoproduit (SP) [249]. Ce photoproduit particulier s'accumule dans la cellule dormante. Au cours des étapes précoces de germination, les SASPs sont dégradées permettant la réversion efficace de ces lésions par une métalloenzyme spécifique, la spore photoproduit lyase (SPL, Figure 9e), expliquant la résistance accrue des spores aux rayonnements UV [250, 251]. La réaction de réparation est médiée par la formation d'un radical SAM (radical 5'-adénosyle) qui peut abstraire le proton en position 6 de la dihydrothymine initiant la scission de la liaison C-C entre les deux bases [235, 252].

4.2. La réparation par excision de base

La réparation par excision de base (BER) prend en charge les « petites lésions de l'ADN », à savoir les produits d'alkylation, d'oxydation et de désamination des bases. Brièvement, la réparation est initiée par une ADN *N*-glycosylase qui reconnaît spécifiquement et excise la base lésée. Le site abasique néo-formé est pris en charge par une AP-endonucléase qui incise le lien phosphodiester directement en 5' du site AP. Le fragment désoxyribose est alors excisé et une polymérase réinsère le nucléotide manquant. La réparation est finalisée par une ligase qui restaure la continuité du brin. Le BER est également capable de réparer les cassures simple brin. Ce système de réparation faisant l'objet des travaux décrits dans ce manuscrit, il sera détaillé dans le paragraphe I.5.

4.3. La réparation par excision de nucléotides

Contrairement au BER, qui possède une collection d'enzymes spécifiques permettant la reconnaissance des différentes bases lésées (ADN *N*-glycosylases), la réparation par excision de nucléotides (NER) reconnaît la présence de divers dommages à travers la distorsion de l'hélice générée par ceux-ci. Ainsi, les lésions réparées par le NER incluent les lésions UV tels que les CPDs ou les 6-4 PPs, les adduits volumineux formés avec le BPDE, des agents chimiothérapeutiques (e.g. cisplatine) ou d'autres composés chimiques mais également les cyclopurines. Les mécanismes moléculaires du NER sont désormais bien connus et sont détaillés dans diverses revues [253-255]; le

NER implique le recrutement d'un complexe multiprotéique dont l'ensemble des partenaires recrutés (plus de 25) agit de concert pour mener à la réparation du dommage. On peut néanmoins distinguer plusieurs étapes séquentielles schématisées en Figure 10 : la reconnaissance de la lésion, l'ouverture de l'hélice autour de la lésion formant une « bulle d'ADN » dénaturé, l'incision d'un oligonucléotide contenant le dommage, la resynthèse de la portion excisée et enfin, la ligation de façon à restaurer la continuité du brin. De plus, on peut différencier deux sous-voies du NER en fonction du contexte de la réparation : la réparation global du génome (« Global Genome Repair », GGR) et la réparation couplée à la transcription (« Transcription Coupled Repair », TCR). La différence principale entre ces deux systèmes réside dans la reconnaissance de la lésion.

Dans le cas du GGR, la signalisation du dommage se fait *via* la fixation du complexe XPC-HR23B stabilisé par la centrine 2 (Cen2) [256]. Comme énoncé précédemment cette reconnaissance du dommage a lieu *via* la distorsion du double brin d'ADN générée par la lésion. Cependant, les lésions reconnues par le NER n'ont pas les mêmes conséquences sur la structure de la biomolécule. En contraste, les 6-4 PP, génèrent une réelle inflexion de l'ADN tandis que les dimères de types CDP n'induisent qu'une distorsion modeste [257]. Dans ce cas, d'autres protéines peuvent aider à la reconnaissance de la lésion. C'est par exemple le cas du complexe de liaison aux dommages de l'ADN, « DNA Damage-Binding » composés de DDB1 et DDB2 (ou XPE), possédant une grande affinité pour ces dommages. Il est proposé que la fixation de DDB induise une déformation de l'ADN supplémentaire permettant une meilleure reconnaissance du site lésé par XPC [258, 259].

La liaison de l'hétérotrimère XPC-HR23B-Cen2 est suivie du recrutement de plusieurs autres protéines (XPA, XPG, RPA et le facteur de transcription TFIIH). XPA et RPA facilitent la reconnaissance du dommage par les autres protéines tandis que les sous-unités XPB et XPD de TFIIH déroulent l'ADN autour de la lésion [260]. Il s'en suit la fixation du complexe ERCC1-XPF pour achever l'assemblage du complexe du NER. Les endonucléases ERCC1-XPF et XPG peuvent alors couper le brin d'ADN endommagé, respectivement en 5' et 3' de la lésion. Cette double incision génère un oligonucléotide de 27-30 monomères [261, 262]. La partie excisée est finalement resynthétisée par la machinerie répllicative composée des ADN polymérase δ ou ϵ aidées par les protéines accessoires PCNA, RPA et RFC [263, 264]. Finalement la réparation est parachevée par la ligase I qui rétablit la continuité du polymère [265].

De nombreuses lésions, notamment celles réparées par le NER, entravent l'activité de transcription de l'ARN polymérase II. L'arrêt de la machinerie transcriptionnelle constitue un second moyen de signaler la présence d'un dommage indépendant du recrutement de XPC sur celui-ci. Cela explique que la réparation de certaines lésions soit plus efficace sur le brin transcrit que sur le brin codant [266-268]. Ainsi, la réparation couplée à la transcription (TCR) est un système important afin

d'assurer la réparation efficace des lésions dans les régions actives du génome. Suite à l'arrêt de la polymérase sur le site bloquant, le recrutement d'un large complexe multi-protéique va opérer impliquant notamment les protéines CSA, CSB, XAB2 et certains facteurs du GGR tels que XPD, XPB et XPG [269]. Ce large complexe induirait le retrait de l'ARN polymérase, alors hyperphosphorylée [254, 270]. Cela permettrait la mobilisation des autres protéines du NER afin de mener l'excision de la lésion et la restauration de l'intégrité génomique selon un mécanisme similaire au GGR [255].

Depuis le début des années 2000 émerge un nouveau concept postulant que le BER peut également être couplé à la transcription (TC-BER) [271-273]. Ceci concernerait la réparation des lésions oxydatives telles que la 8-oxoguanine ou le glycol de thymine. Il a été montré que ces lésions oxydatives sont mieux réparées dans le brin transcrit que dans le brin non transcrit [274, 275]. De plus, une mutation des gènes *csa* ou *csb* entraîne une diminution de la réparation de ces dommages dans le contexte transcriptionnel sans affecter leur réparation par le BER dans le reste du génome [271, 276]. Il est donc légitime de faire l'hypothèse que ces lésions, lorsqu'elles bloquent la transcription, sont réparées par le TCR. Toutefois, il n'est pas encore défini si l'excision du dommage se fait par le recrutement des protéines du BER ou du NER, suite à la détection de celui-ci, entre autres par les protéines CSA et CSB.

Maladies associées aux déficiences du NER

Trois maladies génétiques rares autosomiques et récessives sont associées à un défaut du NER : Xeroderma Pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie (TTD). Ces maladies sont caractérisées par des phénotypes pléiotropes¹⁹ dépendant du gène touché et de la mutation elle-même. Cependant, tous les patients possèdent une sensibilité au soleil augmentée, plus ou moins sévère.

Xeroderma Pigmentosum est une maladie héréditaire caractérisée par une atrophie et des anomalies de pigmentation de la peau associées à des symptômes neurologiques dans 20 % des cas causés par une apoptose massive des neurones [277-279]. Surtout, on observe chez les individus XP une augmentation de l'incidence des cancers de la peau d'un facteur 1000 chez les moins de 20 ans ainsi qu'une propension au développement de cancers internes (poumons, tractus gastro-intestinal,...) [254, 280]. Sept groupes de complémentation génétique ont été établis (désignés de XPA à XPG) et impliquent la perte de fonction de l'enzyme du NER correspondante (XPA à XPG). Dans ce cas, le système de réparation du génome global (GGR) devient dysfonctionnel impliquant à la fois

¹⁹ Un phénotype est qualifié de pléiotrope si celui-ci rassemble un ensemble de caractéristiques différentes résultant pourtant de l'expression ou de l'inactivation d'un seul gène (gène pléiotropique).

l'hypersensibilité au rayonnement UV et le développement de cancers récurants dû à la mutagénicité des lésions non réparées. Une huitième forme de XP (XPV) n'est pas associée à une déficience du NER mais à la perte de fonctionnalité du gène codant pour la polymérase translésionnelle spécifique des lésions UV, l'ADN pol η (mentionnée précédemment) [281, 282].

Le syndrome de Cockayne est diagnostiqué par l'observation d'un retard de croissance dès l'enfance, des troubles neurologiques progressifs associés à un retard mental, une photosensibilité cutanée ainsi que divers désordres physiques et sensoriels (surdité progressive, anomalie dentaire, troubles ophtalmologiques...)[283]. 90 % des patients présentent une mutation des gènes *csa* ou *csb* [279]. Ainsi, le génotype des patients CS corrèle avec une réparation défectueuse des lésions couplée à la transcription (TCR) [268, 271]. Ces observations sont en adéquation avec les symptômes neurologiques observés : en effet, les neurones peuvent être affectés par la diminution de la réparation des lésions, générées dans un environnement fortement oxydant, par le TCR (TC-NER ou TC-BER). D'autres cas plus sévères, pouvant être associés à la maladie XP (XP/CS), présentent les gènes *xpb*, *xpd* ou *xpg* mutés [279]. Toutefois, il semble probable que les cellules de patients CS exhibent également des désordres transcriptionnels expliquant que tous les individus XP ne présentent pas de CS [272, 284] et que l'activité transcriptionnelle dans les cellules CSB est réduite [285].

La Trichothiodystrophie est caractérisée par des cheveux cassants dus à une déficience en protéines riches en soufre, une ichtyose (dystrophie cutanée) et une photosensibilité modérée [272]. La TTD est causée par des mutations dans les sous-unités de TFIIH et trois groupes de complémentation ont été identifiés : TTD-A (qui stimule l'activité ATPase de XPB), XPB et XPD [286-288]. Ainsi, le dysfonctionnement des facteurs XPB ou XPD, permettant l'ouverture de la double hélice, induit une perturbation à la fois de la transcription et de la réparation [289].

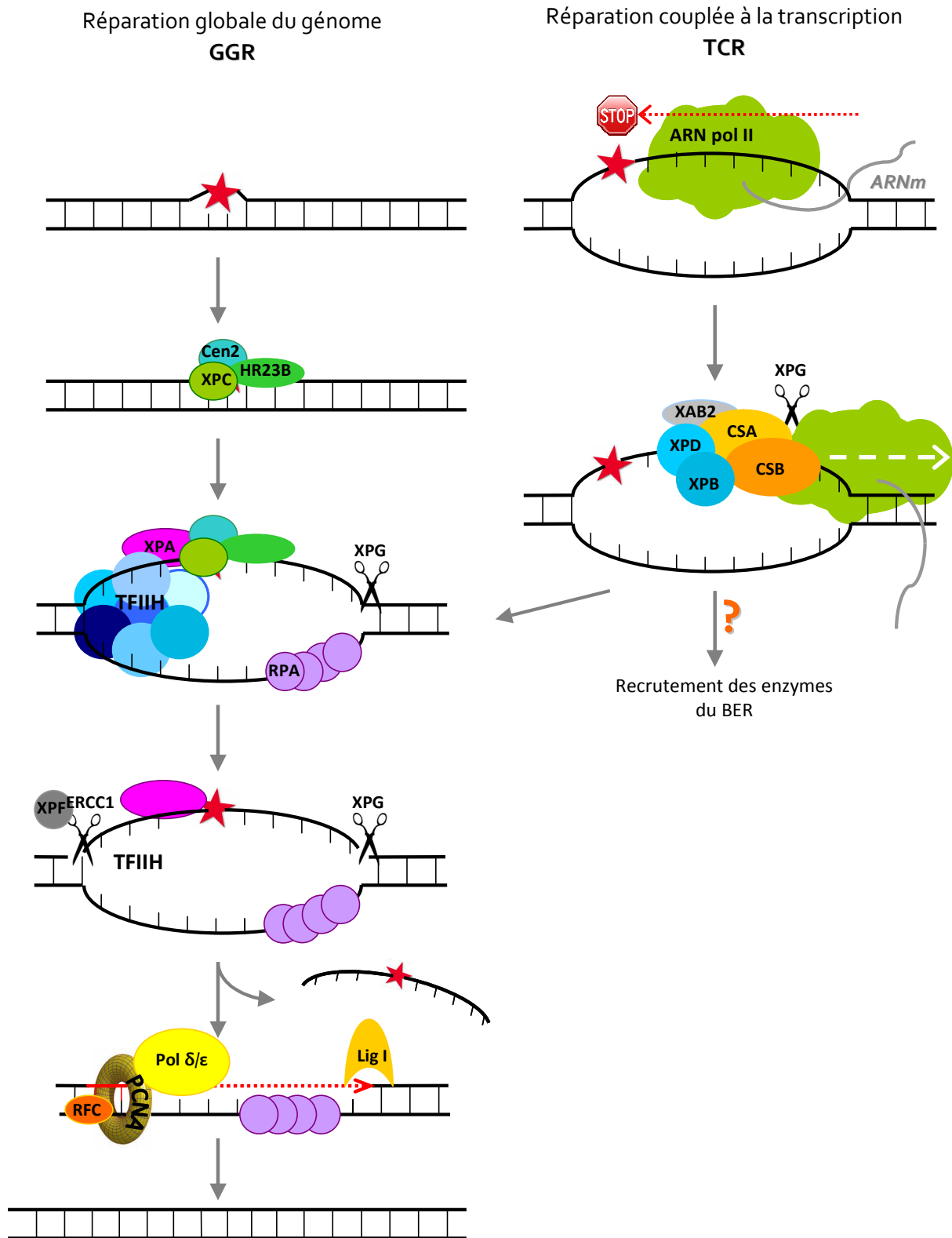


Figure 10: Mécanismes biochimiques de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER): réparation globale du génome (GGR) et réparation couplée à la transcription (TCR).

4.4. La réparation des mésappariements

La fidélité de la réplication est le facteur prédominant de la préservation de l'intégrité génomique. Outre l'activité de relecture des polymérases répliquatives leur permettant de corriger d'éventuelles erreurs, la réparation des mésappariements (« Mismatch Repair », MMR) est un mécanisme critique pour éviter l'altération du génome (Figure 11). Ce système de réparation, conservé des procaryotes aux mammifères, reconnaît à la fois les mésappariements ponctuels mais aussi les insertions/délétions (IDs) de quelques nucléotides, le plus souvent générées par un glissement de la polymérase sur le brin parent. Notons également que les mésappariements peuvent résulter d'altérations chimiques des bases : pour exemple, la désamination de la 5-méthylcytosine dans un double brin d'ADN conduit au mésappariement T : G reconnu par le MMR [290].

La première étape de la réparation, comme pour tous les mécanismes de réparation est la reconnaissance du dommage. Chez les mammifères, les mésappariements ponctuels ou les IDs de quelques nucléotides sont détectés par l'hétérodimère MSH2/MSH6 nommé aussi MutS α (homologue de la protéine bactérienne MutS formant un homodimère) [291]. Les IDs plus larges, formant des boucles d'ADN simple brin plus grandes, sont reconnues par le complexe MSH2/MSH3, ou MutS β [292]. MutS α ou β recrute l'hétérodimère MLH1/PMS2 ou MutL α (PMS2 pouvant être remplacé par d'autres homologues MLH2 ou MLH3 dans de plus rares cas). L'activité endonucléasique de PMS2 peut alors générer des incisions autour du mésappariement, de façon spécifique sur le brin néo-synthétisé grâce à son orientation fixée par le complexe MutS α .

Suite à cette reconnaissance, il s'ensuit l'excision d'un fragment d'ADN pouvant atteindre plusieurs centaines de monomères incluant la base mal-appariée. Un des mécanismes clé de cette voie de réparation est de pouvoir différencier le brin d'ADN lésé de la séquence correcte une fois le mésappariement reconnu, étant donné que la lésion n'est pas une modification chimique de l'ADN. Chez *E.Coli* cette distinction se fait grâce à l'asymétrie du duplexe, seul le brin parent étant méthylé transitoirement durant la réplication (on parle d'hémi-méthylation) [293]. La discrimination des deux brins chez la plupart des procaryotes et chez les eucaryotes est plus confuse. Toutefois, il semble que ce soit la discontinuité du brin endommagé (brin fils lors de la réplication) qui permettent sa discrimination du brin correct (parental). Le mécanisme exact, bien que mal connu, semble impliquer des protéines de la machinerie répliquative tel que PCNA et/ou RCF nécessaires à la resynthèse du brin, mais aussi aux étapes précoces de la réparation [294-297]. PCNA est composé de trois sous-unités formant un anneau. Cette structure lui permet d'encercler l'ADN selon une orientation bien précise qui guiderait l'excision par l'exonucléase I (ExoI) par le biais du complexe MutS(α ou β)/MutL α . MutS α augmente la processivité d'ExoI tandis que la polymérisation de RPA sur le simple

brin (non excisé) inhibe l'activité nucléasique de l'enzyme ; ces deux phénomènes antagonistes permettent la terminaison de l'excision une fois le mésappariement enlevé [298, 299].

Finalement, la polymérase δ permet la resynthèse du brin toujours régulée par la présence de PCNA/RFC et RPA. La ligase I catalyse l'étape ultime de formation du lien phosphodiester entre les deux parties du brin d'ADN réparé [300].

Pathologies associées à une déficience du MMR

Le MMR permet d'augmenter la fidélité de la réplication de plusieurs ordres de grandeur [301, 302]. Ainsi, une défaillance d'un des acteurs majeurs de ce système de réparation induit inexorablement une augmentation des mutations génomiques.

Chaque année, un demi-million de nouveaux cas de cancer du colon sont diagnostiqués. Parmi eux, 3-4 % sont des syndromes familiaux de cancers héréditaires non polyposiques (« Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer », HNPCC) [303]. Ce syndrome autosomale dominant est caractérisé par une augmentation des risques de cancers colorectaux et d'autres cancers, associés à une déficience du MMR. Une des particularités typiques des cas de HNPCC est une instabilité génétique particulièrement élevée au niveau des microsatellites (« Microsatellite Instability », MSI) [304]. Les microsatellites sont des portions de génome composées de répétitions de séquences de quelques nucléotides et sont donc particulièrement sujets à des erreurs de réplication par glissement de la polymérase [305]. Nous avons mentionné précédemment que les insertions/délétions résultantes sont réparées par le MMR. Ainsi, la grande majorité des HNPCC proviennent d'une inactivation des protéines MLH1, MSH2 ou MSH6, bien que d'autres acteurs du MMR puissent être impliqués dans des cas de cancers plus atypiques.

Il a également été démontré que le MMR peut avoir un rôle dans la réponse aux thérapies anticancéreuses, notamment par des agents alkylants. En effet, le MMR reconnaît en plus des mésappariements entre bases « normales » certains mésappariements avec une base lésée. C'est par exemple le cas pour la thymine appariée à une O⁶-méthylguanine présente dans le brin parental [306]. Lorsque cette paire de base est reconnue par MutS α , la réparation va conduire à l'excision de la thymidine qui sera remplacée par le même dNTP au vu des propriétés d'appariement de l'O⁶-MeG. Ce cycle de réparation futile conduit à la formation d'incisions répétées dans l'ADN dupliqué conduisant finalement à des cassures double brin induisant la mort des cellules [307]. Cet effet recherché en cancérothérapie est inhibé lorsque le MMR est inactivé dans les cellules tumorales [308-310]. Ces tumeurs sont donc résistantes à certains agents alkylants génotoxiques et acquièrent un phénotype mutateur, augmentant leur malignité [310, 311].

Réparation des mésappariements MMR

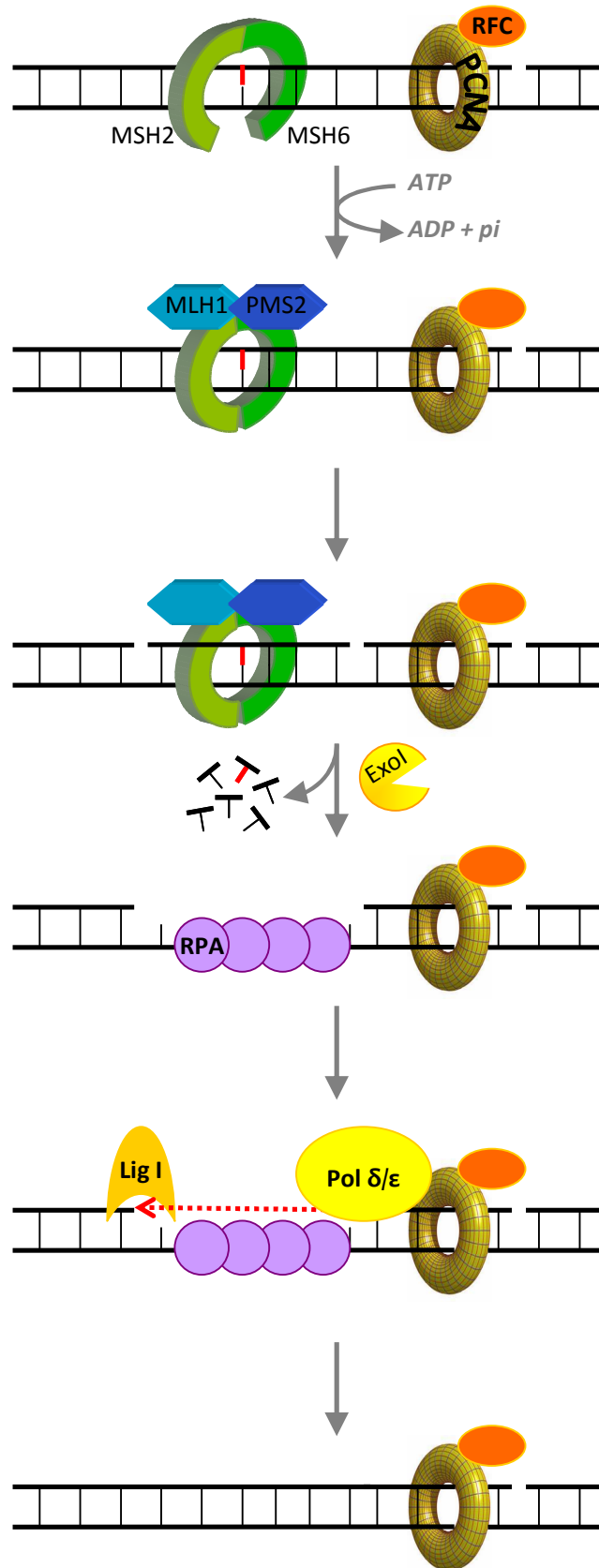


Figure 11: Mécanismes biochimiques de la voie de réparation des mésappariements (MMR).

4.5. La réparation des cassures double brin

Les cassures double brin (CDBs) peuvent survenir suite à divers évènements ; il est avéré que les radiations ionisantes (rayons X ou γ) génèrent efficacement ce type de dommages (cf § 1.2.5). Egalement, les espèces réactives de l'oxygène peuvent altérer l'ADN dans des zones adjacentes résultant en des CDBs. Aussi, certaines enzymes nucléaires telles que les topoisomérases peuvent induire ce type d'altérations de façon inadvertance [312]. Un autre processus de formation de ces lésions se produisant spécifiquement durant la phase S est l'interaction de la fourche de réplication avec un dommage (dommage bloquant ou cassure simple brin) ou avec le repairosome, pouvant alors convertir les lésions initiales en CDBs [313].

Les CDBs sont probablement les dommages subits par la molécule d'ADN les plus délétères pour les cellules. En effet, les deux brins, portant chacun l'information génétique de son complémentaire, sont endommagés. S'ils ne sont pas, ou mal réparés, l'accumulation de réarrangements génétiques et la perte d'information promeut la tumorigénèse ou l'apoptose [314, 315]. A la suite de la formation d'une CDB, celle-ci est précocement détectée par le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN, retrouvé chez les mammifères) qui interagit avec les extrémités endommagées du double brin. Le complexe MRN permet à la fois de maintenir les deux extrémités de la cassure spatialement proches et d'activer les kinases ATM/ATR responsables de la signalisation du dommage *via* l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, le recrutement des systèmes de réparation,... (cf, § 1.3) [316]. Les mammifères sont pourvus de deux systèmes de réparation des CDBs distincts : la réparation par recombinaison homologue (« Homologous Recombination », HR) et la réparation non homologue par suture des extrémités (« Non-Homologous End Joining », NHEJ). Le premier utilise une séquence homologue pour restaurer fidèlement la séquence endommagée, le second, plus sujet aux erreurs de réparation, régule la ligation directe au niveau de la cassure.

4.5.a. La réparation par recombinaison homologue

La recombinaison homologue (Figure 12) est initiée par la résection des extrémités 5' impliquant le complexe MRN et d'autres nucléases (e.g. Mre1, Exo1) [317, 318]. Les extrémités 3', sont alors liées par de nombreuses unités RPA qui protègent le simple brin. RPA est subséquentement remplacé par Rad51, recruté par la protéine BRCA2. Rad51 forme un nucléofilament avec l'ADN et dirige l'invasion d'un duplexe homologue (le plus souvent la chromatide sœur lors de la réplication) par les extrémités simple brin. BRCA2 stimule l'activité recombinase de Rad51, nécessaire à l'échange de brin [319, 320]. Le brin envahi sert alors de matrice pour la synthèse de la séquence perdue. L'issue de la réparation est alors régie par un arsenal protéique qui permet de séparer les deux

double hélices et dépend de la résolution de cette structure. Lors de ce processus, des transferts d'informations d'une hélice à l'autre peuvent avoir lieu par conversions de gènes ou par enjambements (« crossing-over ») [317, 321].

4.5.b. *La réparation par suture des extrémités*

A l'inverse de la réparation par recombinaison homologe, les extrémités de la cassure ne sont pas digérées mais protégées par l'hétérodimère Ku70/Ku80. Le complexe Ku constitue le point d'arrimage des autres facteurs du NHEJ (Figure 12). Une élégante revue de Michael R. Lieber détaille le rôle de chacune des protéines impliquées dans le NHEJ [313]. Ku permet dans un premier temps le recrutement et l'activation de la sous unité catalytique du complexe DNA-PK (DNA-PK_{cs}) [322]. L'autophosphorylation de cette sous-unité induit la juxtaposition des deux brins à suturer et un réarrangement structural de la chromatine permettant l'accès des extrémités aux nombreux facteurs du NHEJ [323]. En effet, la majorité des cassures double brin n'est pas directement substrat pour la ligation, nécessitant des extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate [321]. La transformation des extrémités peut faire intervenir différentes enzymes en fonction de la nature des extrémités : le recrutement de la polynucléotide kinase (PNK) permet le transfert du groupement phosphate de l'extrémité 3' à l'extrémité 5', notamment lorsque les CDBs sont induites par des radiations ionisantes. Des nucléases sont requises pour l'élimination des bases endommagées et des mésappariements. Des polymérases (pol λ et pol μ) sont mobilisées pour restaurer les fragments perdus et éliminer les extrémités flottantes de l'ADN. Une autre enzyme, la nucléase Artemis, en association avec DNA-PKcs, joue également un rôle important dans la structuration d'extrémités 3'OH et 5'phosphate compatibles [324].

Une fois les extrémités préparées pour la ligation, la ligase IV, associée au cofacteur XRCC4, finalise la réparation [325]. Du fait de ce mécanisme, n'utilisant pas de brin matrice pour conduire la réparation, le NHEJ est qualifié de mécanisme de réparation peu fidèle induisant des insertions, des délétions ou des translocations de séquences.

Le NHEJ joue également un rôle crucial dans la recombinaison V(D)J, processus de réarrangement programmé de l'ADN par lequel la diversité des récepteurs des lymphocytes chez les vertébrés est générée (cf. Figure 16 et [326]). Ce procédé permet de produire des millions d'anticorps différents à partir de seulement quelques centaines de gènes (les gènes VDJ). De façon schématique, le génome des lymphocytes immatures est remodelé au niveau des portions codant pour les immunoglobulines par la réassociation de certains segments spécifiques. Ce processus est initié par une endonucléase (le complexe RAG-1/RAG-2) qui crée des cassures double brin au niveau de séquences spécifiques [327]. Les différents segments V (« variable »), D (« diversity ») et J

(« joining ») d'ADN générés peuvent alors être recombinaés entre eux de façon aléatoire par le système de réparation NHEJ qui crée de nouvelles jonctions entre les segments, tout en conservant la stabilité du génome [328].

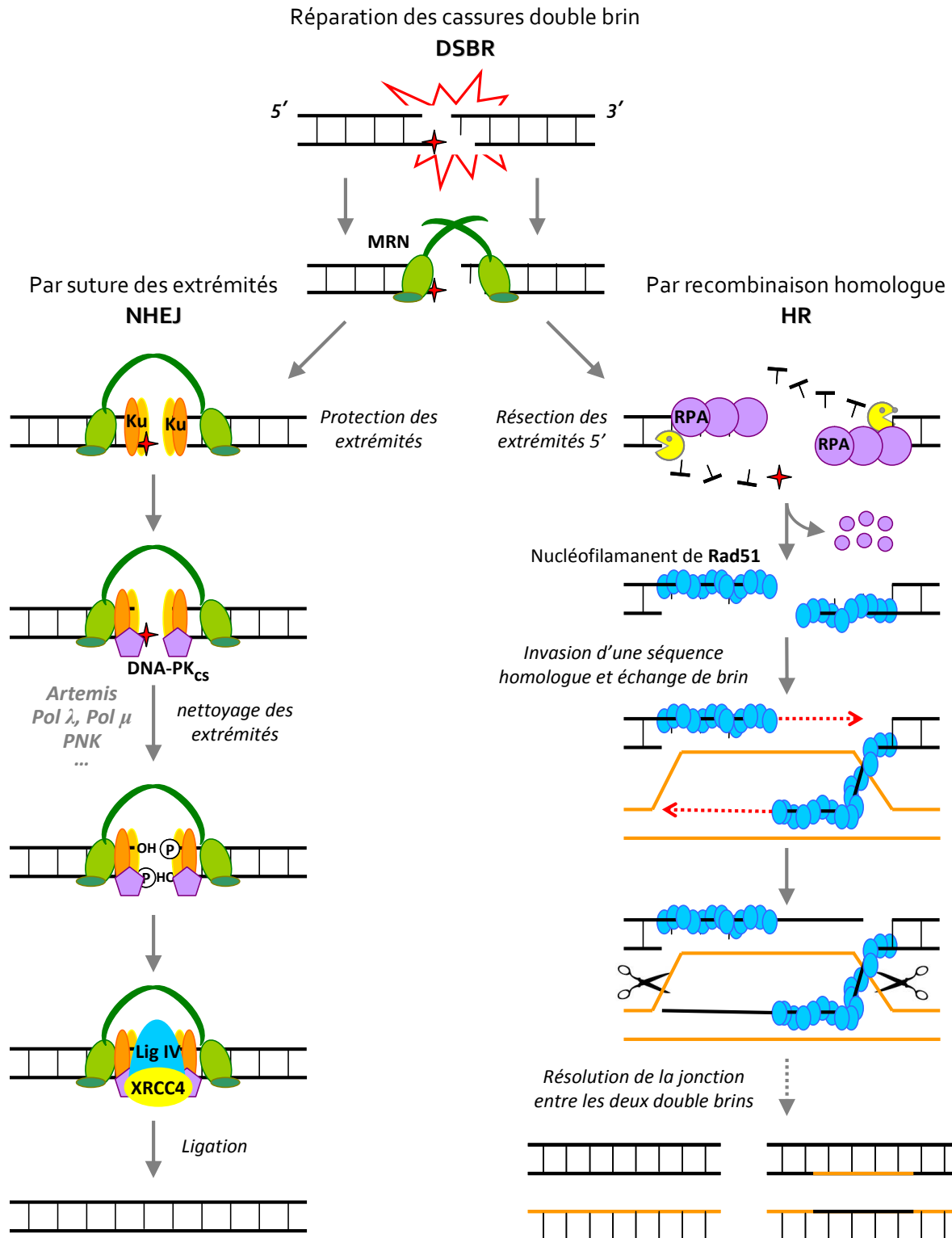


Figure 12: Mécanismes de réparation des cassures double brin d'ADN chez les mammifères (« double strand break repair », DSBR) : réparation par recombinaison homologue (« homologous recombination », HR) et réparation non homologue par suture des extrémités (« non homologous end-joining », NHEJ).

Plusieurs preuves que le HR et le NHEJ agissent à la fois en collaboration et en compétition sur la prise en charge des CDBs ont été mises en évidence [316]. Il est aujourd'hui bien établi que le NHEJ est le mécanisme de réparation privilégié chez les mammifères. Aussi, le choix de la voie de réparation est régulé au cours du cycle cellulaire [329]: le NHEJ est favorisé durant la phase G1, bien qu'il soit actif tout au long du cycle; en revanche, le HR est prévalent durant la phase S et G2, ceci se justifiant intuitivement par la disponibilité de la chromatide sœur nouvellement synthétisée, présentant une séquence homologue de choix pour mener fidèlement la réparation [317].

4.5.c. *Syndromes associés à une déficience dans la réponse et la réparation des cassures double brin*

De nombreuses pathologies, souvent des syndromes sévères, sont la conséquence d'une déficience de la réparation des cassures double brin.

L'Ataxie-Télangiectasie (**A-T**), référant aussi au syndrome de Louis-Bar, est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive [330]. Comme son nom l'indique, les symptômes les plus caractéristiques sont une ataxie et une télangiectasie précoces souvent associées à un dysfonctionnement du système immunitaire et une prédisposition aux néoplasies. Près de 50 % de la population A-T développe des cancers, le plus souvent avant 20 ans [331]. Le traitement de ces patients pose problème car ils sont également très radiosensibles [332]. La mutation génétique intrinsèque de cette maladie se positionne sur le gène *atm*. La protéine codée par ce gène, ATM, coordonne la réponse cellulaire des cassures double brin. ATM permet la régulation du cycle cellulaire et de la réparation des CDBs et est impliqué dans le déclenchement du processus apoptotique *via* p53. L'inactivation de l'activité kinase d'ATM cause donc un désordre de la réparation d'ADN par le HR ou le NHEJ, qui, en association avec une synthèse d'ADN non inhibée, est responsable de l'instabilité génomique observée dans les cellules de patients A-T. L'immunodéficiência s'explique par une interaction rompue entre ATM et le processus de recombinaison V(D)J encore mal définie.

Le syndrome de Nimègue (« Nijmegen Breakage Syndrome », **NBS**) est une maladie héréditaire rare dont les personnes touchées sont de petite taille et atteintes de microcéphalie (anomalie de croissance de la boîte crânienne). Elles présentent également un retard mental, une immunodéficiência et une prédisposition au développement de cancers notamment aux lymphomes. Les cellules des personnes NBS sont caractérisées par une instabilité génétique aiguë associée à une augmentation des cassures chromosomiques suite à une irradiation [333]. L'ensemble des patients

présente une mutation sur le gène *nbs1* codant pour la nibrine (ou NBS1) [334]. Ce partenaire du complexe MRN est impliqué dans la détection des CDBs, mais également dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire indispensable pour garantir la stabilité du génome au cours de la vie de la cellule [335, 336].

D'autres syndromes présentant des symptômes similaires aux personnes A-T ou NBS sont associés à une déficience dans la réparation des cassures double brin. Citons comme exemples l'**ATLD** (Ataxia Telangiectasia-Like Disorder) ou le syndrome de Seckel dont le génotype présente une mutation au niveau des gènes codant pour les protéines Mre1 (du complexe MRN) et ATR (impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN) respectivement [337, 338].

5. La réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de base (BER) est probablement le système de réparation le plus utilisé et est très bien conservé verticalement, des bactéries aux mammifères, en passant par les plantes [339]. De ce fait, nous dédions essentiellement ce chapitre à la description de la réparation par excision de base chez les mammifères. Cette voie enzymatique, mise en évidence il y a une quarantaine d'années par Lindahl [340], répare les « petites lésions de l'ADN ». Ces lésions incluent les produits d'alkylation (3-méthylpurines, 7-méthylpurines, éthénobases), d'oxydation (8-oxopurines, FAPypurines, pyrimidines oxydées) et de désamination (hypoxanthine, uracile, thymine appariée à une guanine) de bases. Le BER prend également en charge les sites abasiques et les cassures simple brin, qui, en plus d'être des dommages de l'ADN, sont retrouvés comme intermédiaires dans cette voie de réparation. Le mécanisme biochimique de réparation peut être segmenté en différentes étapes durant lesquelles chaque enzyme prend en charge la lésion et laisse place à la suivante selon le modèle du « passage du bâton » lors d'un relai (cf. Figure 13 et [341]). Ces étapes comprennent la reconnaissance de la base altérée et son excision, l'incision du squelette sucre-phosphate, le retrait du fragment apurinique-apyrimidique, la resynthèse par une ADN-polymérase et finalement la jonction du brin par une ligase. Bien que ce processus ait lieu de façon séquentielle, le BER est aujourd'hui considéré comme un système unifié, dans lequel les différents partenaires sont recrutés, modifiés, interagissent entre eux et avec les autres processus de réparation, de réplication, de transcription [342]. Après avoir détaillé les différentes étapes clés énoncées ci-dessus, nous décrirons certaines des enzymes du système BER, notamment glycosylases et AP-endonucléases. Par la suite, nous évoquerons le rôle du BER au-delà de la réparation de l'ADN. Finalement, nous concluons sur l'implication duale des protéines du BER dans la cancérogénèse et la résistance de certains cancers aux traitements radio-et chimiothérapeutiques.

5.1. Biochimie du système BER

5.1.a. Reconnaissance et excision de la base

Le BER répare des bases modifiées qui sont très proches structuralement et chimiquement des bases normales. Contrairement au NER et au MMR qui sont capables de reconnaître un large panel de substrats (lésions déformant la double hélice ou mésappariement déstabilisant) grâce à un unique complexe protéique (XPC-XR23B ou Mut α respectivement), le BER utilise un set d'enzymes, des ADN *N*-glycosylases, spécialisées dans la reconnaissance d'un type de dommages. Chez les mammifères on dénombre 11 glycosylases (cf. Tableau 1). Chacune d'entre elles reconnaît et excise spécifiquement une ou plusieurs lésions, avec certaines redondances qui garantissent l'efficacité du système de réparation. De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes de reconnaissance des lésions par les ADN *N*-glycosylases, capables de détecter les bases endommagées de façon efficace, parmi plusieurs milliards de bases normales. Bien qu'elles possèdent des caractéristiques mécanistiques qui leur sont propres, il est admis que ces enzymes « scannent » la double hélice et détectent leurs substrats grâce à un résidu protéique inséré dans la double hélice agissant comme une tête de lecture [343-345]. En effet, la cohésion du double brin est assurée par plusieurs forces : les liaisons hydrogène données par la complémentarité des bases, et l'empilement des noyaux aromatiques des bases (« π stacking ») promeuvent la stabilisation du duplexe [346]. Lorsqu'une base est alkylée, oxydée, ou désaminée, les propriétés d'appariements de celle-ci sont modifiées, ou l'aromaticité est perdue [347]. Cette perturbation locale du duplexe est sondée par la glycosylase et la base endommagée est extrudée du double brin pour se retrouver dans la poche catalytique de l'enzyme. La base est finalement excisée par hydrolyse de la liaison *N*-glycosidique, générant un site abasique [348]. Il existe deux classes d'ADN glycosylases [349]: les ADN *N*-glycosylases monofonctionnelles et bifonctionnelles (Tableau 1). Les premières, incluant AAG ou UNG, catalysent uniquement le clivage de la liaison N-C1' en utilisant une molécule d'eau activée comme nucléophile [350]. Les glycosylases bifonctionnelles catalysent non seulement l'excision de la base, cette fois-ci *via* la formation d'une base de Schiff entre le désoxyribose et un résidu lysine de l'enzyme, mais aussi la coupure du lien phosphodiester en 3' (β -élimination pour OGG1 par exemple) ou en 3' et 5' du dommage (β,δ -élimination pour NEIL1) [351, 352].

Glycosylase	Substrats	AP-lyase	Références
UNG	U sb, U ds, 5-OHU	Non	352-354
SMUG1	U sb, U db, 5-hmU, (εC:G)	Non	353, 355-358
TDG	U:G, T:G, 5-hmU, (εC:G),	Non	359-362
MBD4	U:G, T:G, (Tg:G, T:O⁶MeG)	Non	363-636
OGG1	8-oxoG:C, FAPyG:C, (8-oxoA:T FapyA:T)	Oui (β)	367-369
MYH	A:8-oxoG, A:G, (2-OHA:G, A:C)	Non	370,371
NTH1	Tg, Ug, DHT, 5-OHC, (FAPyG),...	Oui (β)	372,373
NEIL1	Tg, Ug, DHT, DHU, 5-OHC, 5-OHU, FapyG, FapyA, (8-oxoG)...	Oui (β,δ)	374,376
NEIL2	5-OHC, 5-OHU, DHT, DHU,	Oui (β,δ)	377,378
NEIL3	Sp, Gh, 5-OHU, 5-OHC, FaPyG, FaPyA,...	Oui (β)	383,385
MPG (AAG)	Hx, 3-MeA, 3-MeG, εA, (7-MeA, 7-MeG)	Non	379,382

Tableau 1: Glycosylases humaines et leurs principaux substrats (en gras) ; sb=simple brin, ds=double brin, U=uracile, 5-OHU=5-hydroxyuracile, 5-hmu=5-hydroxyméthyluracile, εC=éthénocytosine, Tg=glycol de thymine, 8-oxoG=8-oxoguanine, FAPyG= 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 8-oxoA=8-oxoadénine, FAPyA=4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 2-OHA=2-hydroxyadénine, Ug=uracile glycol, DHT=dihydrothymine, DHU=dihydrouracile, 5-OHC=5-hydroxycytosine, Hx=hypoxanthine, 3-MeA=3-méthyladénine, 3-MeG=3-méthylguanine, εA=éthénoadénine, 7-MeA=7-méthyladénine, 7-MeG=7-méthylguanine, Sp=Spiroiminohydantoïne, Gd=guanidinohydantoïne.

5.1.b. Incision du squelette sucre-phosphate par l'AP-endonucléase

Lorsque la déglycosylation fait intervenir une enzyme monofonctionnelle, le site abasique néo-formé est pris en charge par une AP-endonucléase (APE1) qui incise le lien phosphodiester directement en 5' de celui-ci générant des extrémités 3'-OH et 5'-désoxyribophosphate (dRP) [387, 388]. APE1 catalyse également cette réaction avec l'aldéhyde polyinsaturé 3'-phosphate (3'-PUA) généré par β-élimination suite à l'activité AP-lyase d'une glycosylase bifonctionnelle. Dans le cas où la réparation est initiée par une ADN-glycosylase bifonctionnelle telle que NEIL1, la réaction de β,δ-élimination consécutive à l'excision de la base mène à la formation d'un « trou » d'un nucléotide

entouré de deux extrémités phosphorylées. Dans tous les cas, une cassure simple brin est générée dans la double hélice. La suite de la réparation va dépendre de la nature chimique des extrémités.

5.1.c. *Le nettoyage des extrémités*

Le (re)synthèse d'ADN par une ADN-polymérase utilise l'énergie de l'hydrolyse de nucléotides 5'-triphosphate et exige donc une extrémité 3'-hydroxyle pour la polymérisation. La ligation nécessite par conséquent une extrémité 5'-phosphate pour former le lien phosphodiester. Or, que ce soit lors de l'initiation de la réparation par excision de base ou par la formation de cassures simple brin non physiologiques, les extrémités générées sont diverses et ne remplissent pas forcément ces conditions. Aussi, une pluralité d'enzymes permet de « nettoyer » les extrémités bloquantes et de les préparer pour la synthèse d'ADN (résumé dans le Tableau 2) :

- Si la coupure de brin est générée par l'action conjointe d'une glycosylase monofonctionnelle et de l'AP-endonucléase, le 5'-dRP est excisé grâce à l'activité AP-lyase spécifique à la polymérase β que ne possèdent pas les polymérases répliquatives δ ou ϵ [389].
- La plupart des bases oxydées sont excisées par des glycosylases bifonctionnelles par β -élimination (NTH1, OGG1). Dans ce cas, des extrémités 5'-phosphate et 3'-PUA sont formées. Cette dernière est substrat pour APE1 qui restaure l'extrémité 3'-OH [390].
- Le cas particulier des glycosylases NEIL1 et NEIL2 engendre des extrémités 3' et 5' phosphorylées par β,δ -élimination du désoxyribose. L'élimination du phosphate requiert l'enzyme polynucléotide kinase (PNK) [391]. Cette enzyme présente une activité duale 3'-phosphatase et 5'-kinase qui permet donc le retrait du phosphate en 3', qui n'est pas excisé par l'AP-endonucléase [392, 393].
- Les espèces réactives de l'oxygène sont responsables de la formation de cassures simple brin dont les extrémités sont souvent endommagées. [394]. Ces extrémités bloquantes incluent communément les 3'-phosphoglycolate, 3'-phosphoglycoaldéhyde, 3'-phosphate ou 5'-hydroxyle (cf. § I.2.2 et [395, 396]). Les deux premières peuvent être éliminées par APE1 tandis que le groupement phosphate peut être transféré de l'extrémité 3' à 5' par la PNK [397, 398].
- Parfois, il arrive que la réaction de ligation soit avortée, résultant en une extrémité 5'-adénylate liée covalentement au groupement phosphate [399]. Dans ce cas, l'aprataxine (APTX), une nucléotide hydrolase, catalyse le retrait du groupement adénylate [400].

• Des cassures simple brin particulières peuvent être générées lors d'un dysfonctionnement de la topoisomérase 1 (Top1, modulant la structure super-enroulée de l'ADN). Ainsi, l'enzyme reste covalentement liée à l'ADN. La tyrosyl ADN-phosphodiesterase TDP1 catalyse l'hydrolyse du lien phosphodiester entre la chaîne latérale d'une tyrosine de Top1 et l'extrémité 3' de l'ADN [401]. Le trou formé possède une extrémité 3'-phosphate et 5'-OH. Le groupement phosphate est finalement transféré d'une extrémité à l'autre par PNK [392, 402].

Ainsi, la préparation des extrémités (« end cleaning » ou « gap tailoring » en anglais) constitue une étape intermédiaire importante dans la réparation par excision de base et des cassures simple brin. Ce processus fait le lien entre l'initiation de la réparation par les activités glycosylase/AP-endonucléase et sa finalisation par la polymérase/ligase.

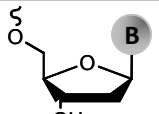
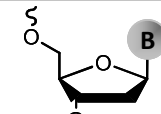
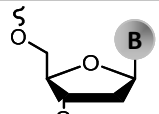
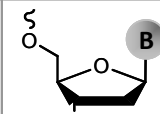
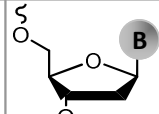

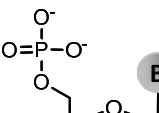
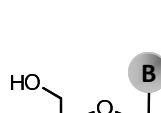
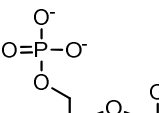
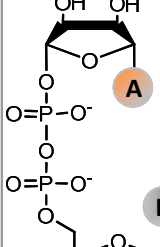




				
3'-hydroxyle	3'-phosphate	3'-PUA	3'-phosphoglycolate	3'-Tyrosinyl-Top1
Glycosylase/APE1	Glycosylase (β, δ) CSB	Glycosylase (β)	CSB (EROs)	Inhibiteur Top1
	PNK (3'-phosphatase)	APE1	APE1	TDP1
				
5'-phosphate	5'-hydroxyle	5'-désoxyribo-phosphate	5'-ADP	
Glycosylase/APE1 Glycosylase (β, δ)	CSB Inhibiteur Top1	Glycosylase/APE1	Ligation avortée	
	PNK (5'-kinase)	Polβ	Aprataxine	
				
Nature de l'extrémité	Enzymes/événement créant la coupure	Protéines requise pour la préparation des extrémités		

Tableau 2: Préparation des extrémités à la ligation (« gap tailoring ») (adapté de [403]).

5.1.d. Synthèse d'ADN et Ligation

Les étapes décrites précédemment conduisent toutes à un intermédiaire caractérisé par une brèche d'un nucléotide dans le brin initialement endommagé bordé de résidus 3'-OH et 5'-phosphate. De façon prépondérante, l'insertion du nouveau nucléotide est conduite par l'ADN pol β complexée à XRCC1 (pour « X-ray repair cross-complementing group 1 protein »). L'ultime étape de ligation est assurée par la ligase III α (LigIII α), associée également à la protéine échafaudage XRCC1. Cette sous-voie du BER, consistant à ne réintroduire que le nucléotide perdu est appelée voie « courte » (« short patch-BER », **SP-BER**) [404].

L'issue de la réparation est différente si l'extrémité 5' est réfractaire à l'activité AP-lyase de la polymérase β , dans le cas où le site AP serait oxydé en 2-désoxyribonolactone par exemple. Devant cette extrémité bloquée, la polymérase β introduit le premier nucléotide en 3' du site AP. Cette même polymérase, aidée du facteur PCNA, va introduire entre 6 et 8 nucléotides supplémentaires générant ainsi un chevauchement entre le brin néo-synthétisé et l'ancien brin contenant le dommage [405]. Toutefois, il a été démontré que cette synthèse additionnelle d'ADN impliquait généralement le remplacement de la pol β par les polymérases répliquatives δ/ϵ assistées par le complexe PCNA/RFC [406-408]. Le fragment surplombant le nouveau brin est excisé par une flap endonucléase, FEN1, qui restitue une extrémité 5'-phosphate [409, 410]. Finalement, la ligase I liée à XRCC1 réalise la ligation [411, 412]. En opposition à la voie courte, cette sous-voie est dénommée voie longue du BER (« long patch-BER », **LP-BER**) [413].

Le choix de l'une ou l'autre des voies du BER est encore mal compris. Toutefois, il semble que cela dépende de la glycosylase qui initie la réparation, de la nature des extrémités générées, de la concentration en ATP ou encore de la concentration des différents acteurs de la réparation, de la phase du cycle cellulaire, etc. [342, 414].

5.1.e. Réparation par incision de nucléotide

Au début des années 2000, une autre sous-voie du BER a été mise en évidence. Il s'agit de la réparation par incision de nucléotide (« nucléotide incision repair », **NIR**). Ce mécanisme s'affranchissant de l'activité N-glycosylasique, est capable de réparer principalement les lésions issues de pyrimidines oxydées (DHT, DHU, 5-OHU,...), mais également les α -désoxynucléotides formés sous l'action de rayonnements ionisants [415, 416]. Il fait intervenir directement l'AP-endonucléase qui incise le lien phosphodiester en 5' du nucléoside altéré comme elle le ferait sur un site abasique. L'extrémité 5' étant bloquée par la présence du dNMP, la suite de la réparation procède *via* le LP-BER [417].

5.1.f. Réparation des cassures simple brin

Les cassures simple brin sont des intermédiaires physiologiques dans le BER. Cependant, ce type de dommage peut être induit par des espèces réactives de l'oxygène, des produits chimiques ou des radiations générant toutes sortes de cassures simple brin. Ces dernières nécessitent donc une reconnaissance spécifique, indépendante de l'action de glycosylases. PARP1 (Poly(ADP-ribose) Polymérase 1) est responsable de la détection rapide de ce type de cassures [403, 418, 419]. D'autres membres de la superfamille des PARPs, dont PARP2, peuvent également contribuer à cette reconnaissance [420]. PARP1 est composé de 3 sous-domaines : le domaine N-terminal permet sa fixation spécifique au niveau des cassures de brin et contient 3 motifs doigt de zinc ; la partie C-terminale contient le site catalytique ; un troisième domaine central permet l'auto-modification de la protéine.

Une fois PARP1 fixé sur une cassure simple brin, un réarrangement structural de la protéine active le domaine catalytique induisant la poly(ADP-ribosylation) de PARP lui-même et d'autres protéines (notamment certaines histones). Cette polymérisation branchée utilise le cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) [421]. Le poly(ADP-ribose) (PAR), de plusieurs centaines d'unités, forme un échafaudage permettant le recrutement de nombreuses autres protéines impliquées dans la réparation (BER), le remodelage de la chromatine ou la régulation du cycle cellulaire. Notons le recrutement essentiel de XRCC1 qui permet à son tour l'assemblage du complexe de réparation (APE1, PNK, pol β , LigIII,...) [422, 423].

Finalement la réparation fait intervenir les protéines adéquates dans la restauration des extrémités avant leur ligation.

La fixation et l'activité de PARP1 sur les cassures de brin est transitoire car l'auto-modification de PARP induit sa dissociation rapide de l'ADN et le poly(ADP-ribose) est dégradé par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) qui restaure la structure originale de PARP et des autres protéines [424].

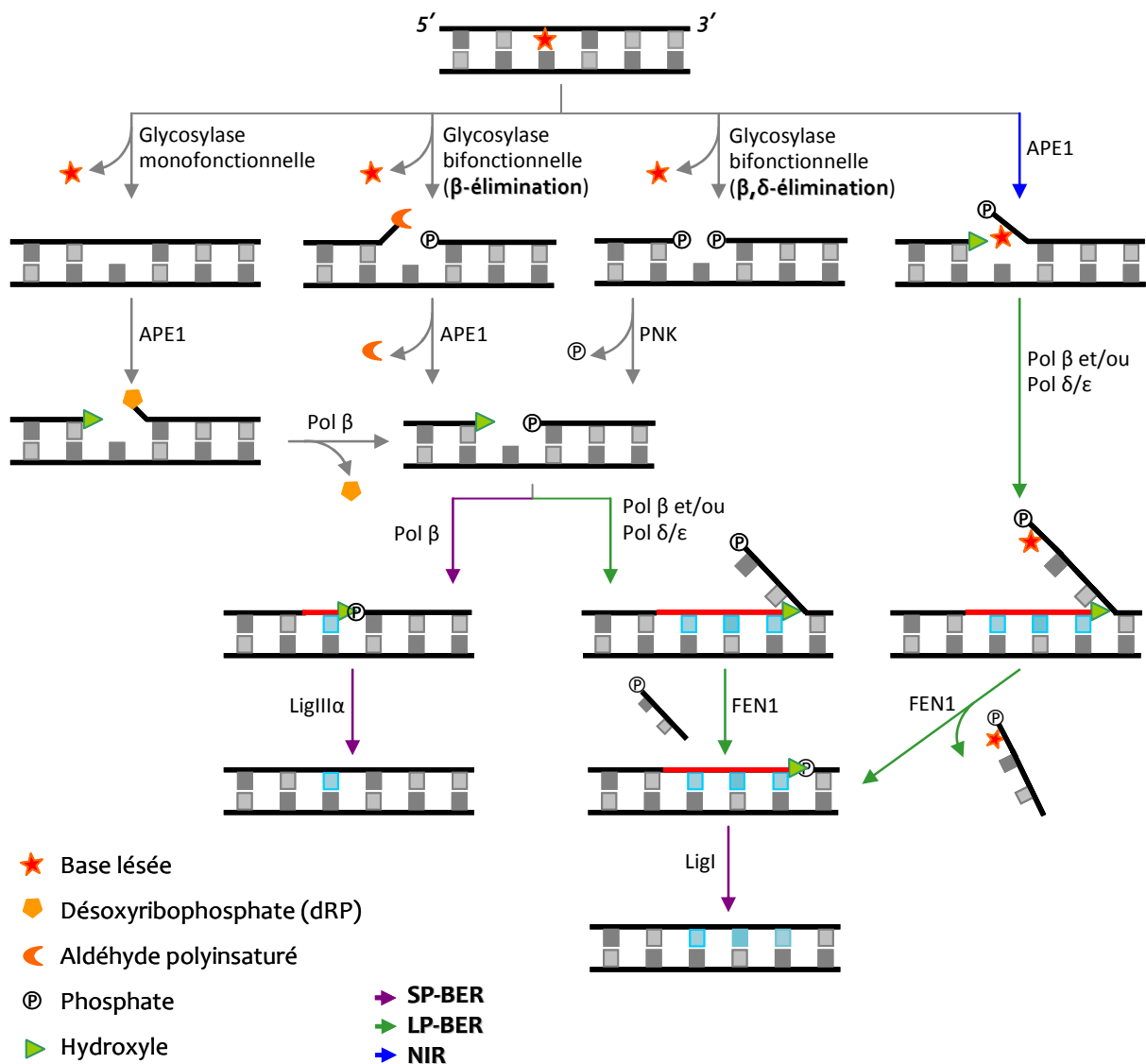


Figure 13: Mécanisme général de la voie de réparation par excision de base (BER) : SP-BER= « short patch » BER, LP-BER= « long patch » BER, NIR= « nucleotide incision repair ».

5.2. Réparation de l'uracile : des activités spécifiques et redondantes

La base uracile, normalement spécifique de l'ARN peut être présente dans l'ADN selon deux mécanismes :

- La désamination de la cytosine est une des sources prépondérantes de dommages dans l'ADN. Elle peut être spontanée, induite par les radiations ionisantes ou catalysée enzymatiquement et conduit donc à la formation de la paire de base U : G (cf. § I.2.1) [27, 425, 426]. L'uracile dans ce contexte possède une mutagénicité proche de 100 % si elle

n'est pas réparée avant la réplication. Il résulte une transition C → T, la plus fréquente mutation retrouvée dans l'ADN [427].

- Une autre source de présence d'uracile dans l'ADN est l'incorporation de dUMP, *via* le dérivé triphosphate, par la polymérase durant la réplication (mentionné dans le § 1.2.6) [428]. L'uracile n'est, dans ce cas, pas particulièrement mutagène, étant appariée à une adénine. Toutefois, la formation de sites abasiques, intermédiaires réactionnels lors de la réparation, s'avère être une source majeure de mutations [429].

La première uracile ADN N-glycosylase (UDG) a été découverte chez *E. Coli* par Lindahl T. alors qu'il recherchait des activités capables de réparer la base particulière à l'ARN dans l'ADN [340]. Des protéines homologues sont retrouvées chez la plupart des êtres vivants et chez certains virus [430]. Chez les mammifères, on recense aujourd'hui quatre ADN N-glycosylases spécifiques de la réparation de ce dommage. On peut ainsi citer les glycosylases prépondérantes que sont UNG (« uracil DNA N-glycosylase) et SMUG1 (« single strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1») et les enzymes spécifiques de certains mésappariements telles que TDG (« thymine/uracil mismatch DNA glycosylase ») et MBD4 (« methyl binding domain protein 4 ») (pour revue, voir [427]). Il s'avère que les gènes codant pour UNG, SMUG1 et TDG sont tous les trois localisés que le chromosome 12 et il semble donc qu'ils aient évolué par duplication et divergence à partir d'un même ancêtre commun [430]. Le gène MBD4 a été cartographié sur le chromosome 3 et n'est apparemment pas relié aux autres uracile ADN glycosylases [431]. Ces quatre glycosylases monofonctionnelles agissent en synergie sur la réparation de l'uracile en fonction de l'origine et de la localisation du dommage. De plus, ces catalyseurs biologiques ne sont pas strictement limités à la réparation de l'uracile.

UNG est la glycosylase la plus active dans la réparation de l'uracile. Deux isoformes, issues du même gène exprimé à partir de promoteurs différents, sont connues. UNG1 est spécialisé dans la réparation de l'ADN mitochondrial tandis qu'UNG2, flanqué d'un signal de localisation nucléaire (NLS), agit sur l'ADN génomique [432]. En outre, l'expression d'UNG2 est régulée au cours du cycle cellulaire et est maximale au cours de la phase S tandis qu'UNG1 est constitutivement exprimé [433, 434]. Il a aussi été montré qu'UNG2 interagit avec PCNA et d'autres facteurs de réplication. Le turnover de l'enzyme est considérablement plus élevé que toutes les autres glycosylases, notamment sur l'ADN simple brin où il peut atteindre 1000 excisions/minute. L'activité catalytique d'UNG2, comme la plupart des glycosylases monofonctionnelles, est stimulée par l'AP-endonucléase qui déplace l'enzyme de son produit (le site AP) pour lequel elle présente une très forte affinité [358, 435]. Notons que la présence d'ions magnésium, à concentration physiologique, permet

d'augmenter la préférence d'UNG2 pour l'uracile sur l'ADN simple brin [354]. Ensemble, ces observations traduisent le rôle privilégié d'UNG2 dans la réparation de l'uracile introduite par des erreurs de la polymérase au niveau des fourches de réplication [436]. Dans ce cas, l'ADN étant sous forme simple brin, la réparation est finalisée par des processus de recombinaison ou de synthèse translésionnelle [437]. Notons qu'UNG est aussi capable d'exciser des bases issues de l'oxydation de l'uracile telles que la 5-hydroxyuracile ou l'acide isodialurique et la 5-fluorouracile (5-FU) [353, 438, 439]. Cependant le site actif de l'enzyme n'est pas capable d'accepter des substrats avec de plus imposants substituants sur le C5 de la base tels que l'éthénocytosine (ϵ C) ou la 5-hydroxyméthyluracile (5-hmU). Ceci est certainement la caractéristique cruciale de l'enzyme qui lui permet de différencier l'uracile de la thymine.

A l'instar d'UNG2, SMUG1 est également une protéine nucléoplasmique mais ne s'accumule pas au niveau des foyers de réplication. Elle est exprimée indépendamment de la phase du cycle cellulaire. Ainsi, SMUG1 semble impliqué dans la réparation de l'uracile issue de la désamination de la cytosine. En dépit du nom donné à cette enzyme, celle-ci possède une plus grande activité sur l'ADN double brin (avec une préférence pour la paire de bases U : G) lorsque sa dissociation du site AP est stimulée par APE1 [358]. SMUG1 excise également la 5-hmU issue de l'oxydation de la thymine et l' ϵ C, avec toutefois une efficacité moindre [354, 356].

La TDG comme son nom l'indique a pour fonction première l'excision de la thymine (provenant de la désamination de la 5-MeC) mésappariées à une guanine. De cette fonction découle que son activité est principalement limitée à l'ADN double brin et présenterait un intérêt biologique supplémentaire au niveau des régions promotrices, riches en CpG, où la méthylation des cytosines rend ces dernières beaucoup plus sensibles à la désamination (cf. § 1.2.1 et 1.5.6). Différents substrats sont aussi acceptés par la TDG tels que l'uracile ou des dérivés impliquant la substitution du C5 de la base, toujours en appariement avec une guanine (5-FU, 5-BrU, 5-hmU, 5-OHU). Cette enzyme catalyse l'excision du glycol de thymine, de l'éthénocytosine, et plus étonnamment, d'une purine telle que l'hypoxanthine [361]. La pertinence biologique de ces activités reste cependant à démontrer [440].

Bien que structurellement et génétiquement sans lien de parenté, MBD4 possède des propriétés enzymatiques similaires à TDG. Sa capacité à interagir spécifiquement avec l'ADN des îlots CpG *via* son extrémité N-terminale (« methyl binding domain », MBD) impliquerait cette protéine dans la réparation des mésappariements U : G et T : G. TDG et MBD4 sont également des candidats potentiels dans le processus de déméthylation actif de l'ADN (détaillé dans le § 1.5.6).

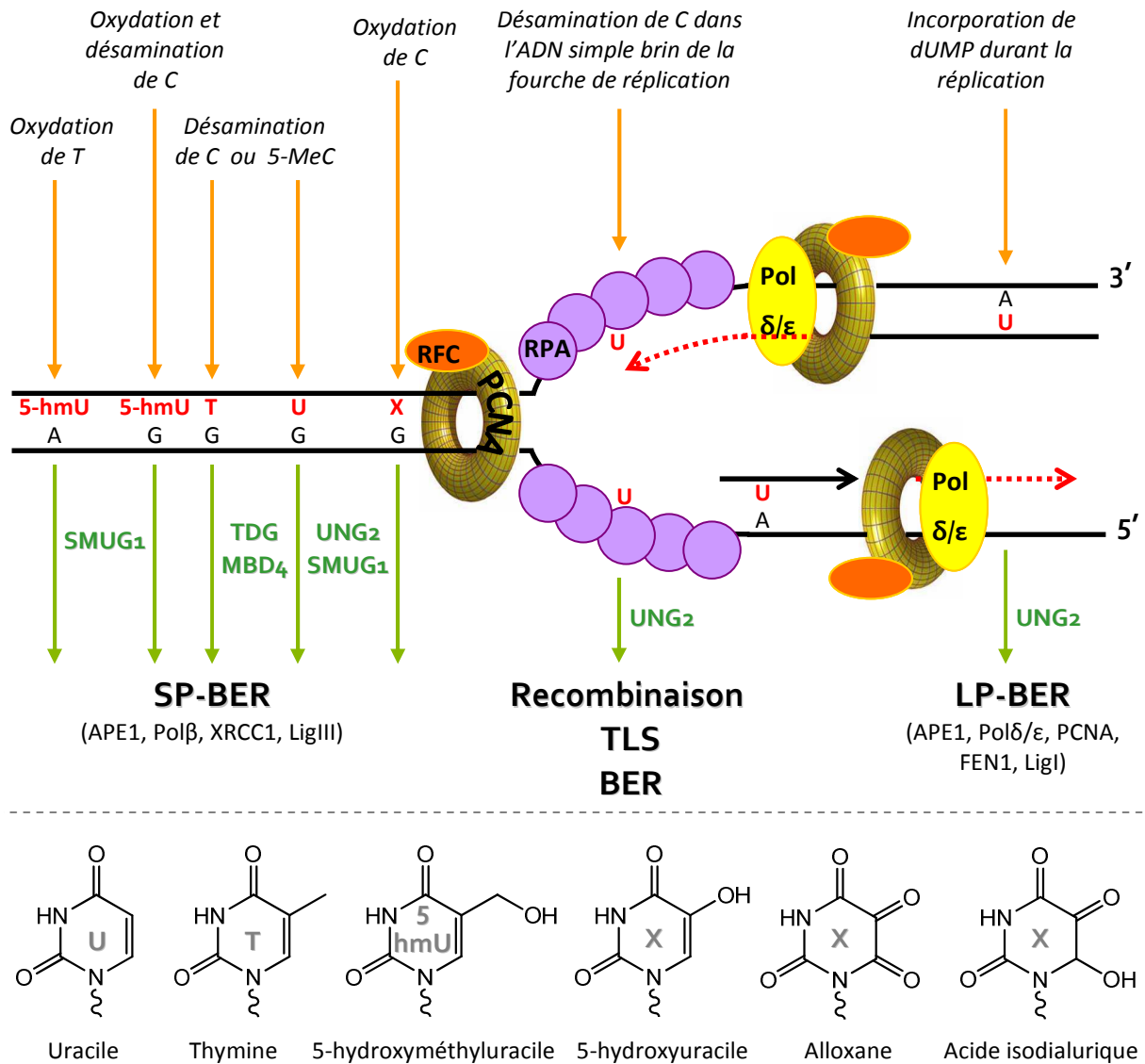


Figure 14: Modèle unifié de formation et de réparation de l'uracile et d'analogues dans l'ADN (adapté de (353)).

La pluralité des activités uracile ADN glycosylases, caractérisée par la spécificité de chaque enzyme associée à une certaine redondance, garantit la sauvegarde de l'intégrité de la biomolécule. UNG possède un domaine de reconnaissance très spécifique de l'uracile et agit sur l'ensemble de l'ADN, à la fois simple et double brin, pour extraire cette base mutagène du génome. La glycosylase s'accumule notamment durant la phase S au niveau des foyers de réplication et permet d'accroître la fidélité de la synthèse. SMUG1 constitue un système complémentaire parcourant sans spécificité reconnue l'ensemble de l'ADN nucléaire. TDG et MBD4 ont un domaine de reconnaissance moins spécifique et agissent essentiellement sur la double hélice d'ADN, en tenant compte de la base opposée. Ces glycosylases préservent l'intégrité des sites promoteurs, particulièrement sensibles à la désamination favorisant l'instabilité génétique. La Figure 14 schématise le mécanisme global de réparation de la lésion uracile et de certains analogues.

5.3. Réparation de la 8-oxoguanine : un arsenal protéique anti-mutation

Parmi les 4 bases de l'ADN, la guanine est celle qui possède le potentiel d'oxydation le plus bas. Par conséquent celle-ci est plus sensible aux réactions d'oxydation (cf. § 1.2.2). Bien qu'une quinzaine de produits d'oxydation ait été identifiée, la 8-oxoguanine et son produit d'ouverture, la FAPyG sont très majoritairement représentés, même à l'état basal de la cellule [441]. Du fait de l'abondance de cette lésion (quelques bases modifiées pour 10^6 nucléotides), le taux de 8-oxoG est un indicateur fiable de l'état oxydatif de la cellule, faisant de cette lésion un candidat potentiel en tant que biomarqueur de pathologies où la balance oxydo-réductrice des cellules est déséquilibrée telles que dans certains cancers, maladies neurodégénératives ou professionnelles [442]. Cette lésion est très bien contournée par les polymérase répliquatives et ses propriétés codantes particulières la rendent particulièrement mutagène [189]. En effet, la répulsion entre le groupement « oxo » et l'oxygène intracyclique du désoxyribose implique que la base se retrouve principalement en conformation syn. Dans cette conformation, la 8-oxoG s'apparie préférentiellement avec une adénine par des liaisons H de type Hoogsteen [443]. Ceci conduira lors du cycle de réplication à des transversions G → T [37, 444].

Ainsi, des bactéries aux mammifères, un arsenal de protéines est à la disposition des cellules pour contrer les effets délétères de la 8-oxoG. Chez *E. Coli*, trois protéines agissent en coopération dans un système de réparation de la 8-oxoG, nommé « GO » [445].

MutM, aussi nommé Fpg pour « formamido-pyrimidine DNA-glycosylase », est une glycosylase à activité β,δ -lyase dont le substrat principal est la 8-oxoG appariée à une cytosine (446). Cette enzyme appartenant à la superfamille des glycosylases « hélice-deux-tours-hélice » (« helix-two-turn-helix », H2TH) possède un motif doigt de zinc caractéristique, indispensable à la fixation de la protéine sur l'ADN [446, 447]. De nombreuses études ont montré la très large spécificité de substrat de Fpg, capable de retirer des purines oxydées mais également des pyrimidines oxydées et les sites abasiques [370, 448].

MutY, glycosylase monofonctionnelle, est responsable de l'excision de l'adénine introduite en face d'une 8-oxoG (ou 8-oxoA) durant la réplication. Cette enzyme élimine donc l'effet promutagène de la 8-oxoG dans les cellules répliquatives [449].

MutT est chargé d'éliminer la 8-oxoG du pool de nucléotides triphosphate. Cette hydrolase catalyse le clivage de la liaison phosphoanhydride afin de désactiver le dNTP et empêcher son incorporation dans l'ADN par les polymérase [450].

La définition de ce système GO vient de l'effet mutateur d'une inactivation d'un ou de plusieurs des gènes codant pour ces protéines, se traduisant par une augmentation des transversions

G → T. Chez l'Homme, on retrouve trois protéines présentant les mêmes activités que les enzymes Mut (Figure 15):

hOGG1 (« human oxoguanine glycosylase 1 ») est une glycosylase bifonctionnelle avec une activité β -lyase qui possède des activités enzymatiques similaires à celles de Fpg, toutefois avec une spécificité de substrats plus restreinte. Bien qu'OGG1 puisse être considéré comme l'homologue fonctionnel de la protéine bactérienne Fpg, ces deux enzymes ne partagent aucune homologie de séquence significative. OGG1 appartient à la superfamille des glycosylases « hélice-épingle-hélice » (« helix-hairpin-helix », HhH). Ce motif, commun avec d'autres glycosylases telles que MBD4, NTH1 ou MYH, permet la liaison de la glycosylase à l'ADN de façon séquence non-spécifique [451, 452]. L'interaction permet à la glycosylase de glisser le long de l'ADN, résultant en une reconnaissance rapide des paires de bases 8-oxoG : C. La reconnaissance de la lésion implique le contact du groupement carbonyle du résidu Gly42 de la protéine avec le proton en position N7 de la 8-oxoG. La déstabilisation du duplexe conduit à l'extrusion du nucléoside vers une poche hydrophobe de la protéine. Cette dernière, afin d'éviter l'excision post-répllicative de la 8-oxoG appariée à une adénine, dispose d'une seconde poche capable de reconnaître la base complémentaire, en l'occurrence un C. Cette condition est primordiale pour l'excision de la 8-oxoG, comme de la FAPyG [453]. Notons que l'excision est catalysée par la Lys249, activée par le résidu Asp268 [454, 455]. Bien qu'OGG1 possède une activité AP-lyase *in vitro*, il a été montré que celle-ci est occasionnelle *in vivo*. En effet, APE1 serait majoritairement impliqué dans l'incision du squelette de l'ADN, favorisant ainsi le recyclage rapide d'OGG1 qui agirait donc comme une glycosylase monofonctionnelle [456-458].

Finalement, mentionnons que hOGG1 présente plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif de l'ARNm. Les deux isoformes majoritairement retrouvées chez l'Homme sont OGG1-1a et OGG1-2a. Ces deux variants possèdent un signal de localisation mitochondrial tandis que seul OGG1-1a possède un signal de translocation nucléaire qui annule le signal MTS [459, 460]. Ainsi OGG1-1a est localisé essentiellement dans le noyau tandis qu'OGG1-2a est spécialisé dans la réparation de l'ADN mitochondrial, surexposé aux espèces réactives de l'oxygène issues de la respiration cellulaire.

Deux gènes orthologues aux gènes bactériens *mutY* et *mutT* ont été identifiés chez les mammifères. Ces gènes codent pour les protéines MYH (ou MUTYH) et MTH1 respectivement.

MYH excise les bases adénines introduites par erreur en face de 8-oxopurines lors de la réplication [461]. Au même titre que son homologue bactérien, cette enzyme est indispensable à la lutte contre la mutagenicité de la 8-oxoG. De façon complémentaire à OGG1, MYH dispose d'un domaine C-term qui lui permet de différencier la 8-oxoG opposée au A afin d'éviter l'excision d'adénines correctement appariées [462, 463]. Afin que la réparation initiée par MYH permette de restaurer la paire 8-oxoG : C, substrat pour OGG1, la polymérase β introduit préférentiellement un C

lors de l'étape de resynthèse, évitant ainsi, des cycles futiles de réparation [464]. Comme UNG2, MYH interagit avec PCNA en vertu de son rôle dans le retrait de nucléotides incorporés par erreur durant la réplication.

A l'instar de MutT, MTH1 (mentionné dans l'introduction du chapitre 5) s'emploie à hydrolyser les nucléotides triphosphate oxydés dont le 8-oxodGTP mais également le 2-OHdATP ou le 8-oxodATP [465].

En conclusion, le système GO garantit le maintien de l'intégrité génomique en contrecarrant les effets mutagènes de la 8-oxoguanine à plusieurs niveaux : Fpg/OGG1 permettent d'exciser la 8-oxoG dans l'ADN avant que cette lésion ne soit répliquée ; MutY/MYH excisent l'adénine introduite justement suite à la réplication d'ADN contenant la base oxydée ; enfin, MutT/MTH1 empêchent l'incorporation fortuite de 8-oxodGTP par les polymérases en hydrolysant le nucléotide triphosphate.

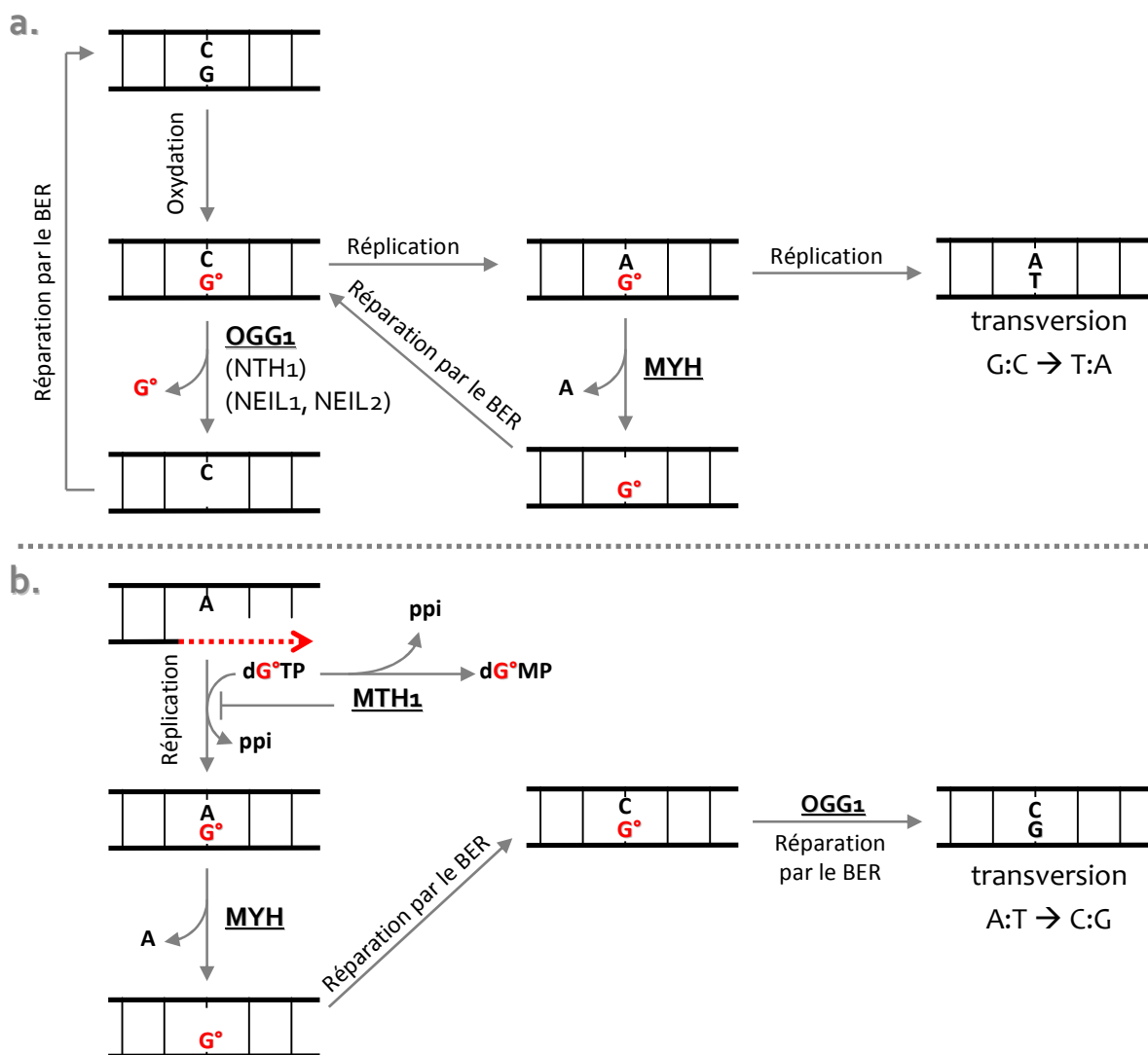


Figure 15: Système « GO » chez les mammifères : différents mécanismes de réparation contre les effets délétères de la 8-oxoguanine. La réparation fait intervenir différentes enzymes selon a) que la 8-oxoG provienne de l'oxydation d'une guanine appariée à une cytosine, ou b) qu'un 8-oxoGTP soit introduit en face d'une adénine lors de la réplication.

5.4. Réparation des purines alkylées et de l'hypoxanthine : une glycosylase unique à spectre large

Chez les mammifères, une glycosylase particulière a été identifiée, capable d'exciser diverses purines altérées telles que la 3-MeA, la 3-MeG, l' ϵ A issue de la peroxydation lipidique ou du chlorure de vinyle et l'hypoxanthine (Hx), produit de la désamination de l'adénine (cf. § 1.2.1 et 1.2.3 et [380, 466]). Ainsi, l'AAG (alkyl adénine glycosylase, aussi nommée MPG pour méthylpurine glycosylase) est une protéine nucléaire possédant une structure tridimensionnelle qui lui est propre, sans lien avec les autres glycosylases des superfamilles UDG, HhH, ou HT2H énoncées précédemment (cf. § 1.5.2 et 1.5.3) [467]. Toutefois, certaines caractéristiques communes peuvent être énoncées : l'AAG est composé comme UNG, SMUG1 ou OGG1, d'une association de feuillets β et d'hélices α . La recherche des lésions se fait *via* l'interrogation des paires de bases par l'introduction d'un résidu tyrosinyle au sein de la double hélice et le coulissement de la protéine le long de l'ADN [345, 467]. La reconnaissance engage un mécanisme d'extrusion du nucléotide vers une poche catalytique tapissée de résidus hydrophobes.

De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires de cette glycosylase qui possède une spécificité de substrats étendue sans pour autant exciser les bases normales [380, 466, 468]. La première conclusion est que le site actif exclut le groupement amino exocyclique de l'adénine par la présence d'un résidu histidine. Ainsi, l'hypoxanthine et l'éthénoadénine sont stabilisées à l'intérieur de la poche catalytique par une liaison hydrogène entre le groupement oxo ou imino et un résidu histidine de la protéine (His136). Cette liaison permet également de déstabiliser la liaison N-glycosidique, favorisant son hydrolyse. Aussi, la chaîne latérale d'une asparagine encombre stériquement l'espace autour du C2 des purines expliquant pourquoi la guanine et les éthénoguanines sont faiblement excisées par l'enzyme [468]. De façon intéressante, la mutation Asp129Ser augmente le taux d'excisions injustifiées de la guanine, ce qui confirme cette hypothèse [469]. Néanmoins, ceci n'explique pas l'excision préférentielle des méthylpurines par rapport à l'adénine ou la guanine. Il est supposé que l'interaction défavorable de ces lésions avec l'AAG soit compensée par leur réactivité augmentée de part la présence d'une charge positive portée par la base. Une discrimination additionnelle est dictée par la stabilité des liaisons Watson-Crick, dont la faiblesse dans le cas de bases lésées facilite l'extrusion du nucléotide [380].

Comme énoncé précédemment, l'AAG est inhibée par son propre produit pour lequel elle est très affine. La partie N-term de la protéine, pourtant non-essentielle à son activité catalytique, joue un rôle important dans sa dissociation du site AP. Néanmoins, la présence d'APE1 permet d'exacerber le turnover de l'enzyme en se fixant sur le site AP [470].

L'induction de *mpg* par un stress alkylant (traitement avec MMS, MNNG, Melex,...) fait débat, et plusieurs études contradictoires ont montré une corrélation/indépendance entre l'expression du gène *mpg* et la concentration en agent alkylant dans les cellules [471, 472]. Toutefois, la surproduction de MPG n'a pas d'effet protecteur sur les cellules et semble plutôt augmenter leur sensibilité vis-à-vis d'agents méthylants (cf. § 1.5.8). Cet effet est attribué à la formation accrue de sites abasiques et de cassures simple brin au cours de la réparation initiée par MPG. Ces intermédiaires formés en masse accroissent la cytotoxicité par rapport aux lésions initialement formées [473, 474]. De façon non réciproque, une déficience en Aag dans des cellules de souris traitées par un agent alkylant a un effet protecteur ou sensibilisateur dépendant du type cellulaire et de l'agent chimique utilisé [475, 476]. Ainsi, l'expression finement régulée de MPG est capitale pour éviter les effets néfastes des purines alkylées sans pour autant générer d'autres lésions toxiques. Aussi, il a été établi que l'expression de *mpg*, corrélée à l'activité de la glycosylase est régulée au cours du cycle cellulaire et est maximale au cours de la phase S avant d'être inhibée après la mitose [477]. Cette progression permettrait de limiter les mutations générées par la réparation des bases normales, qualifiée de gratuite (« gratuitous repair ») [478].

5.5. L'AP-endonucléase 1

La première activité endonucléase spécifique des sites abasiques a été découverte chez *E. Coli* avec la protéine multifonctionnelle XthA (ou exonucléase III, ExoIII) [479]. Chez les mammifères, l'homologue structural et fonctionnel de XthA a été indépendamment purifié par plusieurs laboratoires en vertu de ses rôles biologiques très divers (détaillés plus loin) [480-483]. APE1 (nommé aussi Ref1, HAP1 ou APEX) est une protéine ubiquitaire monomérique de 35.5 kDa dont le caractère vital est attribué à son rôle dans la réparation de l'ADN, plus précisément dans l'incision des sites abasiques et la génération d'extrémités 3'-OH [484, 485]. D'autres activités hydrolytiques plus faibles lui sont connues, telles que les activités 3'-phosphatase ou 3'-phosphodiesterase [398, 486, 487]. Egalement, APE1 expose une faible activité 3' → 5' exonucléase, notamment dirigée contre les mésappariements [482]. Les substrats d'APE1 possèdent la caractéristique commune d'accentuer la déformabilité de la double hélice, entre autre par la perte des liaisons Watson-Crick et de l'interaction d'empilement (π stacking) du fait de l'absence de la base. APE1 est capable de se lier de façon non spécifique dans le petit sillon de l'ADN, *via* l'insertion d'une boucle peptidique, et de parcourir rapidement la biomolécule à la recherche des sites AP. La flexibilité de l'ADN au niveau d'un site abasique induit une distorsion structurale importante imposée par APE1 qui promeut l'extrusion du 2-désoxyribose dans une poche hydrophobe de l'enzyme, excluant les nucléotides

normaux [488]. L'activité catalytique d'APE1 conduit à la formation d'extrémités 3'-OH et 5'-désoxyribophosphate : l'hydrolyse spécifique de la liaison P-O3' en 5' du site AP a lieu *via* l'activation d'une molécule d'eau par le couple Asp210/His309. Un cation divalent (Mg^{2+}) présent dans le site actif dicte le clivage de la liaison P-O3', en coordonnant l'oxygène correspondant [488, 489].

En plus de son rôle catalytique, APE1 est une protéine centrale dans la régulation du BER. D'une part elle stimule la plupart des ADN glycosylases en induisant leur dissociation du site AP néoformé, comme nous l'avons précédemment énoncé pour TDG, UDG, OGG1 ou MPG [435, 458, 470, 490, 491]. D'autre part l'AP-endonucléase est elle-même inhibée par le produit d'incision du site AP sur lequel elle reste fixée. Son interaction avec Pol β , probablement transitoire *via* le complexe XRCC1/LigIII ainsi que la présence d'ions Mg^{2+} , permettent le recyclage de l'enzyme [388, 404, 492]. Cette régulation médiée par des interactions protéine/protéine ou protéine/ADN permet d'assurer que les intermédiaires cytotoxiques du BER ne sont pas exposés dans les cellules [493].

La transcription d'*ape1* est étroitement coordonnée au cycle cellulaire. Le niveau d'ARNm augmente durant la phase G1 et la phase S avant de chuter après la réplication [494]. Aussi, plusieurs études ont montré l'inductibilité d'APE1 suite à un stress oxydatif [495-497]. Bien que le mécanisme moléculaire d'activation transcriptionnel d'APE1 soit encore obscur, celui-ci semble prendre part à une réponse adaptative à différentes agressions induisant une augmentation de la réparation des lésions générées par les EROs [496]. De plus, APE1 serait la seule protéine de réparation humaine à pouvoir inhiber la transcription de son propre gène, constituant une boucle de rétroaction négative [498, 499].

Le génome des mammifères encode un second gène codant pour un autre homologue de XthA, simplement nommé APE2, possédant une bonne activité 3' → 5' exonucléasique. Cependant, l'activité AP-endonucléase de cette protéine est faible et son rôle biologique reste mal connu [500]. Toutefois, de récentes études tendent à démontrer que l'activité exonucléase d'APE2, exacerbée par la présence de PCNA, permettrait d'augmenter la fidélité de la réplication d'ADN endommagé [501, 502].

5.6. *Le BER, au-delà de la réparation de l'ADN*

5.6.a. *APE1 et son rôle dans la signalisation redox*

Hors-mis la place prépondérante occupée par APE1 dans la réparation par excision de base, cette protéine est également impliquée dans l'activation de facteurs de transcription. En effet, bien que la partie N-terminale d'APE1 soit dispensable à son activité endonucléasique, elle renferme une activité oxydo-réductrice qui permet la réactivation de différentes protéines de liaison à l'ADN [503, 504]. Ainsi, il a été montré qu'APE1 réduit divers facteurs de transcription tels que NFκB, AP-1 (Fos/Jun) ou encore p53 [483, 505-507]. Par conséquent, APE1 fournit un mécanisme de régulation de l'expression de gènes cibles en maintenant certaines cystéines de ces facteurs à l'état réduit. Nombre de ces facteurs sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

Bien que les activités AP-endonucléase et oxydo-réductrice d'APE1 soient indépendantes (l'inhibition d'une fonction ne modifie pas la seconde), leurs rôles semblent toutefois être étroitement liés et la molécule serait centrale dans l'intégration des stimuli (stress oxydatif, hypoxie, irradiation UV,...), permettant de guider la réaction de la cellule tout en préservant l'information génétique [504].

5.6.b. *Rôle dans l'immunité innée*

Lors de l'infection de certains rétrovirus, une cytidine désaminase est activée et interfère avec la transcription inverse en désaminant de multiples cytosines de l'ADN nouvellement synthétisé. Cette enzyme, APOBEC-3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) induit donc une hypermutabilité du génome viral menant finalement à la formation de virions non viables [508, 509]. Cette activité antivirale médiée par APOBEC-3G est couplée à l'action conjointe d'UNG2 et APE1 qui introduisent des cassures dans l'ADN viral, accentuant la dégradation des provirus [510]. Notons que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est doté d'une protéine accessoire du VIH, Vrp1, capable de se lier à UNG2 et SMUG1, dirigeant leur dégradation par le protéasome et contrant les effets néfastes pour le virus [511].

5.6.c. *Rôle dans l'immunité acquise*

La réponse adaptative du système immunitaire implique essentiellement la création/production d'immunoglobulines (dont les anticorps) capables de reconnaître et de lier

spécifiquement des millions d'antigènes. La diversification des anticorps fait intervenir différents mécanismes biochimiques qui permettent de moduler la spécificité et l'isotype des immunoglobulines (Ig) à différents stades du développement des lymphocytes : la **recombinaison V(D)J**, la **commutation isotypique** (CSR) et l'**hypermutation somatique** (SHM) (cf. Figure 16). Les deux derniers processus font intervenir les protéines du BER UNG2 et APE1.

La recombinaison **V(D)J** intervient tôt dans le développement des lymphocytes B (dans la moelle épinière), permettant de générer une banque de lymphocytes produisant des immunoglobulines M (IgM) fonctionnelles. Ce mécanisme fait intervenir le système de réparation des cassures double brin NHEJ, qui, en association avec un complexe de clivage de l'ADN séquence spécifique permet la recombinaison de différents fragments (V, D et J) codant pour les différentes portions des immunoglobulines. Ce processus génère donc de multiples produits de fusion de ces fragments qui constituent le premier degré de diversification des anticorps, précédant leur rencontre avec un antigène (cf. § 1.4.5 et [326, 512]).

Suite à l'activation d'un LB par un antigène dans la lymphe, un second processus permet le changement d'isotype de l'IgM produit par la modification de sa région constante, sans altérer la région variable responsable de la reconnaissance de l'antigène. Les lymphocytes peuvent alors produire des IgG, IgE et IgA qui sont distribuées systémiquement dans les tissus. Cette « commutation isotypique (« class switch recombination », **CSR**) résulte de l'excision d'exons codant pour la région constante de l'IgM ($C\mu$) et de la juxtaposition de la région variable (segments VDJ) avec une autre région constante ($C\gamma$, $C\alpha$ ou $C\epsilon$ générant respectivement IgG, IgA et IgE) [426, 513, 514]. Ce mécanisme nécessite donc la création de cassures double brin dans les régions spécifiques afin d'éliminer le fragment $C\mu$. Ce processus requiert l'action conjointe de la protéine AID (« activation induced (cytidine) deaminase »), d'UNG2 et d'APE1. AID est responsable de la désamination de cytosines, dès lors substrats pour UNG2. Les sites abasiques néo-formés sont clivés par APE1 générant, de part leur proximité, des cassures double brin. La résolution des CDBs est finalement conduite par le NHEJ qui mène à l'élimination d'un fragment chromosomique cyclique caractéristique contenant la partie $C\mu$. Un mécanisme alternatif indépendant d'UNG2 fait intervenir le MMR, *via* la reconnaissance de la paire de bases U : G par le complexe MSH2/MSH6 [426, 515]. Cependant, plusieurs études ont montré que l'inactivation d'UNG2 affecte profondément le processus CSR conduisant en une surproduction d'IgM et un déficit en d'autres immunoglobulines à l'origine du syndrome d'hyper IgM (HIGM) (cf. § 1.5.7) et [516-518]. D'autres causes de HIGM sont connues comme par exemple une mutation du gène codant pour l'AID. Aussi l'induction du CSR est médiée par l'interaction entre lymphocytes B et lymphocytes T et la modification d'une des protéines de surface responsables de cette interaction (CD40LG et CD40 respectivement) engendre ce syndrome [519].

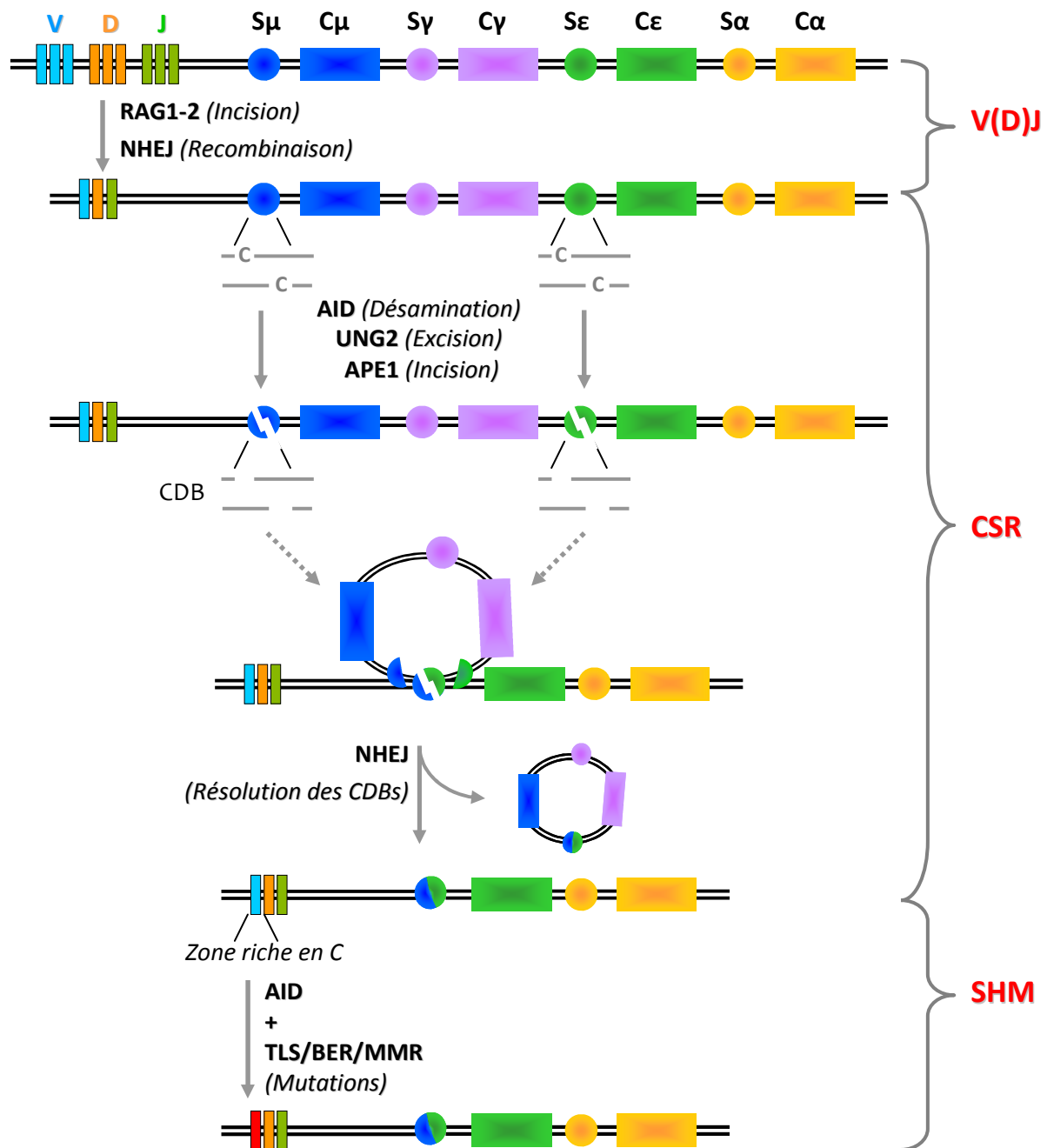


Figure 16: Schéma simplifié des mécanismes de diversification des anticorps dans l'immunité adaptative. La recombinaison **V(D)J**, ayant lieu dans la moelle épinière dans la vie précoce des lymphocytes B, permet la création d'une banque de lymphocytes B produisant différentes immunoglobulines M. Ce premier niveau de diversité est médié par l'assemblage aléatoire des différents gènes V, D et J par l'action conjointe de RAG1-2 et les protéines impliquées dans le NHEJ. La commutation isotypique (**CSR**) se produit dans les ganglions lymphatiques suite à l'activation des LB, ne produisant jusqu'alors que des IgM et IgD. Ce processus permet le changement d'isotype de l'Ig par l'élimination du gène codant pour la région constante des IgM (C μ) et la juxtaposition d'une autre région constante (C γ , C ϵ ou C α) à la région variable. Le CSR est initié par l'action coopérative d'AID, UNG2 et APE1 qui génèrent des cassures doubles brins (CDBs) dans les portions S (« switch »). La résolution des CDBs par le NHEJ résulte en la délétion du fragment d'ADN intermédiaire sous forme d'un cercle extra-chromosomique et la jonction des portions S. L'activation du LB par un antigène induit une hypermutation somatique (**SHM**) qui permet la production d'anticorps ayant une affinité améliorée pour l'antigène donné. Le mécanisme mutationnel fait également intervenir les protéines AID, UNG2 et APE1, couplées à une réparation ou réplication incorrecte qui génèrent de nombreuses mutations dans la région variable.

Un second évènement, pouvant survenir en même temps que le CSR, implique une hypermutation somatique (« somatic hypermutation », **SHM**) dans les régions variables (exons V) du gène des immunoglobulines [520, 521]. Ce processus génère des anticorps possédant une meilleure affinité pour leur antigène, de façon probabiliste. Le SHM est également initié par la désamination de nombreuses cytosines en uraciles par AID. Plusieurs mécanismes mutationnels peuvent alors intervenir : **1)** la réplication à travers le mésappariement U : G ; **2)** l'excision de U par UNG2 et la réplication des sites AP formés ; **3)** une réparation erronée de l'uracile par le BER, mais également par le MMR [522, 523]. Un dérèglement du SHM peut être associé au syndrome d'hyper IgM [519, 524].

5.6.d. Rôle dans la régulation épigénétique

Parmi les quelque 30 000 gènes composant les chromosomes humains, seule une minorité est exprimée (traduit en ARNm), ceci dépendant du stade développemental, du type cellulaire, de stimuli extérieurs, etc. Par conséquent, la cellule dispose de mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes, impliquant la méthylation de cytosines en 5-méthylcytosines, très majoritairement au niveau des dinucléotides dCpdG (îlots CpG) [525, 526]. La distribution de la méthylation de l'ADN compose un « patron » de méthylation agissant comme un programme de l'expression des gènes dans chaque cellule. Dans la quasi-totalité des cas, la méthylation des régions régulatrices d'un gène réduit ce dernier au silence (« gene silencing »), en empêchant ou favorisant l'interaction de la région modifiée avec des protéines activatrices ou inhibitrices respectivement [527]. De plus, la méthylation de l'ADN est engagée dans d'autres processus. Citons comme exemples la différenciation cellulaire, l'inactivation du second chromosome X ou le développement du système immunitaire [528].

Les mécanismes de méthylation de l'ADN sont aujourd'hui bien connus et font intervenir l'action d'ADN méthyltransférases (DNMTs), principalement la DNMT1 [529]. Toutefois, le processus inverse de déméthylation de l'ADN reste à élucider. En principe, la déméthylation peut avoir lieu par un mécanisme passif ou actif [530]. La déméthylation passive survient lors de la réplication, durant laquelle la répression de la méthylation des sites CpG limite la méthylation de l'ADN nouvellement synthétisé. La déméthylation active inclut les mécanismes capables de remplacer enzymatiquement la 5-meC en C. Aucun acteur de déméthylation directe de la 5-MeC n'a été décrit chez les vertébrés. Différentes études indépendantes sont en accord avec un mécanisme de déméthylation indirecte faisant intervenir le système BER. TDG et MBD4 montrent une faible activité d'excision de la 5-MeC. Ainsi, la conversion de la 5-MeC en substrat(s) de choix pour une glycosylase semble être une piste

dans l'élucidation du mécanisme de déméthylation de l'ADN : la désamination de la 5-MeC médiée par une désaminase (AID) conduit à l'apparition du mésappariement T : G qui est substrat pour TDG et MBD4 [356, 361]. Effectivement, AID a été associé à la déméthylation ayant lieu dans les cellules germinales [531, 532]. Cependant, l'augmentation prévisible des transitions C → T dans les cellules déficientes en MBD4 et/ou TDG n'a pas été observée, suggérant qu'un mécanisme alternatif jouerait un rôle significatif dans la déméthylation de l'ADN [523, 533].

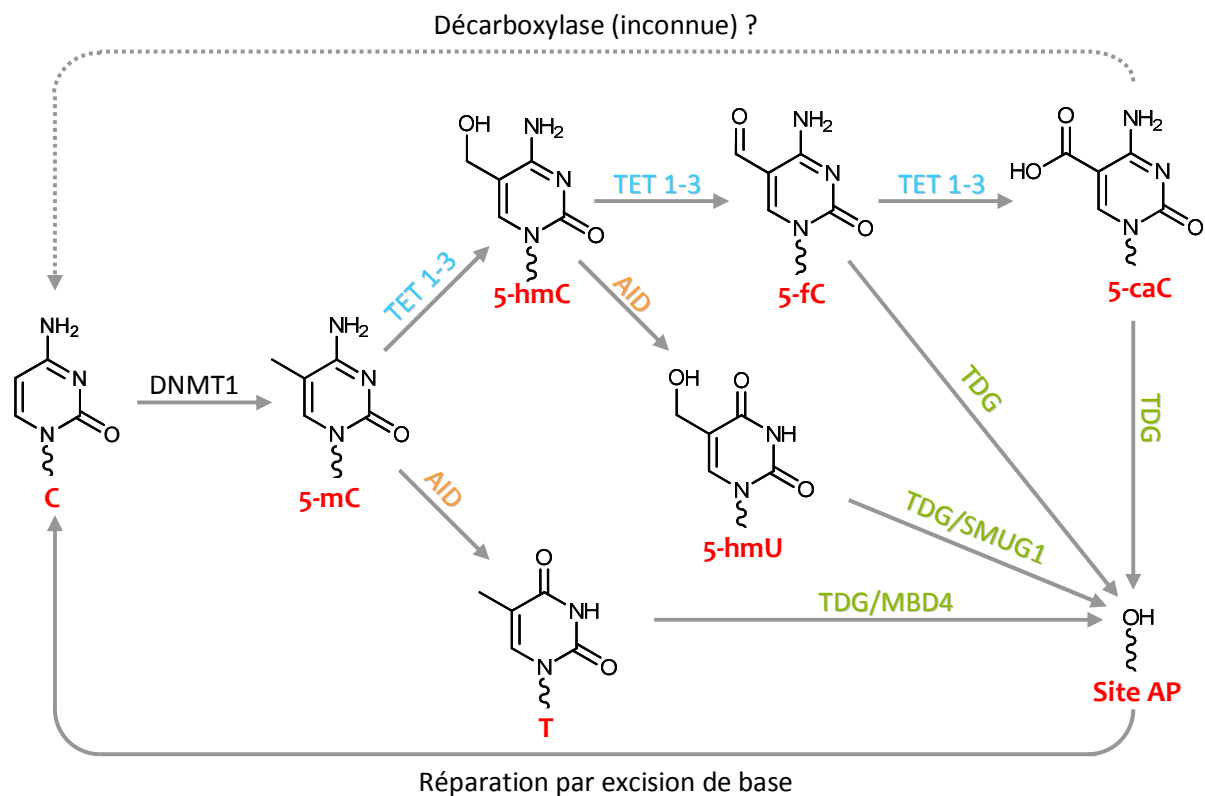


Figure 17: Différents mécanismes de déméthylation active de l'ADN. La méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG est réalisée par l'ADN méthyltransférase DNMT1 formant la 5-méthylcytosine (5-mC). Aucune glycosylase capable d'exciser cette base n'est à ce jour connue chez l'Homme. La théorie émergente sur le mécanisme de déméthylation active de l'ADN consiste en la modification de la 5-mC en un bon substrat pour les glycosylases spécifiques des pyrimidines. Ainsi, ce processus ferait intervenir les protéines AID et TET, capables de désaminer et d'oxyder la 5-mC, respectivement formant la 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), la thymine (T), la 5-hydroxyméthyluracile (5-hmU), la 5-formyl cytosine (5-fC) et/ou la 5-carboxylcytosine (5-caC). Plusieurs de ces intermédiaires sont de bons substrats pour TDG, MBD4 ou SMUG1. Un mécanisme de décarboxylation enzymatique de la 5-caC a également été proposé (537).

Le découverte récente d'une nouvelle famille de protéines (les Ten-Eleven Translocation 1-3, TET-1-3) capable d'oxyder spécifiquement la 5-meC en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) a donné une nouvelle trajectoire aux études sur la déméthylation active de l'ADN [534, 535]. TET 1-3 ne génèrent pas seulement la 5-hmC mais sont également capables de suroxyder cet intermédiaire en 5-formylC (5-fC) et 5-carboxylC (5-caC) [536]. Bien que la 5-hmC ne soit pas substrat pour aucune glycosylase caractérisée chez l'homme jusqu'alors, il se trouve que la 5-fC et la 5-caC sont de bons substrats pour TDG [537, 538]. Un mécanisme alternatif impliquerait la désamination de la 5-hmC en 5-hmU, également excisée par TDG et SMUG [539]. La létalité embryonnaire observée chez des souris *tdg*^{-/-} appuie l'hypothèse de la déméthylation active initiée par TDG [533, 540]. Néanmoins, la régulation de la méthylation chez les vertébrés semble impliquer plusieurs mécanismes dont la contribution à ce processus reste à clarifier (cf. Figure 17).

5.7. Maladies associées à des déficiences du BER

La réparation par excision de base est une voie métabolique absolument requise pour le développement d'un individu et sa survie. Pour preuve, l'inactivation d'APE1, XRCC1, LigIII ou FEN1 chez la souris n'est pas viable et conduit à une létalité embryonnaire précoce [541, 542]. En outre, plusieurs pathologies, dont certains cancers, ont pu être associées de façon causative à une déficience du BER.

Nous avons énoncé précédemment le rôle d'UNG dans les processus de CSR et de SHM. Or, une inactivation de l'enzyme a été clairement associée au syndrome héréditaire d'hyper IgM de type V (**HIGM5**) [517, 543]. Les patients atteints de HIGM sont incapables de produire des IgG, IgA ou IgE à partir des IgM du fait de la défaillance du mécanisme CSR. Ces patients présentent une prédisposition accrue aux infections, notamment des voies respiratoires, dès le plus jeune âge. Génétiquement, la mutation responsable de cette forme de HIGM conduit à l'introduction d'un codon stop dans le gène *ung*, produisant une protéine tronquée dysfonctionnelle. La mutation Phe251Ser induit la translocation d'UNG2 du noyau vers les mitochondries, aussi responsable de l'apparition du syndrome [543].

Le système nerveux peut être particulièrement touché par une déficience de la réparation de l'ADN, comme nous l'avons décrit précédemment pour la réparation des cassures double brin (cf. § I.4.5.c). En effet, les neurones sont des cellules non prolifératives, et les dommages à l'ADN sont préjudiciables pour la transcription et peuvent donc promouvoir l'apoptose [544, 545]. Plusieurs

formes de neuropathologies ont pu être liées à une inactivation de différents gènes impliqués dans la réparation des cassures simple brin, sous-voie du BER.

L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type I (« ataxia with oculomotor apraxia type I », **AOA1**) est caractérisée par une ataxie²⁰ progressive conjuguée à une neuropathie sensitivomotrice. Ces symptômes sont suivis quelques années après (dans l'enfance) d'une apraxie²¹ oculomotrice. L'AOA1 est causée par une mutation sur le gène *aptx* codant pour l'aprataxine, responsable de l'hydrolyse des extrémités 5'-ADP issues de ligations avortées [546, 547].

Egalement, une forme rare d'ataxie cérébelleuse (atteinte du cervelet) différentes du syndrome A-T (cf. § I.4.5.c) a été reliée à une mutation de la protéine TDP1 (His493Arg). Cette mutation diminue fortement l'activité de l'enzyme responsable de la réparation des complexes Top1/ADN [548, 549]. L'accumulation de ces complexes chez les patients **SCAN1** (« spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type I ») cause une neurodégénérescence du cervelet à l'origine des symptômes (incoordination de la démarche, de la parole et des gestes manuels).

Récemment un nouveau syndrome héréditaire, causé par une inactivation de la protéine PNK, a été caractérisé. Il s'agit d'une forme sévère de microcéphalie (petitesse excessive de la tête) associée à de l'épilepsie incurable (« microcephaly and seizure », **MCSZ**). Le syndrome inclut également un retard développemental et neurologique [550].

De façon étonnante, aucun de ces trois désordres neurologiques n'augmente l'incidence de cancers. Cette observation suggère que la sous voie du BER réparant les cassures simple brin est garant de la viabilité des tissus mais jouerait un rôle mineur dans la préservation de l'intégrité génomique, du moins en l'absence de stimulation exogène [551].

La maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative liée à l'âge, est caractérisée entre autres par une accumulation de lésions oxydatives dans les tissus cérébraux [552-554]. De nombreuses études ont démontré l'implication d'une déficience du BER dans la réparation de ces lésions. Notamment certaines mutations du gène *ogg1* associées à une diminution de l'activité glycosylase ont été retrouvées chez plusieurs patients [555]. Bien que le lien causal direct reste à démontrer, il est probable qu'une inactivation du BER dans les formes d'Alzheimer sporadiques ou un polymorphisme particulier dans les formes héréditaires soit partiellement responsable du développement de la pathologie.

²⁰ L'ataxie correspond à un trouble de la coordination des mouvements volontaires d'origine neurologique

²¹ L'apraxie se caractérise par une difficulté à effectuer des gestes et des mouvements précis

5.8. Quand BER rime avec cancer...

5.8.a. Implication du BER dans la cancérogénèse

La cancérogénèse est un ensemble de processus conduisant à la transformation d'une cellule en cellule cancéreuse ayant acquis un phénotype pathologique qui induit sa prolifération anarchique. Lorsque la mutation induit l'inactivation d'un suppresseur de tumeur (qui inhibe la prolifération cellulaire) ou active un pro-oncogène (stimule la prolifération cellulaire), un déséquilibre entre l'ensemble des régulateurs de la prolifération cellulaire est créé. Selon un processus probabiliste, si plusieurs mutations de ce type ont lieu, la prolifération cellulaire est promue et les cellules concernées se divisent de façon anormale menant à l'apparition d'une tumeur (excroissance cellulaire). Lorsque cette tumeur continue de croître anarchiquement et perd la fonctionnalité du tissu dont-elle est issue, on parle alors de tumeur maligne ou cancer (opposé à tumeur bénigne) [556, 557].

Ainsi, il semble trivial d'établir le lien entre cancer et réparation de l'ADN de part le phénotype mutateur que peut conférer une déficience de la réparation. Toutefois, au regard des nombreuses études tentant d'établir ce lien, la corrélation entre BER et cancer n'est pas si évidente : une série de souris *KO* pour les différents gènes impliqués dans le BER à été développée [558]. Les souris *KO* pour une activité glycosylase particulière présentent souvent un phénotype similaire à celui des souris non mutées, reflétant la redondance des activités glycosylases pour les différents types de lésions ainsi qu'un certain chevauchement entre les différents mécanismes de réparation.

Le premier lien entre le BER et une maladie humaine a été établi par la découverte d'une mutation héréditaire du gène *myh* associée à une prédisposition pour le cancer colorectal [559, 560]. Les symptômes sont identiques à ceux référencés pour une polypose adénomateuse familiale (PAF) et se manifestent par l'apparition de centaines de petites excroissances (polypes) dans le colon et le rectum dès la puberté. Ces polypes adénomateux dégénèrent en cancer avant 40 ans [561, 562]. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans la polypose associée à MUTYH (« MUTYH-associated polyposis », **MAP**) : les variants Tyr176Cys et Gly393Asp sont associés à une diminution de l'activité de MUTYH, corrélant avec l'augmentation des transversions G : C → T : A observées dans les tumeurs [560, 563].

De façon moins évidente, certains polymorphismes d'OGG1 ont pu être associés à une augmentation de l'incidence de cancers. Notamment, le polymorphisme prévalent Ser326C a été intensément exploré et les résultats d'une centaine d'études s'avèrent parfois contradictoires [558, 564, 565]. Toutefois, on peut noter que la mutation bi-allélique Cys/Cys prédisposerait au cancer du poumon, de l'œsophage et de la prostate, selon la population étudiée (caucasien, asiatique,

fumeur,...) [558, 566, 567]. D'autres mutations très rares ont été identifiées dans des cas isolés de cancers gastriques, rénaux,... [568, 569]. La plupart de ces mutations impactent négativement sur l'activité glycosylase d'OGG1 [570].

Egalement, il semblerait que le polymorphisme d'APE1 soit impliqué dans une augmentation de la prévalence de certains cancers sporadiques du poumon, de la vessie ou de l'estomac [558]. Le variant Asp148Glu, présent dans près de 50 % de la population mondiale prédisposerait au cancer du poumon chez les fumeurs [571].

5.8.b. Implication dans la résistance et l'hypersensibilité aux traitements anticancéreux

Le rôle primaire des mécanismes de réparation de l'ADN est de préserver l'intégrité du matériel génétique des cellules saines. En outre, ils interviennent également dans la réparation des lésions de l'ADN induites par les agents anticancéreux génotoxiques ou par les rayonnements ionisants. Par conséquent, la réparation de ces dommages peut contribuer à des phénomènes de chimio- ou radiorésistance ou bien d'hypersensibilisation des cellules cancéreuses à ces traitements antinéoplasiques. Les systèmes de réparation jouent un rôle crucial dans l'efficacité des thérapies anticancéreuses et sont apparus très tôt comme une cible complémentaire pour potentialiser l'action des traitements existants (cf. I.5.8.c ci-après). Ici, nous allons illustrer au travers de plusieurs études, l'influence des enzymes du BER, plus particulièrement des glycosylases et de l'AP-endonucléase 1, dans la résistance des cellules de mammifères à certains agents anticancéreux (cf. Tableau 3).

La sous-expression de diverses ADN N-glycosylases souvent sensibilise les cellules à différents traitements. Par exemple, l'inhibition de la synthèse de NEIL1 par ARN interférent (ARNi) dans des cellules embryonnaires murines rend ces dernières hypersensibles à faibles doses de rayonnements [376]. Par un mécanisme similaire, la sous production de SMUG1 dans des cellules souches embryonnaires de souris (« mouse embryonic fibroblast », MEF) radiosensibilise ces cellules à des doses inférieures au gray (Gy) par rapport aux cellules contrôles (« wild type », wt) [425]. Le même groupe a montré que l'inhibition de la synthèse de SMUG1 augmente la cytotoxicité du 5-fluorouracile (5-FU) dans ces cellules, traduisant le rôle de SMUG1 dans la réparation des dUMP et 5FdUMP incorporés dans l'ADN après métabolisation du composé [572]. A l'inverse, l'inhibition de TDG dans des cellules cancéreuses de souris et de patients augmente leur résistance au traitement par cet antimétabolite [573]. Dans ce cas, l'effet sensibilisant de TDG peut être attribué à une accumulation d'intermédiaires toxiques (sites AP, CSBs) suite à l'initiation de la réparation des lésions issues du 5-FU.

Aussi, la surexpression d'OGG1 par infection rétrovirale de cellules hématopoïétiques murines procure une résistance supplémentaire des cellules vis-à-vis de l'agent alkylant thioTEPA (N,N,N'-triéthyléthiophosphoramide) [574]. Ce phénomène est assigné à la réparation des 7alkyl-FAPyG issues de l'ouverture réductrice des adduits formés par le thioTEPA [575]. Preston *et al.* ont obtenu le même résultat dans des cellules rénales embryonnaires humaines avec le cisplatine comme molécule thérapeutique [576]. De façon réciproque, la sous-production d'OGG1 dans des cellules cancéreuses humaines augmente l'effet cytotoxique de la bléomycine et des radiations ionisantes [577, 578].

De nombreuses molécules chimiothérapeutiques sont des agents alkylants de l'ADN qui génèrent des lésions mutagènes (O⁶-MeG) et cytotoxiques (3-MeA) (cf. § 1.2.3.d *alkylants thérapeutiques*). De ce fait, de nombreuses études ont considéré l'influence de l'expression de la glycosylase spécifique de nombre des adduits formés par alkylation sur la résistance de cellules néoplasiques à plusieurs alkylants thérapeutiques. La sous-production d'Aag dans plusieurs lignées cellulaires rend ces cellules hypersensibles au BCNU, au témozolomide (TMZ) ou au Me-Lex [579-582]. Ces observations traduisent le rôle protecteur de l'AAG dans la réponse à ces différents agents alkylants. Néanmoins, il a indépendamment été montré qu'une surexpression de cette protéine pouvait également sensibiliser les cellules à ces mêmes chimiothérapeutiques ainsi qu'au MNU [583-586]. Ces résultats, en apparence contradictoires, peuvent toutefois être aussi expliqués par une dérégulation du BER : dans ce cas, l'effet cytotoxique accru est attribué à la conversion massive des adduits, même inoffensifs comme la 7-MeG, en sites AP et CSBs qui rendent toxique l'environnement cellulaire [585, 587].

Par ailleurs, la suppression de l'activité APE1 diminue la résistance de cellules cancéreuses à divers traitements chimio- et radiothérapeutiques. L'extinction de 90 % de l'expression d'*ape1* dans des cellules d'ostéosarcome humain sensibilise ces cellules aux radiations ionisantes, au thioTEPA et à l'étoposide [588]. Un effet synergique similaire a été observé dans une lignée de glioblastome humain traitée au TMZ et préalablement transfectée avec des oligonucléotides antisens dirigés contre le gène d'APE1 [589].

Lam *et al.* ont montré que l'efficacité antitumorale d'analogues nucléosidiques dans une lignée de carcinome colorectal humain est potentialisée par la suppression de l'activité APE1. Réciproquement, la surexpression d'APE1 dans ces mêmes cellules leur confère une résistance aux antimétabolites [590].

En 2005, une étude de la corrélation entre la concentration d'APE1 nucléaire et la sensibilité de tumeurs à différents traitements a été menée sur plus de 60 tumeurs primitives neuro-ectodermiques (PNETs) [591]. Bien que l'activité d'APE1 varie d'environ 180 fois entre les patients, reliée de façon significative à l'âge et au sexe, une corrélation a pu être établie entre l'activité APE1

mesurée et le taux de progression tumorale suite à un traitement chimio et/ou radio thérapeutique. Cette même étude a établi que la diminution de l'activité APE1 par une stratégie antisens (oligonucléotide antisens) ou interférente (ARNi) sensibilisait ces cellules tumorales au TMZ ou au BCNU. Toutes ces études pointent APE1 comme une cible rationnelle pour augmenter l'efficacité des traitements pour certains types de cancers.

Protéine		Cellules	Traitement	Effet	Références
NEIL1	⬇	MES	Irradiation γ	Hypersens	376
SMUG1	⬇	MEF (UNG ^{-/-})	Irradiation γ	Hypersens	425
SMUG1	⬇	MEF (UNG ^{-/-})	5-FU	Hypersens	572
TDG	⬇	MEF / HeLa	5-FU	Résistance	573
OGG1	⬆	CSH de souris C57Bl/6J	thioTEPA	Résistance	574
OGG1	⬆	HEK273	cisplatine	Résistance	576
OGG1	⬇	OSCs	Irradiation γ	Hypersens	577
OGG1	⬇	A549	Bléomycine	Hypersens	578
AAG	⬇	MES	Bléomycine / BCNU	Hypersens	581
AAG	⬇	HeLa / A2780-SCA5	BCNU / TMZ	Hypersens	582
AAG	⬇	GMB6 / A172	TMZ	Hypersens	579
AAG	⬇	Gliomes humains	Me-Lex	Hypersens	580
AAG	⬇	BM de souris	TMZ / MMS	Résistance	476
AAG	⬆	MDA-MB231	BCNU / TMZ	Hypersens	584
AAG	⬆	MEF	TMZ	Hypersens	586
APE1	⬇	SNB19	BCNU/ TMZ	Hypersens	588
APE1	⬆	RKO	Analogues dU	Résistance	589
APE1	⬇	PNETs	BCNU / TMZ	Hypersens	590
APE1	⬇	hOSs	thioTEPA / Irradiation γ	Hypersens	590
APE1	⬇	T-Rex™ CHO	thioTEPA / TMZ / 5-FU	Hypersens	591

Tableau 3: Effet de la sur- (⬆)/ sous- (⬇) expression de protéines impliquées dans le BER sur l'efficacité d'un traitement chimio- ou radiothérapeutique : MES= cellules souches embryonnaire murine, MEF=fibroblastes embryonnaires de souris, CSH=cellules souches hématopoïétiques, HEK273=cellules humaines embryonnaires du rein 273, OSC=carcinome épidermoïde oral, A549=adénosarcome de poumon humain 549, A2790-SCA5=clone de lignée de carcinome ovarien A2780, GMB6=glioblastome multiforme 6, A172=lignée de glioblastome humain A172, BM=cellules hématopoïétiques, MDA-MB231=lignée cellulaire d'un cancer du sein humain, SNB19=lignée cellulaire dérivé d'un gliome, RKO=carcinome du colon p53-déficient, PNET=tumeur primitive neuro-ectodermique, hOS= ostéosarcome humain, CHO=ovaires de hamsters chinois.

5.8.c. Développement d'inhibiteurs de la réparation par excision de base

L'ensemble des études énoncées dans le paragraphe précédent sous-entend que l'efficacité d'un traitement anticancéreux génotoxiques est grandement influencée par les capacités de réparation des cellules tumorales. Aussi certaines tumeurs, caractérisées par une instabilité génétique intrinsèque peuvent présenter un profil en enzymes de réparation caractéristique, promouvant à la fois cette instabilité et la progression tumorale. Ces systèmes de réparation apparaissent donc depuis plus d'une décennie, comme des cibles potentielles dans le développement de nouveaux agents anticancéreux. Pour clôturer ce chapitre, nous allons exposer quelques inhibiteurs de la réparation par excision de base développés dans le but de potentialiser les traitements endommageant l'ADN des cellules néoplasiques prolifératives. Un second objectif de ces inhibiteurs est d'augmenter l'index thérapeutique en favorisant la diminution des doses de rayons ou de médicaments utilisées pour limiter les effets sur les tissus sains.

Plusieurs études précliniques utilisant des oligonucléotides antisens ou des ARN interférents ont montré que la sous régulation d'APE1 sensibilise les cellules tumorales à divers agents alkylants et aux radiations ionisantes [485]. Cet effet est surtout attribué au rôle d'APE1 dans la réparation des sites AP, qui, après la suppression de l'activité AP-endonucléase, s'accumulent dans les cellules et déclenchent l'apoptose. Ainsi, APE1 apparait comme une cible pharmaceutique attractive de part son rôle central dans le BER et les preuves corrélant l'activité d'APE1 à la résistance tumorale.

En utilisant un test de clivage d'oligonucléotide contenant un site AP, Madhusudan *et al.* ont identifié le premier inhibiteur biochimique et biologique d'APE1 à partir d'une banque de quelques milliers de molécules. Le composé « lead », CRT0044876 (acide 7-nitro-indole-2-carboxylique), est un inhibiteur spécifique des exonucléases III, incluant APE1 [593]. De plus, l'utilisation d'une dose non toxique de ce composé sur plusieurs lignées cancéreuses, en combinaison avec le MMS, le TMZ ou le hmdUrd (5-hydroxyméthyl-2'-désoxyuridine) augmente la cytotoxicité de ces agents anticancéreux. Aussi, le CRT0044876 n'augmente pas l'effet toxique du rayonnement UV, de la camptothécine ou de l'ypérite, formant des lésions non prises en charge par le BER. Ainsi, la sensibilisation des cellules par le CRT0044876 a pu être effectivement attribuée à l'inhibition de cette voie de la réparation. Une récente étude a montré que l'utilisation du CRT0044876 seul permet d'inhiber la prolifération de différentes lignées cancéreuses et augmente le nombre d'aberrations chromosomiques et l'apoptose [594]. Cet effet étant accru à pH légèrement acide, les auteurs suggèrent l'utilisation du CRT0044876 en monothérapie dans le cas des tumeurs solides, présentant souvent un environnement cellulaire acide.

En 1987, Liuzzi *et al.* ont démontré que la méthoxyamine (Mx) est capable d'inhiber l'UV AP-endonucléase chez *Micrococcus luteus* [595]. L'inhibition indirecte passe par l'attaque du site abasique par la Mx et sa conversion en éther d'oxime, non substrat pour l'AP-endonucléase. L'inhibition de l'AP-endonucléase humaine (APE1) par la Mx a également été mise en évidence [596]. Taverna *et al.* ont donc utilisé cet inhibiteur d'APE1 en combinaison avec le TMZ, l'IUdR ou des rayonnements gamma sur des cellules cancéreuses du cancer du colon (HCT116) résistantes à ces traitements. La Mx potentialise dans tous les cas la cytotoxicité de ces agents thérapeutiques et radiosensibilise les cellules [597-599]. Liu *et al.* ont démontré l'effet synergique de la Mx en association avec le TMZ dans le traitement de xénogreffes de lignées humaines de cancers du colon [600]. Ce traitement (Mx/TMZ) est actuellement en essai clinique de phase I dans le cas de tumeurs solides avancées²².

La lucanthone est une petite molécule capable de se fixer à l'ADN et d'inhiber la synthèse d'ARN. De plus ce composé a un effet inhibiteur de la topoisomérase II et de l'AP-endonucléase 1 [601]. Le traitement de cellules de cancer du sein avec la lucanthone potentialise la cytotoxicité du TMZ et du MMS [602]. Bien que les effets de la lucanthone peuvent indubitablement être en partie attribués à sa capacité à s'intercaler dans la double hélice (inhibition transcription, réparation), il a récemment été démontré que ce composé interagit de façon directe avec APE1 [601, 603]. La lucanthone est passée en phase II d'essais cliniques dans le traitement de glioblastomes multiformes, seule, ou en association avec le TMZ ou une radiothérapie²³.

A notre connaissance, aucun inhibiteur spécifique d'ADN-glycosylase n'a été décrit comme ayant un effet cytotoxique ou potentialisateur dans le traitement de cellules cancéreuses. Notons toutefois, que l'utilisation d'ARNi enrayant la production d'AAG potentialise l'effet de divers chimiothérapeutiques [579, 580, 582]. Ces études montrent que les glycosylases sont potentiellement des cibles de choix dans le développement futur d'inhibiteurs thérapeutiques de la réparation de l'ADN.

La découverte du rôle des PARPs dans la réparation de l'ADN a rapidement conduit au développement d'un certain nombre d'inhibiteurs (PARPi). Ainsi, Tentori *et al.* ont montré une augmentation significative de la survie de souris porteuses d'une xénogreffe de lymphome par le co-traitement TMZ/NU1025 (PARPi) alors que le TMZ seul n'a aucun effet [604]. Aussi, la sensibilisation au TMZ de cellules initialement résistantes par le composé AG14361 a conduit à l'optimisation de cette molécule [605]. Le composé optimisé AG-014699, associé au TMZ, est actuellement en essai

²² <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00892385>

²³ <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01587144>

clinique de phase I et II pour le traitement de mélanome et de cancer du sein²⁴. Bien que les nombreuses fonctions des PARPs ne soient pas complètement comprises, la suppression de la réparation des cassures simple brin et le déclenchement de l'apoptose des cellules cancéreuses par ces inhibiteurs a mené à leur utilisation en essais cliniques en combinaison avec des anticancéreux génotoxiques [606-609]. Le challenge actuel consiste à développer des inhibiteurs pouvant être utilisés en monothérapie dans le cas où les cellules cancéreuses présentent un profil de réparation différent des cellules saines.

²⁴ <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00664781> et http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/23/16_suppl/3065

6. Mesure des activités de réparation de l'ADN

6.1. Introduction

Depuis le séquençage complet du génome humain, de nombreuses études ont tenté de lier le polymorphisme nucléotidique (« single nucleotide polymorphism », SNP) d'un gène de la réparation de l'ADN à l'incidence de certains cancers ou autre pathologie. Toutefois, cette corrélation est souvent faible voire inexistante ou contradictoire. Citons pour exemple le SNP à l'origine du variant d'Ogg1 Ser326Cys : plusieurs études épidémiologiques ont relaté des résultats contradictoires sur l'association entre ce polymorphisme et l'incidence du cancer du poumon, de l'œsophage ou encore du côlon [567, 610, 611]. Bien que ce SNP soit désigné comme un biomarqueur potentiel de susceptibilité à différents cancers, la taille modeste des échantillons et les critères d'éligibilité pour l'inclusion des sujets dans ces études rendent ces conclusions controversées [612]. De plus, deux récentes méta-analyses de la littérature concluent à une corrélation modeste ou nulle entre le polymorphisme d'Ogg1 Ser326Cys et la susceptibilité au cancer du poumon [613, 614].

Une nouvelle approche basée sur l'analyse fonctionnelle de cette glycosylase a montré qu'une activité enzymatique réduite est un facteur de risque du développement de cancers, d'autant plus si elle est combinée à la consommation de tabac [615-617]. En outre, il semble que l'activité enzymatique d'Ogg1 ne dépende pas du polymorphisme génétique [618]. Le test fonctionnel, contrairement au génotypage, possède l'avantage de mesurer les capacités de réparation de l'ADN effectives des patients, intégrant des dizaines de facteurs dont le polymorphisme génétique, les facteurs épigénétiques, l'épissage et la stabilité de l'ARNm, la stabilité protéique, les modifications post-traductionnelles [615, 619]... S'ajoutent à cela la redondance des activités enzymatiques conférant sa versatilité au système de réparation par excision de base ainsi que le recouvrement des différents systèmes de réparation qui complexifient l'étude du lien entre la réparation de l'ADN et la susceptibilité au cancer [620].

Au vu de la production scientifique en constante croissance dans le domaine de la réparation de l'ADN et de l'intérêt grandissant de cibler ces voies métaboliques pour le (co)traitement de diverses pathologies, il apparaît important, aujourd'hui plus que jamais, de disposer de tests de mesure de ces différentes activités enzymatiques.

Dans la suite de ce chapitre nous énumérerons les différentes méthodes d'analyse des activités de réparation de l'ADN. Nous focaliserons cette étude bibliographique sur la mesure des activités de réparation par excision de base qui intéresse ce travail de thèse. Nous différencierons les mesures d'activités *in cellulo* des tests *in vitro* à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires ou

tissulaires. Aussi les avantages et inconvénients de chaque méthode seront discutés selon les critères suivants:

- Sensibilité
- Spécificité
- Limite de détection
- Reproductibilité/répétabilité (fiabilité)
- Rapidité/simplicité
- Equipement/coût
- Détection multiplexée
- Détection en temps réel

Dans tous les cas, pour étudier les processus enzymatiques impliqués dans la réparation de l'ADN, il faut fournir aux enzymes un substrat sous forme d'acide nucléique lésé. Ce dernier peut être l'ADN nucléaire, le nucléoïde isolé, de l'ADN nu, une sonde plasmidique ou encore un oligonucléotide synthétique (ODN).

6.2. *Détection in cellulo*

6.2.a. *Sensibilité cellulaire à un stress génotoxique*

Historiquement, la réparation de l'ADN est détectée indirectement en évaluant la sensibilité de cellules à un agent mutagène tel que le rayonnement UV, gamma, des agents alkylants ou oxydants [621-625]. Toutefois, cette technique n'est pas spécifique à la réparation de l'ADN car les lésions peuvent interférer également avec les processus de réplication, de transcription ou de traduction.

6.2.b. *Mesure cinétique de la disparition des dommages*

Une façon également indirecte mais plus spécifique de mesurer les activités de réparation de l'ADN consiste à mesurer le taux de dommages à différents temps post-stress. Le recouvrement de l'ADN intact ou la disparition des lésions de l'ADN reflète la réparation des lésions introduites.

Détection de cassures de brins

La modification de la structure chimique de l'ADN la plus facilement détectable est la rupture de l'une ou des deux chaînes de la biomolécule. Plusieurs techniques ont été développées dans les années 60-70 utilisant la propriété de perturbation de l'ADN en conditions plus ou moins dénaturantes de la double hélice. Citons pour exemple le test Halo, l'élution alcaline, le déroulement alcalin, ou encore le test des comètes.

Le **test Halo** a été décrit pour la première fois en 1965 par Vinograd et *al.* et adapté à la détection de la réparation de l'ADN suite à une irradiation par Roti Roti et *al.* [626, 627]. Brièvement, une suspension cellulaire est déposée dans un gel d'agarose entre deux lames couvrantes. Après polymérisation, la lame supérieure est retirée et le gel est plongé dans une solution de lyse afin de ne laisser que le nucléoïde sous sa forme compacte. Finalement, la lame est plongée dans une solution saline et l'ADN est marqué par de l'iodure de propidium ou d'éthidium. Le terme « Halo » fait référence à la forme circulaire diffuse du nucléoïde après ce traitement. En effet, les fragments d'ADN diffusent de façon radiale à travers les pores du gel grâce à la force osmotique. La distance de migration est inversement proportionnelle à la taille des fragments. Pour détecter les cassures simple brin et les sites alcali-labiles, ce test a été modifié par l'utilisation d'un tampon alcalin (pH>12) dans la dernière étape. Le pH élevé permet d'augmenter la distance de migration de l'ADN alors dénaturé et de révéler les sites alcali-labiles. Ce test a permis de détecter la réparation de lésions suite à un traitement oxydatif (H₂O₂) ou alkylant (MMS) [628, 629]. Cette technique possède l'avantage d'être très rapide et économique. De plus, elle permet la visualisation des cassures de brin sur cellule unique.

Le **test des comètes**, ou « *single cell gel electrophoresis* » (SCGE), utilise un principe de séparation des fragments d'ADN comparable au test Halo (Figure 18). De la même façon les cellules traitées ou non sont remises en suspension, immobilisées dans une matrice d'agarose sur lame de microscope puis lysées, exposant ainsi l'ADN nucléaire superenroulé à l'intérieur du gel. Dans la version standard développée par O. Ostling et K. J. Johanson, le nucléoïde ainsi libéré est soumis à une électrophorèse en condition neutre, puis est marqué avec un intercalant de l'ADN fluorescent (communément du bromure d'éthidium ou du DAPI) [630]. Dans ces conditions, les fragments d'ADN et les boucles relâchées par la présence de cassures de brin migrent et s'éloignent du nucléoïde dessinant ainsi la queue d'une comète. L'électrophorèse en conditions alcalines, imaginée par Singh et *al.* en 1988, permet d'augmenter le degré de relaxation de l'ADN (visuellement, d'augmenter la longueur de la queue de la comète) et permet de révéler les sites alcali-labiles, notamment les sites abasiques [631]. Ce test des comètes « amélioré » est probablement un test de détection des

dommages et de la réparation de l'ADN *in cellulo* des plus utilisés, encore actuellement, notamment de part sa flexibilité, son faible coût et sa rapidité relative. De nombreuses modifications du protocole ont permis d'augmenter la versatilité de ce test. La réparation des cassures de brin a été étudiée par la mesure des fragmentations de l'ADN à différents temps post-traitement avec la bléomycine ou des radiations ionisantes. L'utilisation d'enzymes spécifiques de certaines lésions avant l'étape de migration permet de convertir ces dernières en cassures simple brin de façon à les révéler. Aussi, l'endonucléase III est utilisée pour détecter les pyrimidines oxydées, la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) pour détecter les produits d'oxydation de la guanine, la T4 endonucléase V pour révéler les dimères de pyrimidines, AlkA incise l'ADN au niveau des 3-méthyladénines, UDG excise les bases uracile de l'ADN avant que les sites AP ne soient clivés en conditions alcalines [632-638]. Dans cette modification de la méthode, la spécificité de chaque enzyme doit être questionnée.

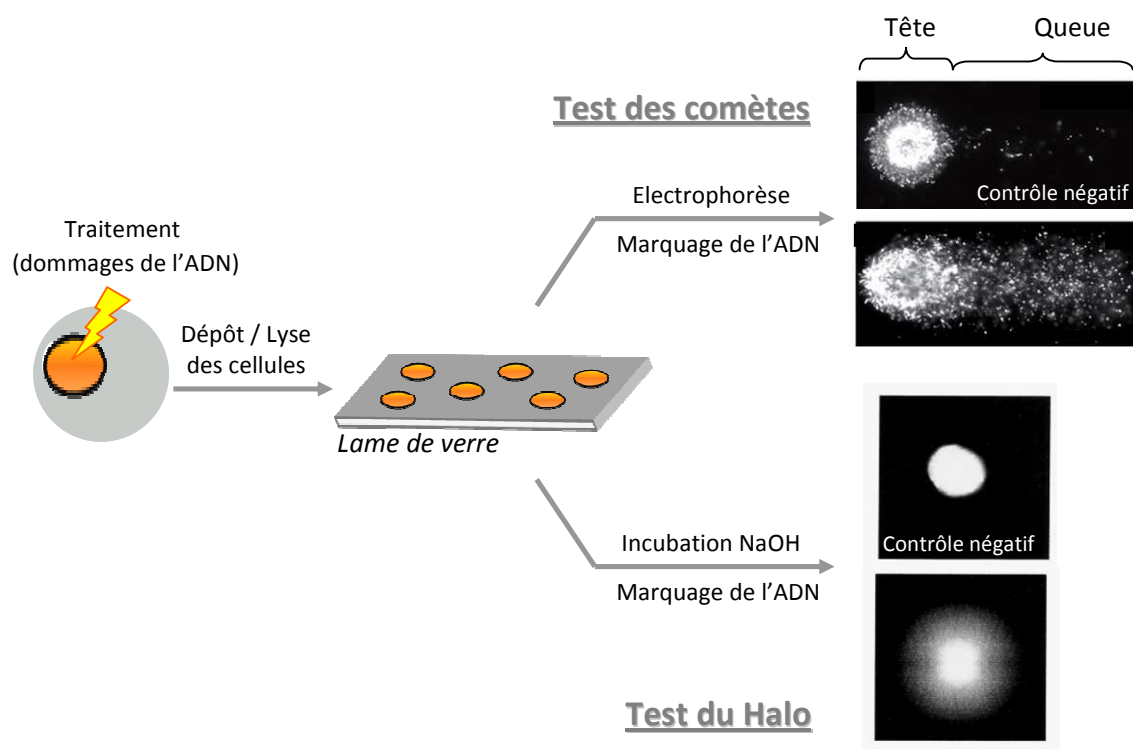


Figure 18: Principe de détection des cassures de l'ADN par le test des comètes ou le test Halo.

La méthode des comètes a également été utilisée pour mesurer directement les coupures de l'ADN issues d'une activité de la réparation. Dans ce cas, les cellules sont traitées avec un agent qui ne génère pas de cassures de brin tel que les UVC ou encore la bléomycine. Dans cette approche, les cassures de brin observées dans la queue de la comète correspondent à l'incision des lésions générées par les activités NER principalement [639, 640]. Aussi, l'emploi d'inhibiteurs des

polymérase (e.g. l'aphidicoline) induit l'accumulation de sites de réparation incomplète permettant d'augmenter la sensibilité du test [641, 642]. La SCGE est donc très adaptable et permet de mesurer diverses activités de réparation suite à des traitements hétéroclites, sans extraction ni digestion de l'ADN. Bien que fiable et très sensible, la méthodologie du test des comètes conduit à de grandes variations intra et inter-individus dans plusieurs études épidémiologiques, traduisant le besoin d'augmenter la reproductibilité des mesures. Le test nécessite peu de cellules permettant l'étude des capacités de réparation d'individu à partir de lymphocytes facilement prélevables [643-645]. En revanche, des efforts restent à fournir pour augmenter la capacité de parallélisation et d'automatisation de la méthode en vue d'expériences à haut débit [615, 646].

En 1973, Kohn et *al.* publient une nouvelle méthode de détection qualitative des cassures de brin et des sites alcali-labiles par extension [647]. Cette technique, nommée **éluion alcaline**, est basée sur la différence de temps d'éluion des fragments d'ADN nucléaire à travers un filtre. Pour cela les cellules sont cultivées en présence de nucléotides radiomarqués ($[^{14}\text{C}]\text{dT}$ ou $[^3\text{H}]\text{dT}$) qui vont s'incorporer dans l'ADN. Une fois marquées puis traitées par l'agent mutagène, les cellules sont lysées sur le filtre de sorte que seul l'ADN soit retenu et que les autres constituants cellulaires soient éliminés par rinçage. Finalement, l'ADN est élué avec une solution concentrée d'hydroxyde de sodium (0.1 N) délivrée par une pompe péristaltique et les différents fragments sont détectés grâce à un compteur à scintillation. Ce test fiable et reproductible a permis de détecter la réparation des dommages causés par les rayons X ou γ , un stress oxydant ou un agent alkylant [648-651]. Pflaum et *al.* ont modifié ce test en introduisant une étape de digestion de l'ADN par la Fpg de façon à révéler les lésions oxydatives, notamment la 8-oxodésoxyguanosine [649, 652]. Cette technique possède l'avantage de ne nécessiter que peu de cellules (10^6). Toutefois, l'analyse est limitée à un nombre restreint d'échantillons et est difficilement automatisable.

En 1973 toujours, G. Ahnstrom et *al.* ont développé un test de détection des cassures de brin basé sur le déroulement de l'ADN en condition alcaline (« **alkaline unwinding** ») [653]. Le principe repose sur l'observation que la présence d'interruptions dans la double hélice accélère la dénaturation (le déroulement) de l'ADN dans des conditions de pH et de température contrôlées. Le protocole standard consiste à isoler l'ADN cellulaire par la lyse des cellules puis à le soumettre à une dénaturation partielle dans un tampon alcalin. Après la neutralisation de la solution, l'ADN est fragmenté par sonication et stabilisé avec une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS). Les fragments sont chromatographiés sur une colonne d'hydroxyapatite [654]. Les éluats sont finalement marqués, classiquement avec un fluorochrome intercalant, avant d'être analysés. L'incubation des nucléoïdes avec la Fpg avant le traitement alcalin permet, comme pour les autres méthodes, de

détecter les lésions oxydatives et leur réparation en récoltant les cellules à différents temps post-stress [655].

Une adaptation simplifiée de cette méthode s'affranchit de l'étape d'élution. L'analyse fluorimétrique du déroulement de l'ADN (« fluorometric analysis of DNA unwinding », **FADU**) utilise la différence d'intensité de fluorescence du bromure d'éthidium ou d'autres intercalants de l'ADN (SYBR Green®), plus spécifiques du double brin que du simple brin d'ADN [656]. Ainsi, la quantification de la fluorescence après le traitement alcalin entre un échantillon traité et non traité permet de mesurer le taux de cassures de brin, ou de lésions. Cette méthode a été adaptée à un test haut débit en plaque 96 puits avec l'utilisation d'un nombre limité de cellules ($\approx 10\,000$). Toutefois, la spécificité de ce test reste modeste, du fait que les cassures observées proviennent à la fois du traitement subi par les cellules mais aussi des activités de la réparation.

Techniques chromatographiques

Un autre moyen d'analyser les dommages de l'ADN est de détecter directement les bases endommagées. Les méthodes détaillées ci-après nécessitent l'extraction et la digestion de l'ADN cellulaire. Les bases, nucléosides, ou nucléotides en mélange peuvent être purifiés avant d'être finalement séparés par chromatographie et détectés par radioactivité, électrochimie ou encore par spectrométrie de masse (Figure 19).

La technique du **post-marquage au phosphore 32**, développée initialement par l'équipe de R. Randerath, permet la détection des adduits stables de l'ADN avec divers agents génotoxiques [657]. L'ADN, une fois isolé, est digéré enzymatiquement en nucléosides 3'-monophosphate. Ces derniers sont subséquentement phosphorylés à l'extrémité 5' par la T4 polynucléotide kinase (T4-PNK) en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ avant d'être séparés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle et détectés par autoradiographie. Plusieurs modifications de ce test ont été employées afin d'augmenter la sensibilité de la méthode (détaillé dans [658]): l'enrichissement en adduits radiomarqués est rendu possible par la post-incubation des produits de digestion de l'ADN avec la nucléase P1 [659]. Cette enzyme déphosphoryle l'extrémité 3' des nucléotides normaux qui ne sont alors plus substrats pour la T4-PNK. L'étape de radiomarquage permet donc de n'étiqueter que les nucléotides modifiés. Une seconde procédure d'enrichissement exploite les propriétés hydrophobes de certains adduits à l'ADN (avec des carcinogènes) qui peuvent être isolés du pool de nucléotides normaux par extraction dans le butanol en présence d'un agent de transfert de phase (chlorure de tétrabutylamonium) [660]. Le remplacement de la chromatographie sur couche mince par la chromatographie liquide haute performance (« high performance liquid chromatography », HPLC) couplée à un compteur à scintillation en ligne a permis d'accélérer et de rendre la quantification des

adduits plus précise [661, 662]. Le post-marquage au phosphore 32 a été utilisé pour mesurer la réparation *in vivo* des éthénobases (ϵ A ϵ C) [107], des adduits de l'oxyde de propylène [663] ou encore des dimères de pyrimidines [664]. Cette technique est l'une des méthodes d'analyse des dommages à l'ADN les plus sensibles (1 lésion détectée pour 10^9 - 10^{10} nucléotides normaux) et n'exige que très peu d'ADN (1-10 μ g). De plus, le fait de marquer les nucléotides suite à l'exposition avec le composé non radiomarké confère une grande versatilité à ce procédé pour la détection de centaines d'adduits, bien que le nombre d'échantillons pouvant être analysés est limité par le temps nécessaire aux différentes étapes de digestion, de purification, de marquage et de chromatographie. L'emploi de la radioactivité nécessite également des locaux et des équipements adaptés. Afin de s'affranchir de l'utilisation d'une source radioactive, le post-marquage avec un composé fluorescent détecté par HPLC a également été développé [665-667].

Certaines lésions de l'ADN présentent des propriétés physico-chimiques qui permettent leur détection spécifique en mélange [668]. Pour exemple, la 8-oxoguanine présente un potentiel d'oxydation plus faible que les autres bases et peut être mesurée par HPLC couplée à une détection électrochimique (**HPLC-EC**) [669-671]. Les lésions 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5-OHdC), 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (5-OHdU) et 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxyuridine (dUg) sont également électroactives ce qui a permis leur détection et l'analyse de leur réparation dans différents organes [48]. Bien que cette méthode soit sensible (1 lésion pour 10^8 nucléotides non modifiés) et limite l'oxydation de la guanine lors de la préparation de l'échantillon, elle reste limitée à l'analyse de la réparation de quelques lésions spécifiques [672].

En revanche, le remplacement de la détection électrochimique par une détection par spectrométrie de masse a permis d'augmenter la versatilité de cette approche chromatographique, sans pour autant sacrifier la sensibilité. La spectrométrie de masse permet également l'identification structurale des adduits mesurés.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection en spectrométrie de masse (**GC-MS**) permet de mesurer le taux de bases modifiées telles que la 8-oxoguanine, les formamidopyrimidines (FAPyA et FAPyG) ou encore des produits d'alkylation [669, 670, 673-675]. Cette technique requiert dans un premier temps la libération des bases de l'ADN par une hydrolyse en conditions acides. Une dérivation de l'échantillon par silylation des bases est nécessaire pour optimiser la chromatographie. Cette étape, impliquant un chauffage prolongé de l'échantillon, est responsable de l'oxydation non désirée des bases (notamment de la guanine) induisant une surestimation de ces lésions lors de l'analyse [676, 677]. La pré-purification des bases oxydées par HPLC ou par chromatographie d'immuno-affinité permet de limiter la formation artéfactuelle de 8-oxoguanine [678]. A l'instar de l'HPLC-EC, la GC-MS est appropriée à la détection directe des bases

modifiées excisées par les glycosylases du système BER [679]. Toutefois, la pré-purification nécessaire des adduits rend l'analyse en routine fastidieuse.

A la fin des années 90, l'avènement de l'HPLC couplée à la détection par spectrométrie de masse (**HPLC-MS**) a permis de pallier aux limitations de la chromatographie en phase gazeuse (i.e. la dérivation nécessaire de l'échantillon et l'auto-oxydation résultante de cette étape) [680]. Cette technique combine la facilité d'utilisation et le grand pouvoir résolutif de l'HPLC à la sensibilité et la versatilité de la spectrométrie de masse en ionisation électrospray (**ESI-MS**). L'échantillon d'ADN extrait est hydrolysé enzymatiquement ou chimiquement. Le mélange de nucléosides ou de bases obtenu est séparé avec la méthode appropriée par HPLC et l'éluat est directement dirigé vers le spectromètre de masse. Le mode tandem (**HPLC-MS/MS**), aujourd'hui largement utilisé pour la détection des dommages de l'ADN, a grandement amélioré la sensibilité et la spécificité de la méthode de détection par l'analyse de la fragmentation de l'ion pseudomoléculaire d'intérêt (c.f. [681-683] pour revue). En outre, l'emploi de nucléosides analogues marqués isotopiquement permet une quantification précise des adduits [680, 684]. La mesure des lésions générées à différents temps post-stress (*in vivo* ou *in cellulo*) donne l'accès aux cinétiques de réparation de ces dommages [684, 685]. Egalement, le dosage de certains adduits tels que la 8-oxoguanine, le glycol de thymine ou la 5-méthylcytosine directement dans les urines donne des informations sur l'excision de ces bases par les systèmes de réparation de l'ADN [686, 687].

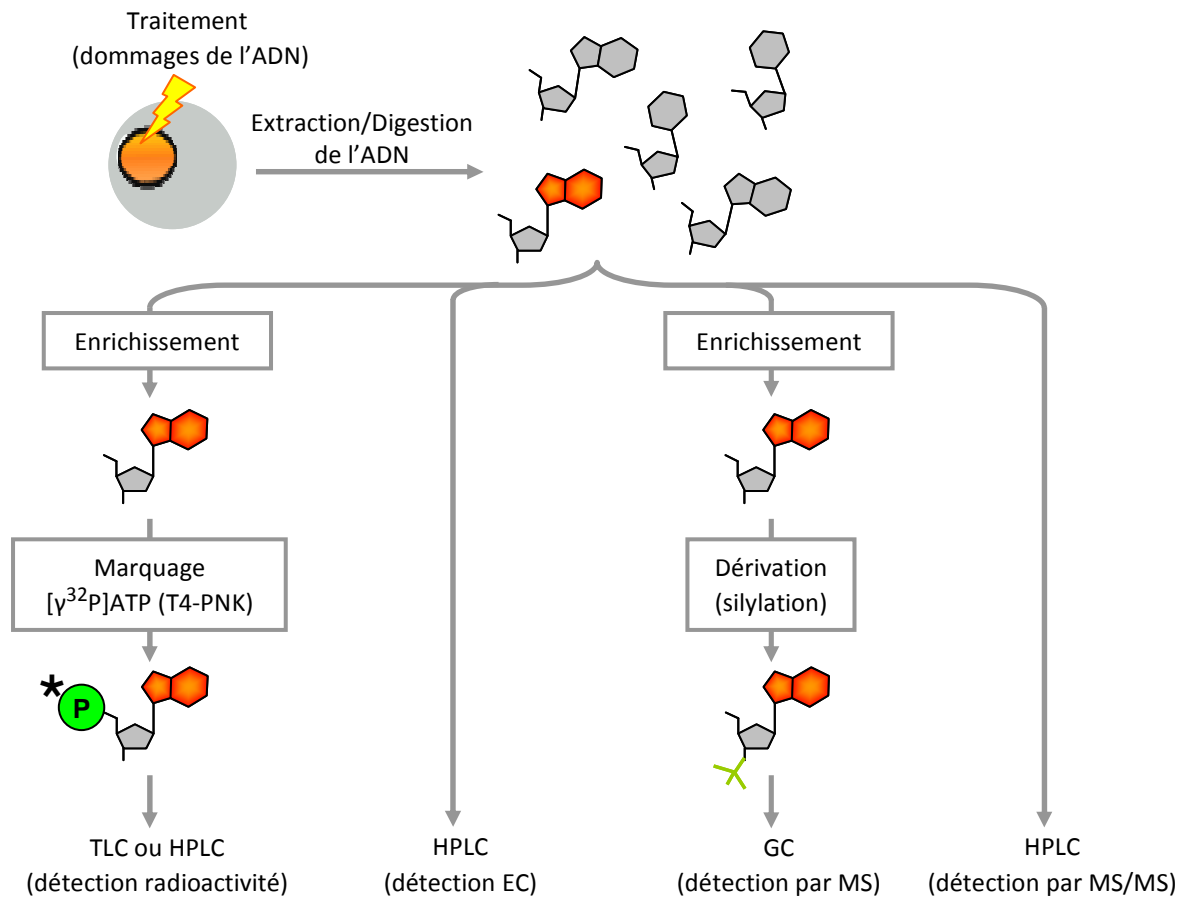


Figure 19: Techniques chromatographiques appliquées à la détection des adduits de l'ADN.

Techniques immunologiques

Dans certains cas, il est possible de produire des anticorps reconnaissant spécifiquement une base ou un nucléoside lésé. Ces anticorps sont utilisés en immunohistochimie pour détecter directement les dommages de l'ADN sans extraction ni hydrolyse de la biomolécule. La détection se fait le plus souvent avec un anticorps secondaire radiomarqué, fluorescent ou conjugué à une enzyme (peroxydase de raifort). Des anticorps, aujourd'hui disponibles commercialement, ont été développés contre un large panel d'adduits ADN-carcinogène aussi bien que contre les lésions UV ou certaines lésions oxydatives ou alkylées, permettant également d'étudier leur réparation *in cellulo* [688-694]. D'autres techniques *in vitro* utilisent des anticorps mono- ou polyclonaux pour détecter ces dommages de l'ADN (pour revues, voir [695, 696]). Ces techniques souffrent toutefois d'un manque de spécificité dû à des réactions croisées entre l'anticorps et les nucléotides normaux [697, 698].

6.2.c. Transfection d'un vecteur exogène lésé

Les méthodes décrites précédemment ne déterminent qu'indirectement les capacités de réparation d'un individu, d'un tissu ou d'une cellule. La construction de sondes ADN lésées a supporté le développement de différents tests dédiés à la détection de la réparation de l'ADN *in cellulo*. L'avantage de l'utilisation de vecteurs exogènes est que l'ADN cellulaire n'est pas soumis à un traitement génotoxique pouvant altérer les capacités de réparation intrinsèques de la cellule. Cela permet également de minimiser les effets cytotoxiques de certains carcinogènes. Toutefois, la vectorisation de ces sondes (transfection) peut modifier le métabolisme cellulaire, introduisant un biais dans les résultats. L'utilisation de contrôles appropriés, comme dans toute méthode d'analyse, est donc indispensable.

Test de réactivation en cellule hôte

Le **test de réactivation en cellule hôte** (« host-cell reactivation », HCR), utilise la capacité de certaines lésions à bloquer la transcription. Ces lésions sont introduites par un traitement spécifique dans un plasmide exprimant un gène rapporteur. Une fois purifiés, ces plasmides sont transfectés dans la cellule hôte où la réparation des dommages conduit à la réactivation de l'expression de ce gène. Les cellules sont finalement lysées avant d'analyser l'activité de la protéine produite par l'addition de son substrat, transformé en produit visualisable (Figure 20). Initialement, le gène rapporteur codait pour la chloramphénicol acétyltransférase qui catalyse la substitution de l'acétylCoA tritié par le chloramphénicol [699]. Dans ce cas, l'extraction du chloramphénicol acétylé est indispensable avant de mesurer ce produit par scintigraphie. Des tests fluorescents, luminescents ou colorimétriques ont donc été imaginés, utilisant le gène codant pour la « Green Fluorescent Protein » (GFP), la luciférase ou la β -galactosidase [700-702]. Cette méthode rapide mais fastidieuse à mettre en place a permis de mesurer la réparation des lésions UV, des adduits du cis-platine, de dommages oxydatifs (8-oxoG, Tg), de sites abasiques ou encore de cassures simple brin [702-706]. De plus l'introduction de lésions spécifiques au sein des plasmides n'est pas toujours évidente et reproductible, de même que le nombre de lésions et leur localisation est difficilement contrôlable.

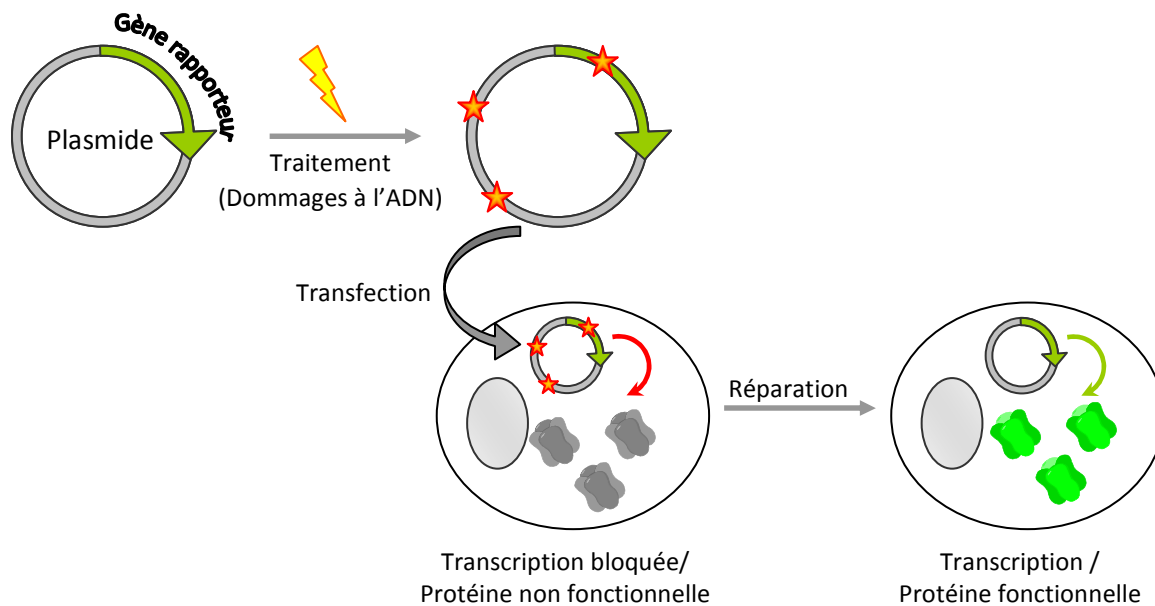


Figure 20: Principe de détection de la réparation par le test de réactivation (d'un gène) en cellule hôte (HCR).

Transfection d'un plasmide lésé

Dans l'optique de pallier à cette limitation, l'introduction d'une lésion unique dans un plasmide peut être réalisée par ligation sélective d'un oligonucléotide synthétique. Généralement, la lésion est insérée dans un site de restriction et bloque la coupure par l'enzyme correspondante. Le test est ensuite très similaire à la technique HCR. Brièvement, les plasmides sont transfectés, purifiés à un temps donné puis digérés par l'enzyme de restriction. Les fragments sont finalement analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. La réparation de la lésion conduit à la restauration du site de restriction et donc à l'apparition d'une bande correspondant au produit de digestion. Ainsi, la spécificité et la capacité de glycosylases bactériennes telles que Fpg, MutY ou Nth à réparer diverses lésions (8-oxoG, DHT, U seules ou en cluster) ont pu être évaluées [707-710].

Transfection de sondes oligonucléotidiques

Dans le but de développer une méthode de détection continue qui autorise la mesure d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN, des sondes oligonucléotidiques particulières ont été développées : les « *molecular beacons* » (traduit par balise moléculaire), qui seront développées dans la suite de ce chapitre (cf. § 1.6.3.c). Brièvement, une lésion de choix est introduite sélectivement dans la structure double brin d'un oligonucléotide auto-complémentaire. Les deux extrémités de cette même sonde sont marquées par un fluorophore et par un quencher. Dans cette configuration, le fluorophore n'émet pas de photon mais transfère l'énergie absorbée vers le

quencher, qui lui-même se désexcite de façon non radiative. Les sondes lésées pro-fluorescentes sont transfectées et l'activité de réparation conduisant à la coupure de la sonde au niveau de la lésion induit la déshybridation de la structure. Ce phénomène se traduit par une apparition de fluorescence du fait de l'éloignement des deux chromophores. En 2004, Maskimenko *et al.* visualisent par microscopie de fluorescence la réparation de l'uracile, de l'inosine et de sites abasiques grâce à la transfection des *molecular beacons* adaptés dans des cellules HeLa [711]. Ils relatent également l'inhibition de l'AAG *in cellulo* par l'éthénocytosine en utilisant une sonde contenant la lésion hypoxanthine [712]. Plus récemment, d'autres études similaires ont permis la détection de la réparation du thymine glycol et de la 8-oxoguanine [713-715].

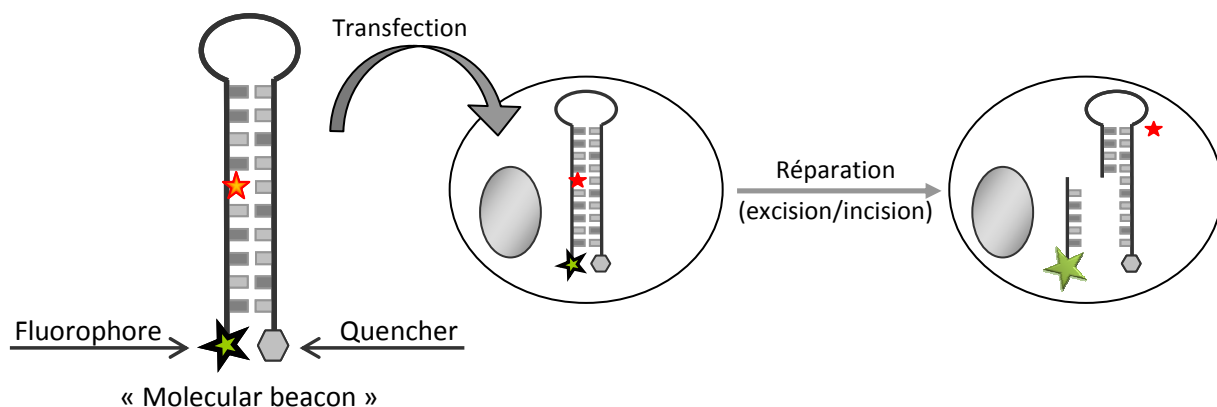


Figure 21: Principe de la détection d'activités de réparation de l'ADN par la transfection de *molecular beacons*.

La liste ci-dessus n'est pas exhaustive et plusieurs autres techniques ont été développées pour étudier la réparation de l'ADN *in cellulo*. Citons pour exemple la synthèse d'ADN non programmée (« Unscheduled DNA Synthesis », UDS) permettant d'étudier la réparation globale par excision de nucléotides *via* l'incorporation de nucléotides radiomarqués durant l'étape de resynthèse [716-718]. Egalement, les sondes ARP (« aldehyde reactive probe ») ont permis la détection des sites abasiques *in cellulo* et *in vivo* par luminescence ou tomographie à émission de positrons [719, 720].

6.3. Détection *in vitro*

Les méthodes de détection *in cellulo* présentent l'avantage de mesurer les activités de réparation à l'échelle de la cellule, en intégrant l'ensemble des processus métaboliques. Réciproquement elles ne permettent pas d'étudier une protéine de réparation unique. En outre, ces méthodes sont souvent peu spécifiques et/ou longues et représentent un coût élevé. La standardisation et la normalisation des données obtenues entre différentes lignées cellulaires peuvent également être un frein pour de tels développements. En revanche, la mesure d'activités de réparation à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires permet de remédier à ces difficultés. La disponibilité des enzymes purifiées permet la spécification de leur(s) activité(s). Aussi, l'étude des capacités de réparation d'extraits cellulaires simplifient les méthodes d'analyses, grâce notamment, au développement de protocoles d'extraction des protéines standardisés.

6.3.a. Test des comètes *in vitro*

Le test des comètes décrit précédemment (6.2.b) était initialement destiné à mesurer les capacités de réparation de cellules soumises à un stress. Une modification de cette méthode par Collins et *al.* applique le principe de ce test pour mesurer les capacités de réparation d'un extrait cellulaire en utilisant pour substrat les nucléoïdes, endommagés immobilisés dans la matrice d'agarose [721]. Dans cette configuration, les lésions générées dans l'ADN du nucléoïde sont prises en charge par les protéines de réparation contenues dans l'extrait cellulaire, qui génèrent des sites abasiques et des cassures de brin subséquentement détectées par électrophorèse couplée à un marquage fluorescent de l'ADN. Au cours du temps, la disparition de queue de la comète est interprétée comme une réparation complète par le BER ou le NER [638, 722-724]. Cette méthode permet de mesurer les capacités de réparation globales de l'extrait cellulaire. Notons que l'inhibition des activités polymérase (par l'aphidicoline par exemple) permet de ne visualiser que les étapes précoces d'excision et d'incision qui mènent à une accumulation de sites alcali-labiles et de coupures de brin [724]. En revanche, la question de l'activité des enzymes ciblées au sein du gel d'agarose doit être adressée. En outre, cette technique ne donne pas d'information sur la fidélité de la réparation.

6.3.b. Test excision/ resynthèse

Une autre technique permettant de détecter la réparation par excision dans son ensemble (BER ou NER) consiste à visualiser la réincorporation de nucléotides marqués dans un substrat initialement lésé (plasmide ou oligonucléotide) [725]. Dianov et *al.* ont démontré que la réparation

de l'uracile contenue dans un oligonucléotide double brin par des extraits bactériens ou de cellules humaines, en présence des 4 [α - 32 P]dNTPs, a majoritairement lieu par la voie du SP-BER [726]. En effet, la digestion de l'oligonucléotide par une enzyme de restriction suivi d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide démontre que seul un nucléotide est incorporé lors de la réparation. Stuart et *al.* examinent les capacités d'excision/resynthèse de lysats mitochondriaux. L'utilisation du seul dCTP radioactif permet de s'assurer de la fidélité de la réparation [727].

Des études similaires utilisant un plasmide lésé co-incubé avec un plasmide contrôle de taille différente en présence d'un extrait cellulaire et des dNTPs radioactifs ont reporté la détection de la réparation par digestion enzymatique des plasmides couplée à une électrophorèse sur gel révélée par autoradiographie [354, 728-730]. Notons que les plasmides lésés peuvent être synthétisés par traitement avec un agent génotoxique (cis-platine, tétroxyde d'osmium, photosensibilisateur, UV,...) ou par ligation d'un oligonucléotide synthétique contenant une lésion spécifique. Dans ce deuxième cas, le nombre et la structure des lésions sont parfaitement contrôlés.

En 1999, B. Salles et ses collaborateurs publient un test de détection de la réparation de la 8-oxoguanine et de diverses lésions oxydatives [731, 732]. Dans ce test, surnommé « 3D » (pour « Damage DNA Detection assay »), les plasmides sont d'abord adsorbés sur la matrice polylysine d'une plaque multipuits avant d'être endommagés par un traitement approprié. Ce substrat est alors incubé avec un extrait nucléaire avec du dUTP biotinylé. Ce nucléotide, incorporé lors de la réparation, est révélé par luminescence avec de l'avidine couplée à la peroxydase de raifort en présence de luminol. L'immobilisation de sondes présente des avantages considérables. D'une part, cela autorise le lavage des plasmides entre les différentes étapes de traitement / réparation / révélation. D'autre part, elle permet de s'affranchir des étapes fastidieuses d'extraction des sondes et de leur séparation par électrophorèse. Il en résulte que ce test, comme la plupart des tests supportés décrits par la suite, rend possible une analyse multiplexée et parallélisée de plusieurs activités de réparation spécifiques.

Plus récemment, une « puce plasmides » dédiée à l'étude de la réparation de l'ADN a été développée au laboratoire [733] : différents lots de plasmides comportant diverses lésions (lésions UV, adduits du cis-platine, 8-oxoguanines, pyrimidine glycols, sites abasiques...) sont préalablement préparés et purifiés. Ils sont ensuite immobilisés sur lames de verre, permettant l'obtention d'une puce multiplexe. Celle-ci est incubée avec l'extrait cellulaire et du dCTP ou dGTP fluorescents. Après lavage de la lame, la fluorescence incorporée, proportionnelle à la réparation du dommage, est quantifiée par un scanner de fluorescence.

6.3.c. Mesure d'activités de coupure de l'ADN (excision/incision)

A présent, nous allons décrire les méthodes de détection spécifiques des activités *N*-glycosylases et AP-endonucléases qui font l'objet de ce travail de thèse.

Détection de l'excision de lésions radiomarquées

Dans ce but, la détection des bases marquées excisées par les ADN *N*-glycosylases permet de mesurer spécifiquement l'activité enzymatique de ces protéines. Les glycosylases procaryotes ou eucaryotes spécifiques de l'uracile ont été intensivement étudiées par ce biais [436, 734-737]. Classiquement, de l'ADN nu (de thymus de veau) est modifié par déplacement de brèche (« nick-translation ») qui permet l'incorporation d'uraciles tritiées dans le double brin. L'activité glycosylase est quantifiée par radioactivité après élimination de l'ADN substrat (sur papier Whatman® par exemple). L'activité Aag a été étudiée selon un protocole analogue avec pour substrat de l'ADN de thymus de veau traité au MMS tritié [738-740]. L'incorporation de [³H] désoxyinosines dans un oligonucléotide simple ou double brin a permis d'évaluer la spécificité de cette même enzyme [741]. Cette méthode, bien que sensible, n'est pas appropriée à une analyse haut débit en routine du fait de l'utilisation de la radioactivité et de la préparation du substrat délicate à reproduire.

La spectrométrie de masse pallie à ces limitations grâce à un système automatisé. En outre, l'analyse des bases endommagées relarguées par les glycosylases par HPLC-MS/MS dispense du marquage de l'ADN [742, 743].

Détection par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Quelle que soit la lésion initiale, la réparation par excision de base génère systématiquement un intermédiaire de type cassure de brin (cf. § 1.5.1). Le clivage peut résulter soit de l'action conjointe d'une glycosylase monofonctionnelle et de l'AP-endonucléase, soit de l'activité lyase d'une glycosylase bifonctionnelle. Moutl méthodes de mesure des activités enzymatiques précoces du BER sont basées sur la détection de ce clivage spécifique.

Au début des années 90, le clivage d'un oligonucléotide lésé marqué radioactivement s'est rapidement imposé comme une technique de référence pour l'étude systématique des activités et de la spécificité des ADN *N*-glycosylases et AP-endonucléases [370]. L'ODN est synthétisé chimiquement rendant possible l'incorporation d'une lésion unique à une position définie. Après purification, celui-ci est marqué au phosphore 32 par la T4-PNK puis hybridé avec son complémentaire. Ce substrat est alors incubé avec des enzymes purifiées ou des extraits cellulaires. Les sites abasiques générés peuvent être clivés chimiquement (NaOH ou pipéridine concentrée) ou bien *in situ* par la présence d'une AP-endonucléase. L'incision du duplexe est finalement analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et les fragments sont révélés par autoradiographie. Quelques études utilisant ce test

de détection sont reportées dans le Tableau 4. Cette méthode donne l'accès aux constantes enzymologiques (le turnover de l'enzyme, sa constante d'affinité, de dissociation,...) du fait que la concentration en substrat est connue et que l'analyse par PAGE permet de quantifier à la fois l'ODN de départ et le fragment issu de la coupure. De plus, le test est extrêmement sensible (> 1 fmol de produit détectée) et ne nécessite que très peu de substrat (20 fmol à quelques pmol). Néanmoins, l'utilisation de la radioactivité et la faible possibilité de multiplexage a encouragé le développement de nouvelles méthodes de détection.

Une bonne alternative à la radioactivité est la fluorescence qui, bien que n'atteignant que rarement la sensibilité de l'autoradiographie, est aujourd'hui un marquage de choix pour s'affranchir des contraintes liées à l'emploi de radioisotopes (matériel et laboratoire dédié, coût, risque, gestion des déchets, décroissance) [744]. La détection par fluorescence présente deux autres avantages majeurs : le marquage des sondes peut être réalisé durant leur synthèse grâce à la disponibilité de synthons fluorescents ; contrairement au marquage au phosphore 32, la fluorescence est appropriée à une analyse haut débit. Egalement, certaines propriétés propres à la fluorescence sont intéressantes pour mettre au point des tests de détection multiplexés, rapides et simples.

Détection en solution

Par ailleurs, le quenching de fluorescence a été mis à profit pour la conception d'une nouvelle génération de sondes permettant la détection de l'initiation de la réparation en temps réel. Le quenching fait référence à un ensemble de processus physico-chimiques résultant en une diminution de la fluorescence (cf. Encart 2). Parmi ces processus, citons le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (« Fluorescence Resonance Energy Transfer », **FRET**) ou le quenching de contact qui sont les mécanismes prédominants dans les sondes décrites ci-après. Dans cette configuration, un second chromophore (« quencher ») est introduit sur le brin complémentaire, en face du fluorophore de façon à inhiber l'émission de fluorescence. L'excision/incision du dommage conduit à la déshybridation des deux brins, donc à une augmentation de l'intensité de fluorescence consécutive à l'éloignement du fluorophore et du quencher. La pro-fluorescence de ces molécules permet de s'affranchir de l'étape de séparation des fragments d'ADN par électrophorèse ou chromatographie. Le phénomène biologique initiant la séparation des chromophores est directement analysé en solution. Ces sondes ont ainsi été utilisées pour la détection d'activités enzymatiques très diverses telles des ADN *N*-glycosylases [745], des enzymes de restriction [746], des hélicases [747], des méthylases [748] ou encore l'intégrase du virus de l'immunodéficience humaine [749]. Un criblage haut débit d'une banque de molécules avec une sonde substrat de APE1 a permis l'identification du CRT0044876 comme inhibiteur de cette enzyme, avec, aujourd'hui, des applications potentielles en clinique (cf. § 1.5.8 et [750, 751]).

Encart 2 : Fluorescence et Quenching

La luminescence est un phénomène physique par lequel une molécule émet de la lumière après passage de ses électrons périphériques dans un état excité, provoqué par un facteur physique (absorption de lumière), mécanique (friction) ou encore chimique. La photoluminescence est une composante de la luminescence et correspond à la propriété de certaines molécules à absorber la lumière à certaines longueurs d'onde et à la réémettre avec une énergie plus faible. Si l'on étudie le diagramme de Jablonsky simplifié (cf. ci-après), on observe qu'une molécule possède des niveaux d'énergies électroniques multiples (S), avec S_0 correspondant à l'état fondamental. Chaque niveau d'excitation électronique est lui-même subdivisé en sous-niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle. Lors de l'interaction avec une onde électromagnétique, la molécule est capable d'absorber l'énergie d'un photon adéquate, se traduisant par le passage d'un électron vers une orbitale moléculaire non occupée, le plus souvent un état singlet (transition S_0 vers S_1 par exemple, ①). La désexcitation de la molécule peut avoir lieu suivant plusieurs processus non radiatif (émission de chaleur par conversion interne ou externe, ②) ou radiatif (émission d'un photon). Dans ce second cas on distinguera la fluorescence de la phosphorescence : la fluorescence est la propriété de la molécule à se désexciter par l'émission quasi immédiate (quelques nanosecondes) d'un photon à partir de l'état excité singlet (③). Ce retour à l'état fondamental se fait toujours à partir de l'état excité de plus faible énergie vibrationnelle (règle de Kasha). Cela explique à la fois le fait que le photon émis soit de plus faible énergie que le photon absorbé et que le spectre d'émission soit symétrique au spectre d'excitation. La phosphorescence implique le passage de l'état excité singlet vers un état excité triplet, par conversion intersystème (CIS, ④). Contrairement à la fluorescence, il y a un changement de la multiplicité de spin. La désexcitation par émission d'un photon est retardée du fait de la stabilité de cet état électronique (⑤).

Le quenching provient de mécanismes qui rentrent en compétition avec la fluorescence et résulte en un affaiblissement de l'émission de fluorescence. Un de ces mécanismes est le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET). Lors de ce processus non radiatif, l'énergie accumulée par la molécule fluorescente (donneur) atteint le niveau d'énergie de l'électron d'une autre molécule (accepteur). En fonction de la distance de ces molécules et de l'orientation des dipôles, l'énergie de l'état excité du donneur est transférée à l'accepteur. En conséquence, le fluorophore retourne à l'état fondamental, sans émettre de photon. Si l'accepteur est un fluorophore, celui-ci est capable d'émettre à son tour un photon de plus faible énergie. S'il n'est pas fluorescent, l'énergie est finalement dissipée sous forme de chaleur. Le quenching de contact (ou statique) est un second mécanisme de quenching de fluorescence. Dans ce cas, le fluorophore forme un complexe non-fluorescent avec une autre molécule (quencher). Lorsque ce complexe absorbe l'énergie lumineuse, celui retourne immédiatement à l'état fondamental sans émettre de photon.

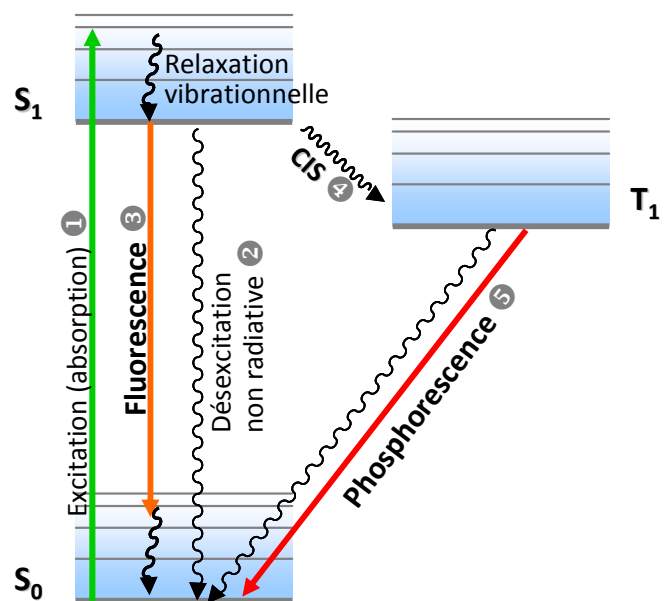


Diagramme de Jablonski

Référence	Marquage	Lésions	Cible	Support
370	³² P	8oxoG, 8oxoA, THF	Fpg	
752	³² P	8oxoG	HeLa	
753	³² P	U, 8oxoG, Tg	Cellules CS-B déficientes	
26	³² P	Hx	Aag	
448	³² P	DHT, 5-OHC, Tg, cycloG, cycloA	Fpg, EndoIII	
73	³² P	8MeG	AlkA, HeLa, CHO	
754	³² P	8oxoG	Cerveaux de rats	
617	³² P	8oxoG	Poumons humains	
755	³² P	Pyrimidine oxydées	NEIL1	
756	³² P	THF, 8oxoG, U	Cerveaux de rats	
757	³² P	Hx, εC	Aag	
758	³² P	DHT, Tg, 5OHC	Fpg, EndoIII	
357	³² P	U	SMUG1	
759	³² P	εA, εG	Poumons, leucocytes humains	
760	³² P	Z	NEIL1, NTH1	
761	HEX	8oxoG, THF	OGG1, APE1, HeLa,...	
762	FITC	8oxoG	OGG1, MCF-7	
763	cy5	8oxoG	MEF (OGG1 +/+ ou -/-)	
745	TMR/Dab	PolyU	UDG, A549	
764	FAM /Dab	THF	APE1	
711	FITC /Dab	U, Hx, THF	MEF	
712	FAM /Dab	Hx	AAG	
714	FAM /Dab ou cy5/BHQ2	Tg, DHT	EndoIII, NTH1	
765	TMR /Dab	U	SMUG1	
766	FAM /Dab	Tg, U, 8oxoG, THF	Enzymes purifiées ou extraits cellulaires	
767	Pyrène	U	UNG	
768	AP	U	UNG	
769	TxR/RhoG	U	UNG/APE1, HeLa	
770	FAM	U	UDG/EndoIV	graphène
771	PE	U, 8oxoG, Hx, εA, F	Enzymes purifiées ou extraits cellulaires	microplaque
772	cy3	Tg, THF, U	HeLa	microplaque
773	(HP) cy3	THF, U, 8oxoG, Hx	Enzymes purifiées ou extraits cellulaires	Lame de verre
774	∅	8oxoG, cycloG	AAG	Surface d'or
775	³² P	Hx	Fpg	Billes magnétiques
776	Biot/SAP	polyU	Fpg	Electrode d'or

Tableau 4: Détection de la réparation par excision de base avec des oligonucléotides synthétiques contenant une lésion.

En 1996, Sangay Tyagi et Fred Russel Kramer reportent la conception de nouvelles sondes originales destinées à la détection d'acides nucléiques : les *molecular beacons*, mentionnés dans le paragraphe I.6.2.c [777]. Ces sondes se caractérisent par une structure tige-boucle résultante de l'autocomplémentarité des deux extrémités marquées par un fluorophore et un quencher. Dans sa configuration initiale, la tige maintient les deux chromophores en contact étroit, nécessaire au transfert d'énergie : la sonde est donc pro-fluorescente. L'hybridation de la cible (séquence d'acide nucléique à détecter) avec la boucle simple brin induit l'ouverture du *molecular beacon* causant une augmentation de la fluorescence. Voici plus de 15 ans que les *molecular beacons* sont déclinés dans des applications aussi diverses que la PCR en temps réel [778, 779], la détection de SNP [780], la détection de l'expression d'acides nucléiques *in cellulo* ou d'ADN viral [781-784]. Plusieurs revues détaillent les applications analytiques des *molecular beacons* [785-789]. A l'instar des sondes quenchées classiques mentionnées dans le précédent paragraphe, les *molecular beacons* ont été rapidement adaptés à la détection d'activités de coupure de l'ADN. Li et *al.* utilisent ces sondes pour la détection de nucléases spécifiques du simple brin qui, en générant une coupure dans la boucle, provoque la déshybridation de la structure responsable de l'augmentation de la fluorescence. Egalement, l'introduction d'une lésion dans la tige a permis d'étudier les activités glycosylases et AP-endonucléase [711, 714, 764, 766, 790, 791]. La stabilité de cette structure particulière rend son usage particulièrement pertinent pour la mesure d'activités de la réparation au sein d'extraits cellulaires [711, 764, 765, 792].

Certaines molécules fluorescentes peuvent être quenchées par les bases avoisinantes lorsqu'elles substituent une base dans un brin d'ADN. C'est le cas par exemple du pyrène ou de l'aminopurine qui sont utilisés comme senseurs de l'excision de la base uracile incorporée de façon adjacente à ces fluorophores. L'action de l'UNG conduit donc à une apparition de fluorescence qui ne nécessite pas le clivage chimique ou enzymatique de la sonde [767, 768, 793]. Bien que peu versatile, cette méthode permet toutefois la détection d'activités glycosylases en temps réel, sur l'ADN simple brin.

Le clivage d'oligonucléotides substrats non marqués, suite à l'initiation de la réparation, peut être alternativement analysé par spectrométrie de masse [794, 795]. Généralement, les fragments générés, de quelques milliers de daltons, sont détectés par désorption et ionisation laser assistée par une matrice couplées à un analyseur à temps de vol (« Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation - Time of Flight », **MALDI-ToF**). Cette spectrométrie de masse de très bonne résolution donne accès au mécanisme d'incision du squelette sucre/phosphate. Toutefois, cette méthode est moins sensible que l'analyse PAGE ou par mesure de fluorescence et nécessite une grande quantité de substrat (quelques dizaines à quelques centaines de picomoles).

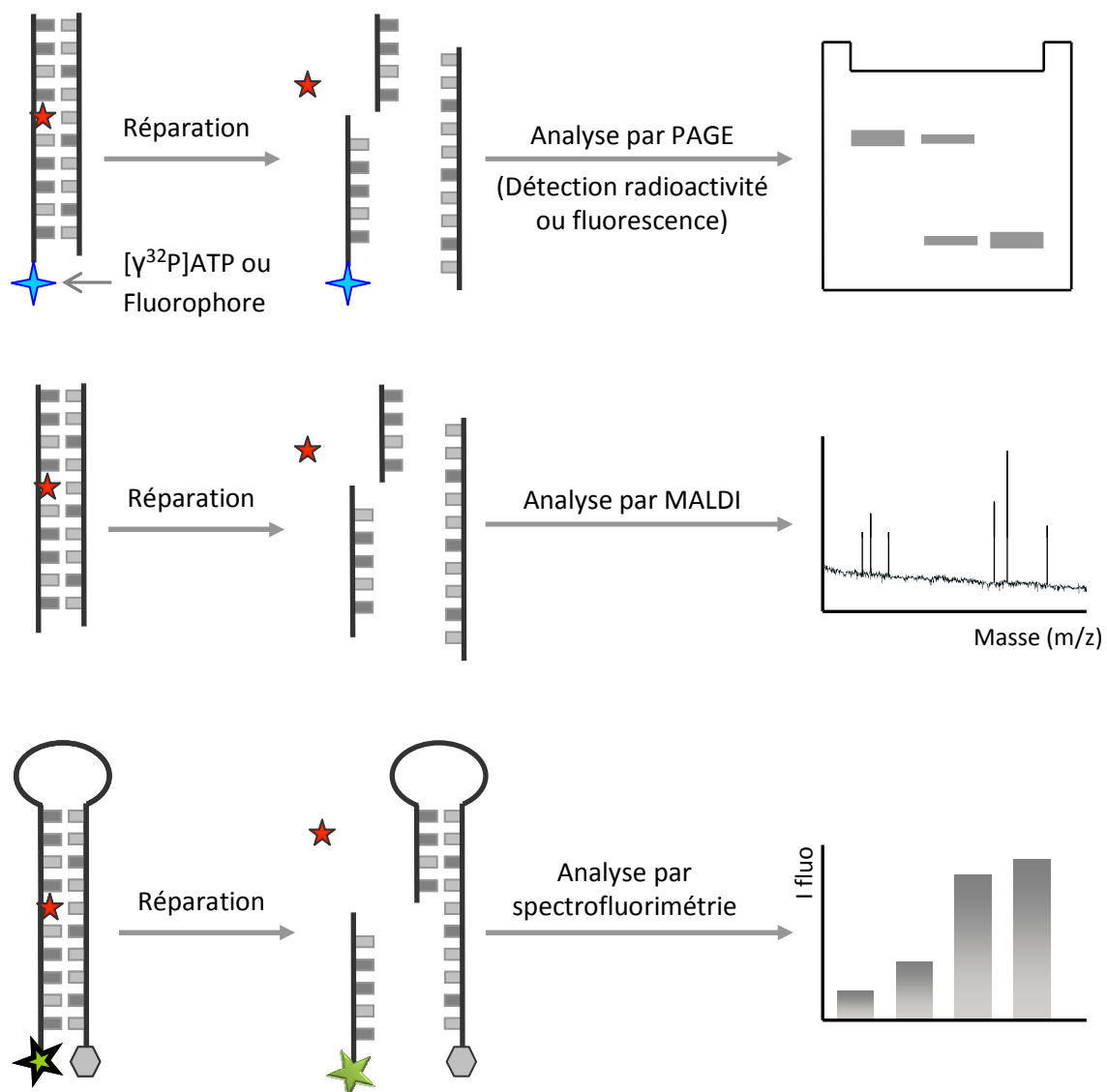


Figure 22: Méthodes de détection des activités ADN *N*-glycosylase/AP-endonucléases avec des oligonucléotides synthétiques lésés.

Détection sur support

La détection des activités de la réparation de l'ADN en solution grâce aux sondes quenchées autorise la parallélisation des analyses grâce à la facilité de manipulation des échantillons et la vitesse de l'analyse par simple lecture de fluorescence. Toutefois, le multiplexage, c'est-à-dire la détection simultanée de plusieurs activités au sein du même échantillon, nécessite la synthèse de sondes lésées marquées avec autant de fluorophores spectralement résolus [778, 796]. De plus, le choix de ces derniers se confine à la gamme spectrale visible, entre 400 et 800 nm. Dans le but

d'augmenter les capacités de parallélisation, de multiplexage et de miniaturisation des tests de détection, plusieurs outils basés sur l'immobilisation des sondes sur support ont été mis au point. Au laboratoire, Sauvaigo et *al.* ont développé une puce permettant de mesurer la réparation de plusieurs lésions simultanément [771]. Des sondes oligonucléotidiques double brin contenant diverses lésions (sites abasiques, bases oxydées, alkylées, désaminées) sont immobilisées séparément sur un support (puits de microplaque ou lame de verre). Ces duplexes marqués par un fluorophore sont incubés avec l'échantillon biologique à analyser. L'activité de réparation conduit au relargage d'un fragment fluorescent concomitamment à l'incision du duplexe. La fluorescence des spots, correspondant chacun à une lésion, est finalement mesurée par un scanner. Cette puce à oligonucléotides permet de mesurer dans le même échantillon la réparation du panel de lésions introduites [772, 797, 798]. Flaender et *al.* ont mis au point un capteur similaire basé sur le greffage covalent d'oligonucléotides lésés de type « *hairpin* » fluorescents sur lame de verre (Figure 23 et [773]). L'excision/incision du dommage se traduit de la même façon par une diminution de la fluorescence des spots correspondant à chaque lésion.

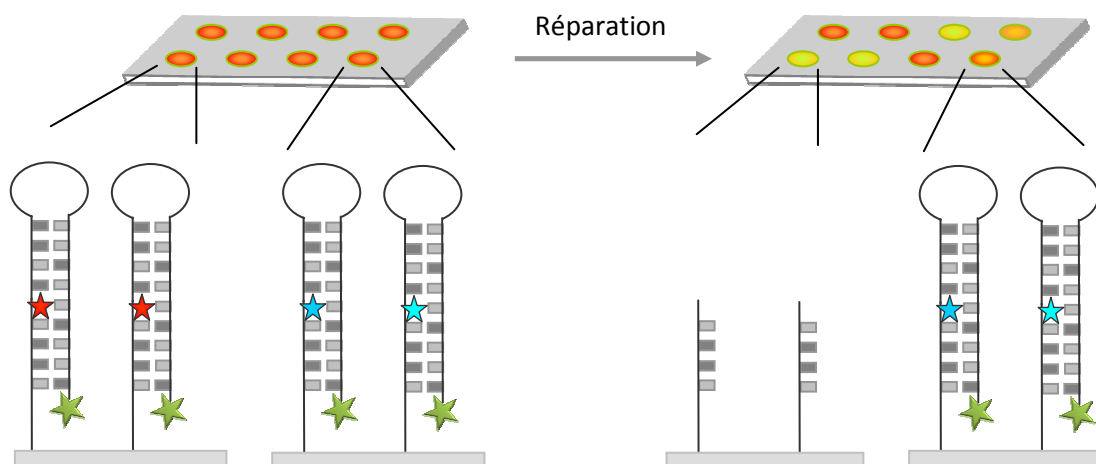


Figure 23: Principe de la biopuce mise au point au laboratoire pour la détection d'activité de réparation de l'ADN (adapté de [773]).

L'imagerie par résonance de plasmons de surface (« surface plasmon resonance imaging », SPRI) a également permis l'étude des activités glycosylases [799]. Ce système repose sur le greffage de sondes double brin à des endroits spécifiques de la surface d'or recouvrant un prisme de verre. Toute perturbation de la surface induit une modification des conditions de résonance de la surface (interrogée par une diode) qui se traduit par un changement de la réflectivité mesuré par SPR. Cet outil multiplexe possède le double avantage d'utiliser des sondes non marquées et de pouvoir mesurer aussi bien la fixation de protéines que l'excision et l'incision du duplexe.

Des microbilles magnétiques ont également été utilisées pour l'immobilisation de sondes marquées au phosphore 32 [775]. L'incision dans le duplexe favorise la libération d'un fragment radioactif qui se traduit réciproquement par une diminution de la radioactivité des billes, mesurée par scintillation. Dans ce cas, l'emploi de radioisotopes n'est pas adapté au multiplexage.

Notons que d'autres méthodes plus exotiques ont été récemment développées. Certains matériaux possèdent des propriétés de quenching de fluorescence qui peuvent potentiellement guider le développement de nouvelles méthodes de détection. Récemment, le graphène a été utilisé comme quencher d'une sonde fluorescente pour la détection en solution de l'action conjointe de l'uracile N-glycosylase et de l'endonucléase IV [770]. Egalement, l'incision d'un oligonucléotide substrat par les enzymes de la réparation a pu être détectée par PCR quantitative [800], électrochimie [776], spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence [769, 801] ou encore à l'œil nu *via* l'agglomération de nanoparticules d'or [802].

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

“ Experiments in the visual arts (the invention of new ways of seeing things), are made because, due to the way the apparatus that makes up the mind is made, old processes and patterns have continually to be broken up in order to make it possible to perceive the new aspects and arrangements of evolving consciousness. The great enemy of intelligence is complacency. ”

John Dos Passos

L'étude bibliographique présentée dans ce manuscrit souligne la **complexité** des mécanismes de réparation de l'ADN. Depuis la découverte fortuite de la photo-réactivation enzymatique des lésions UV dans les années 40, l'intérêt pour l'étude de la réparation des dommages de l'ADN n'a cessé de croître. Ainsi ont pu être mis en évidence les mécanismes d'excision et de réversion des lésions alkylées ou encore de réparation des cassures d'ADN. Aujourd'hui encore la recherche fondamentale ne cesse d'approfondir nos connaissances dans ce domaine : quelle est la spécificité de chacune des enzymes ? Comment sont reconnues et signalisées les lésions ? Dans quelle mesure les différents mécanismes de réparation interagissent et interfèrent-ils entre eux ? Autant de questions dont les réponses se distillent dans les décennies passées et à venir.

En outre, l'**essentialité** des systèmes de réparation et de leur régulation est manifeste depuis la mise en évidence de leur implication dans la cancérogénèse, historiquement démontrée chez les patients Xeroderma Pigmentosum. Egalement, une défaillance de la réparation a été montrée comme étant la cause de plusieurs désordres développementaux, neurologiques ou immunitaires. La communauté scientifique continue de s'interroger sur le rôle de ces voies enzymatiques dans les maladies neurodégénératives et dans l'étiologie de cancers.

Paradoxalement, ces mêmes activités enzymatiques ont été mises en cause dans la **résistance** ou l'**hypersensibilité** de tumeurs à des traitements anti-néoplasiques. En effet, le retrait ou non des lésions nucléiques générées par radio- ou chimiothérapie a un impact important sur l'ensemble des processus métaboliques des cellules cancéreuses influençant la destruction des tissus atteints.

Une piste thérapeutique actuelle consiste à utiliser, en complément ou en remplacement des traitements actuels, des inhibiteurs des activités de la réparation impliquées dans la réponse aux thérapies.

Dans le but d'assister la recherche fondamentale et médicale, il reste important de développer de nouveaux dispositifs pour détecter spécifiquement les activités enzymatiques liées à la réparation de l'ADN. C'est précisément ce qui fait l'objet de ce travail de thèse : sur la base des méthodes de détection existantes, nos recherches se sont orientées vers le développement d'un nouvel outil de mesure des activités enzymatiques spécifiques dans la réparation par excision de base, à savoir les ADN *N*-glycosylases et les AP-endonucléases. Le dispositif mis au point combine les avantages de plusieurs développements réalisés au laboratoire : les « sondes FRET » de type *molecular beacons* [766] permettent la détection sensible de ces activités enzymatiques grâce à une sonde mono-moléculaire. La détection par fluorescence autorise une utilisation sûre, en routine, dans tout laboratoire, principale limitation de l'utilisation de la radioactivité. Les bénéfices apportés par l'immobilisation de sondes nucléiques sur support solide [771, 773] comprennent la protection des sondes dans un milieu biologique et le multiplexage des mesures. Le cahier des charges inclut la sensibilité, la spécificité et la rapidité du test, l'utilisation de matériel et d'un appareillage restreint ainsi que la possibilité de paralléliser et multiplexer les analyses dans de potentielles applications en moyen ou haut débit.

La conception et la synthèse chimique des sondes nucléiques poly-modifiées est une étape clé de cette étude et sera abordée en premier lieu dans le chapitre suivant. Le chapitre III sera dédié à la mise au point de l'immobilisation de sondes fluorescentes sur billes magnétiques et à la détection de la réparation de l'ADN en solution, par spectrofluorimétrie. La transposition de cet outil à une analyse par cytométrie en flux fera l'objet du chapitre IV. Nous évoquerons les développements réalisés pour l'amélioration des sondes et de la sensibilité de cette méthode de détection. Dans le chapitre V sera détaillée une optimisation du biocapteur pour l'analyse multiplexée par cytométrie en flux des activités du BER, étendue à l'analyse plus générale de diverses enzymes hydrolysant l'ADN. Notamment, une stratégie originale basée sur l'encodage des microbilles par fluorescence sera exposée. L'étude évaluera les performances du biocapteur pour la détection d'ADN *N*-glycosylases et d'AP-endonucléases à partir de protéines purifiées et d'extraits nucléaires. Egalement, la capacité de ces outils à mettre en évidence des molécules inhibitrices de ces enzymes a été investiguée. Parallèlement à la réalisation de ces tests *in vitro*, nous avons initié une étude visant à détecter ces mêmes activités *in cellulo*. Les résultats obtenus à l'issue de ce doctorat seront commentés dans le chapitre VI. Une conclusion générale, illustrée des perspectives de l'ensemble de ces travaux, viendra clore la partie « résultats ».

II CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES SONDÉS NUCLEIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA RÉPARATION DE L'ADN

1	Conception générale des sondes.....	118
2	Séquences.....	120
3	Synthèse des oligonucléotides modifiés	123
4	Caractérisation des sondes.....	127
	4.1. <i>Par chromatographie liquide haute performance</i>	127
	4.2. <i>Par spectroscopie d'absorption UV-visible</i>	128
	4.3. <i>Par fluorescence</i>	129
	4.4. <i>Par spectrométrie de masse</i>	129

Ce chapitre décrit la synthèse des sondes élaborées pour la détection d'activités enzymatiques de la réparation de l'ADN, de leur conception à leur caractérisation.

1. Conception générale des sondes

Notre but est de détecter les activités enzymatiques impliquées dans l'initiation de la réparation par excision de base. Les tests présentés dans ce manuscrit reposent sur le même principe, à savoir, la détection du clivage d'une sonde d'ADN supportée sur billes magnétiques, généré par l'action des enzymes ciblées. En tout premier lieu, il a fallu concevoir, synthétiser, purifier et caractériser ces sondes nucléiques.

La conception des sondes utilisées dans ce travail de thèse s'inspire essentiellement des précédents travaux réalisés au laboratoire [766, 790]. Ainsi, une quinzaine de sondes différentes a été utilisée dans le travail présenté dans ce manuscrit, toujours dans une démarche d'optimisation ou d'extension de synthèses antérieures. Néanmoins, toutes présentent certaines caractéristiques générales détaillées ci-après et en Figure 24:

⇒ Les oligonucléotides présentent une structure auto-complémentaire en épingle à cheveux (« *hairpin* »). Les deux brins complémentaires sont reliés par un lien pentathymidilate (5 dT). Cette structure présente plusieurs avantages : il est clairement établi que cette configuration est beaucoup plus stable qu'un duplexe classique bimoléculaire. Aussi nous espérons observer une dégradation limitée des sondes dans des échantillons protéiques complexes, du fait de l'exposition restreinte d'extrémités nucléiques (3' ou 5') reconnues par les exonucléases. Enfin, l'étape l'hybridation intramoléculaire n'est pas dépendante de la concentration en sonde, contrairement à l'hybridation de deux brins complémentaires distincts. Ceci permettra par la suite de travailler en milieu dilué et/ou à température élevée, sans risque de perdre la complémentarité des sondes.

⇒ Ces sondes de type *hairpin* sont conçues pour être dans leur conformation fermée à 37°C. En effet, la plupart des ADN *N*-glycosylases et AP-endonucléases présentent des activités enzymatiques significativement, voire fondamentalement différentes vis-à-vis d'un substrat simple ou double brin. L'incision de la portion double brin est censée conduire à la déshybridation de l'édifice, permettant la détection de l'activité enzymatique par fluorescence.

- ⇒ La séquence double brin est composée de 15 paires de bases (pdb). Il a été montré que l'interaction de la plupart des glycosylases et AP-endonucléases avec l'ADN nécessite au minimum 10-12 pdb [491, 803]. D'autre part, l'utilisation de séquences plus longues favoriserait les interactions non spécifiques avec d'autres protéines, pouvant limiter l'action des enzymes ciblées et la spécificité du test.
- ⇒ Les lésions sont introduites à au moins 6 pdb des extrémités du double brin afin de favoriser la reconnaissance par les glycosylases [491].
- ⇒ Une extrémité du duplexe est marquée par un fluorophore dans le cas des sondes fluorescentes. Pour les sondes pro-fluorescentes, un quencher est introduit à l'autre extrémité de la partie double brin, en face du fluorophore. La détection par fluorescence a été choisie en raison de sa facilité de manipulation et de sa stabilité dans le temps, contrairement aux radioisotopes.
- ⇒ L'un des deux brins est relié à une biotine terminale *via* un espaceur hexathymidilate de façon à guider l'immobilisation de la sonde sur un support recouvert de streptavidine.

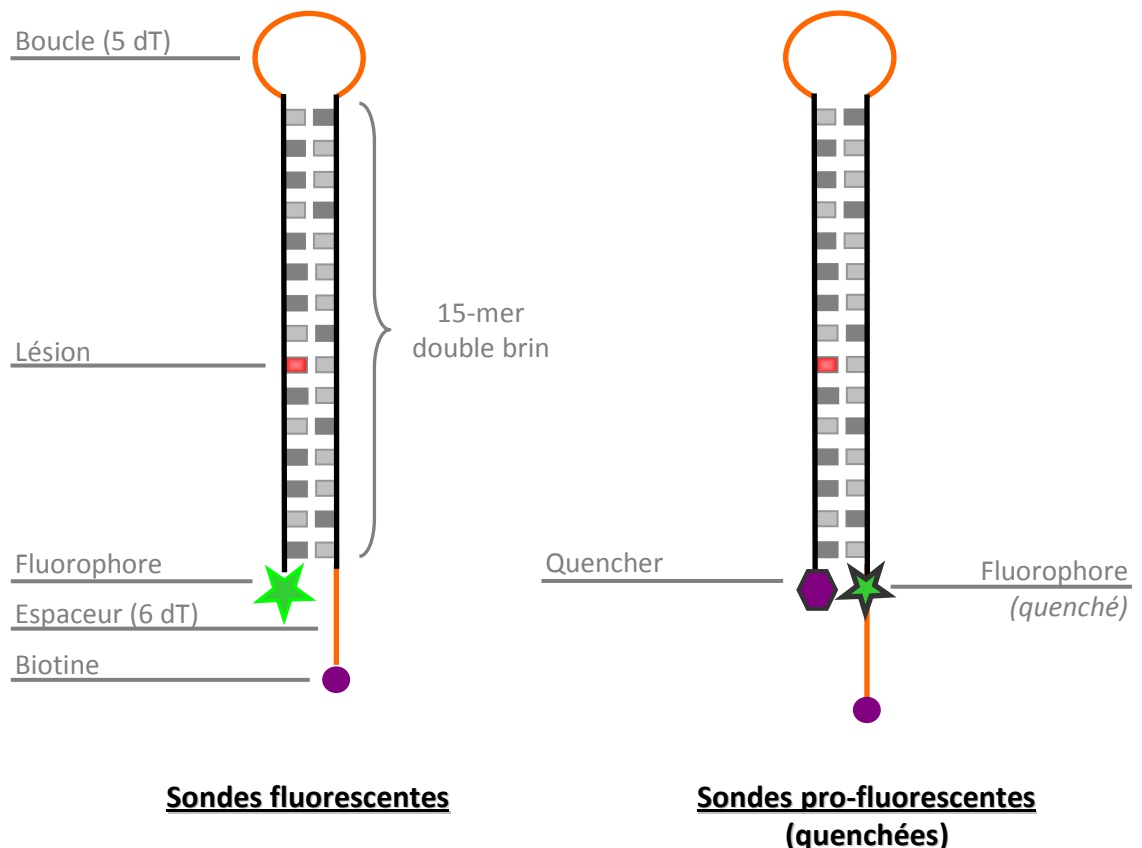


Figure 24: Représentation schématique des sondes nucléiques utilisées dans cette étude.

2. Séquences

Les séquences des oligonucléotides, ainsi que la nomenclature utilisée dans ce manuscrit sont récapitulées dans le Tableau 6, repris dans le volet en troisième de couverture. Nous distinguerons les sondes fluorescentes (*ODN-F* et *F3*) des sondes quenchées (*ODN-Q* à *Q4*). Ainsi, le suffixe qualifiant les sondes désigne à la fois le marquage (fluorophore et/ou quencher) et l'orientation des sondes (3'/5') comme suit :

- ⇒ Les sondes *ODN-F* sont biotinylées sur l'appendice en 3' et marquées par une cyanine 3 à l'autre extrémité.
- ⇒ Les sondes *ODN-Q* possèdent le groupement biotine en 5'. Le couple de chromophores cy3/dabcyl délimite les extrémités du duplexe, avec la cyanine 3 adjacente à la partie biotinylées et le dabcyl marquant l'extrémité 3'.
- ⇒ Les *ODN-Q2* diffèrent des *ODN-Q* de par l'orientation inversée des oligonucléotides. Ainsi, la biotine et le cy3 marquent le fragment 3' et le dabcyl achève la synthèse en 5'.
- ⇒ La substitution du cy3 des *ODN-Q2* par une cyanine 5 donne les séquences des *ODN-Q3*.
- ⇒ Enfin, les *ODN-Q4* sont le résultat du remplacement du dabcyl des *ODN-Q3* par le quencher BHQ2.

Outre la biotine et les chromophores employés respectivement pour l'immobilisation des sondes et la détection de leur clivage, la séquence double brin est conçue pour être substrat spécifique d'une enzyme. Ainsi, les sondes estampillées *Pst1* ou *EcoR1* possèdent dans leur séquence le site de restriction de l'enzyme correspondante (souligné dans le Tableau 6, cf. Figure 25). Les sondes *THF* contiennent dans la tige un résidu **tétrahydrofurane**. Ce motif est un analogue stable de site abasique permettant d'éviter la décomposition spontanée de ce dernier dans le cadre de l'étude des activités de réparation. Il a été démontré que le THF est reconnu efficacement par les AP-endonucléases [804]. Les sondes *Ino-F* et *Ino-Q* comportent la lésion **désoxyinosine**, issue de l'hydrolyse de l'amine exocyclique de la désoxyadénosine. Notons, que la base de ce désoxyribonucléoside est nommée hypoxanthine (Hx), résultant de la déamination de l'adénine et est donc appariée dans ce contexte à une thymine. Cette base modifiée est reconnue spécifiquement par la glycosylase monofonctionnelle Aag (« alkyl adénine glycosylase » aussi nommée MPG pour

« méthyl purine glycosylase », cf. I.5.4). La sonde *Ura-Q4* contient le produit de désamination de la cytosine, l'uracile sous forme de désoxyuridine, et appariée à une guanine. Cette lésion est excisée par les glycosylases spécifiques dont l'enzyme prépondérante monofonctionnelle UNG (« uracil *N*-glycosylase ») (cf. § I.5.2). Enfin, la lésion oxydative 8-oxoguanine est introduite à la place d'une guanine dans la sonde *8oxoG-Q4*. Cette base endommagée est reconnue principalement par les glycosylases bifonctionnelles Fpg (chez les bactéries) et Ogg1 (chez les mammifères) (cf. § I.5.3). La structure des diverses lésions utilisées est présentée dans le Tableau 5.

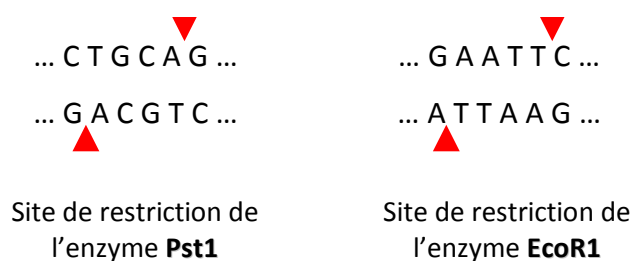


Figure 25: Sites de restriction des enzymes EcoR1 et Pst1.


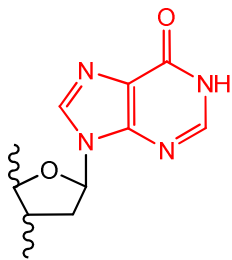
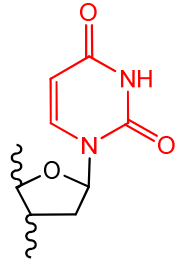
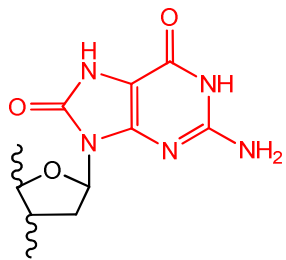
<i>THF</i>	<i>Ino</i>	<i>Ura</i>	<i>8-oxoG</i>
			
Tétrahydrofurane	2'-désoxyinosine (<i>hypoxanthine</i>)	2'-désoxyuridine (<i>uracile</i>)	8-oxo-2'-désoxyguanosine (<i>8-oxoguanine</i>)

Tableau 5: Structures des lésions introduites au sein des sondes substrats lors de synthèse chimique.

Nomenclature		Séquences	Schémas
ODN-F	<i>Pst1-F</i>	5' TCy3TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>THF-F</i>	5' TCy3TGAAC <u>FGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>EcoR1-F</i>	5' TCy3TGAAGAATTCCTCCT 3' Biot TTTTTTACTTCTTAAGGAGGA	
	<i>Ino-F</i>	5' TCy3TGAAGA I TTCCTCCT 3' Biot TTTTTTACTTCTTAAGGAGGA	
ODN-Q	<i>Pst1-Q</i>	5' Biot TTTTTTCy3TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Dab ACTTG <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>THF-Q</i>	5' Biot TTTTTTCy3TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' DabACTTG <u>FCGTCGAGGA</u>	
	<i>Ino-Q</i>	5' Biot TTTTTTCy3TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Dab ACTTG I CGTCGAGGA	
ODN-Q2	<i>Pst1-Q2</i>	5' DabTGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy3ACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>THF-Q2</i>	5' DabTGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy3ACTTG <u>FCGTCGAGGA</u>	
ODN-F3	<i>Pst1-F3</i>	5' TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
ODN-Q3	<i>Pst1-Q3</i>	5' DabTGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>THF-Q3</i>	5' DabTGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTTG <u>FCGTCGAGGA</u>	
ODN-Q4	<i>Pst1-Q4</i>	5' BHQ-2TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTT <u>GACGTCGAGGA</u>	
	<i>THF-Q4</i>	5' BHQ-2TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTTG <u>FCGTCGAGGA</u>	
	<i>Ura-Q4</i>	5' BHQ-2TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTTGA <u>UGTCGAGGA</u>	
	<i>8oxoG-Q4</i>	5' BHQ-2TGA <u>ACTGCAGCTCCT</u> 3' Biot TTTTTTCy5ACTTGAC <u>G</u> TCGAGGA	

Tableau 6: Séquences, nomenclature et représentation schématique des sondes nucléiques utilisées dans la présente étude.

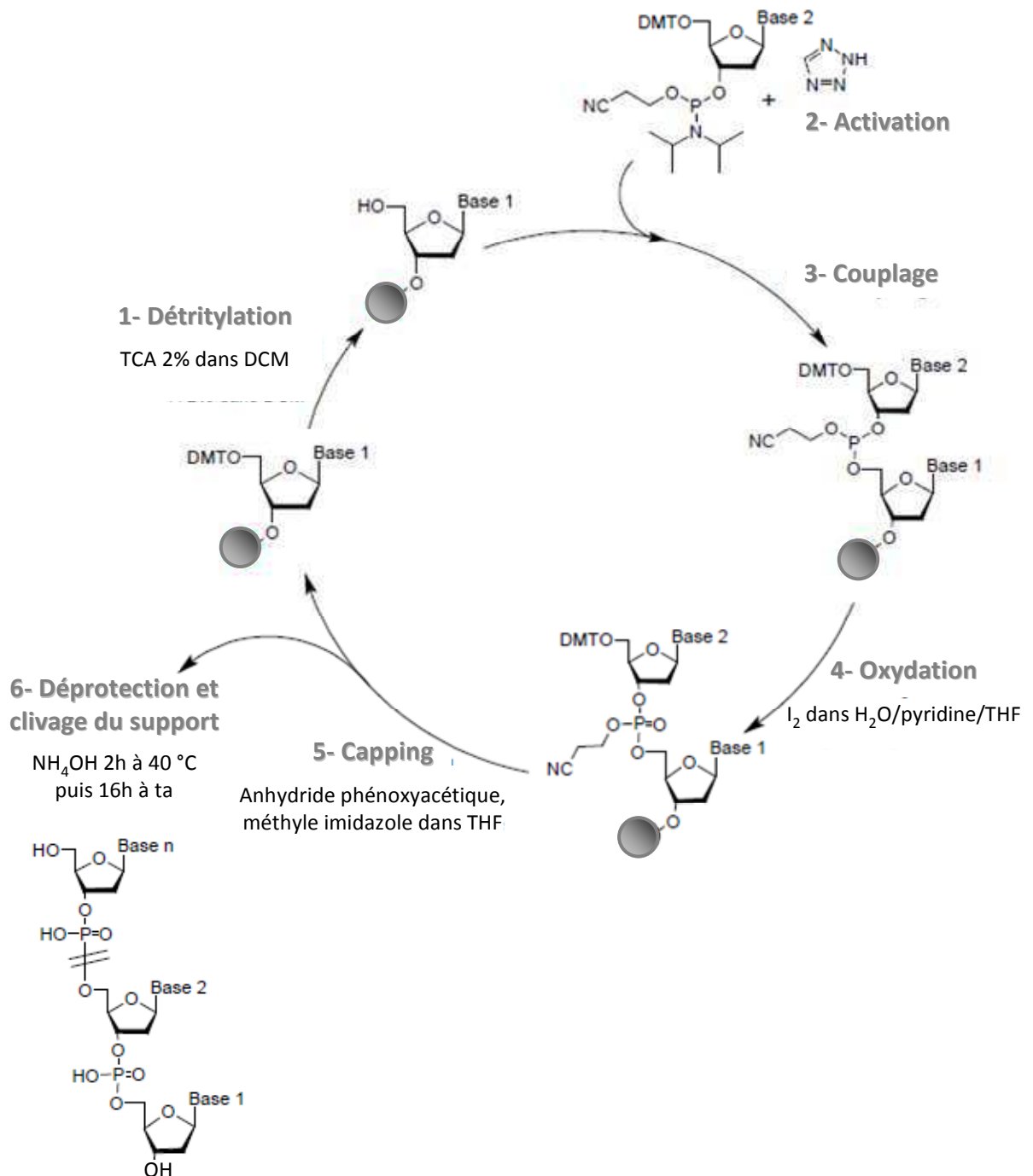
3. Synthèse des oligonucléotides modifiés

Figure 26: Cycle de condensation pour la synthèse automatisée d'ADN sur support solide par la voie phosphoramidite.

Les oligonucléotides (ODN) ont été synthétisés sur support solide de type CPG par la voie phosphoramidite automatisée [805, 806]. Les détails des protocoles de synthèse et de déprotection sont donnés dans le chapitre VII.1. La formation du lien phosphotriester est réalisée par condensation de la fonction 5'-hydroxyle (sur le support) sur un nucléotide 3'-phosphoramidite. De ce fait la synthèse itérative sur support nécessite l'emploi de synthons protégés. Certains nucléotides modifiés ou fluorophores étant instables dans les conditions classiques de déprotection (hydroxyde d'ammonium concentré, 16 h, 60°C), nous avons utilisés des groupements protecteurs plus labiles en conditions basiques. Ainsi, les amines exocycliques des guanines, adénines et cytosines sont protégées par des groupements phénoxyacétyle (PAC). L'oxygène du phosphoramidite est protégé par un groupement cyanoéthyle (CNE). Il est important de préciser que les nucléotides lésés, les chromophores et la biotine (sous forme biotine triéthylèneglycol) sont également introduits par voie phosphoramidite ce qui permet de contrôler précisément leur position au sein de la séquence. La cyanine 3 (Cy3) est disponible commercialement²⁵ et présente une extrémité phosphoramidite et une extrémité hydroxylée, mimant respectivement l'orientation 3' et 5' des synthons nucléosidiques. Notons que l'hydroxyle est protégé par un monométhoxytrityle (MMT) qui se déprotège dans les mêmes conditions que le DMT. Le quencher dabcyI (4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoic acid, succinimidil ester) est introduit à l'extrémité 5' sous forme de nucléoside modifié (dabcyI-dT²⁶) ou à l'extrémité 3' directement couplé au support CPG. Le quencher BHQ2 (*Black Hole Quencher 2*) est introduit en fin de synthèse comme terminateur de chaîne. En effet, le réactif commercial²⁷ ne présente pas de fonction hydroxyle additionnelle permettant de poursuivre la synthèse automatisée. Les structures de ces divers composés sont présentées en Figure 27, ci-après.

²⁵ 1-[3-(4-monométhoxytrityloxy)propyl]-1'-[3-[(2-cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl)phosphoramidite]propyl]-3,3,3',3'-tétraméthylindocyanine chlorure (Glen Research, Sterling, VIRGINIE USA)

²⁶ 5'-Diméthoxytrityloxy-5-[(N-4'-carboxy-4-(diméthylamino)-azobenzène)-aminohexyl-3-acrylimido]-2'-désoxyUridine-3'-[(2-cyanoéthyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite (Glen Research, Sterling, VIRGINIE USA)

²⁷ 4'-(4-Nitro-phényldiazo)-2'-méthoxy-5'-méthoxy-azobenzène-4''-(N-éthyl)-N-éthyl-2-cyanoéthyl-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite (Glen Research, Sterling, VIRGINIE USA)

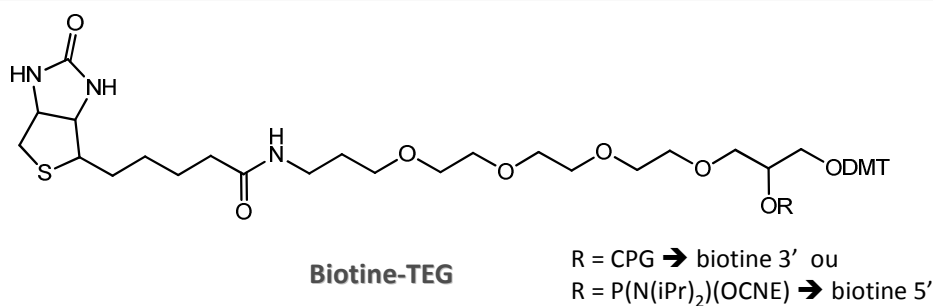
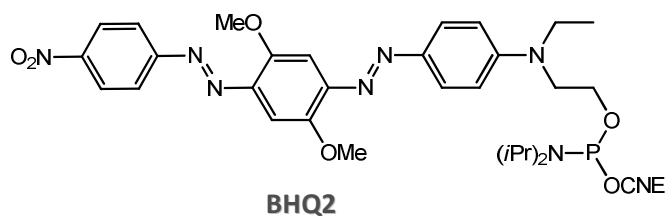
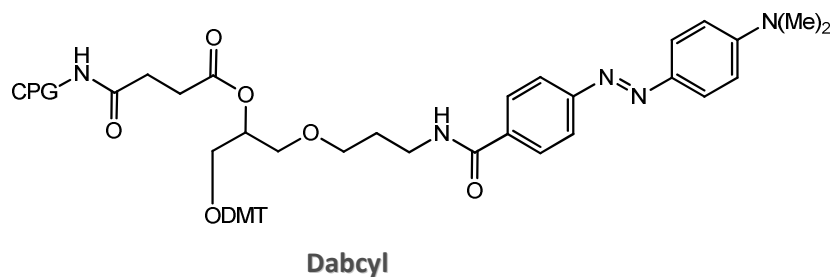
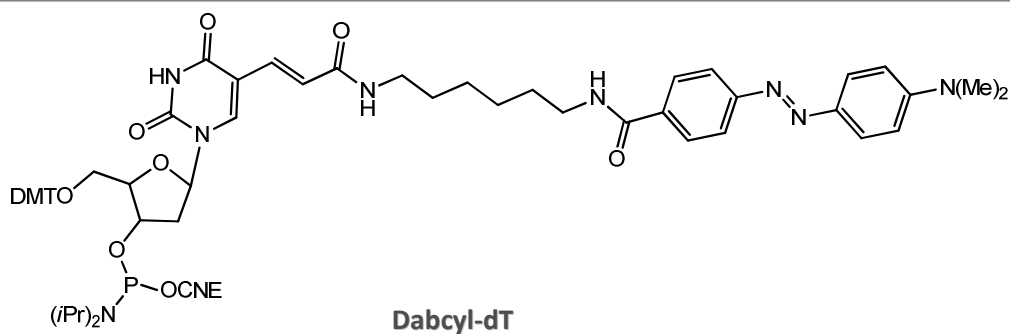
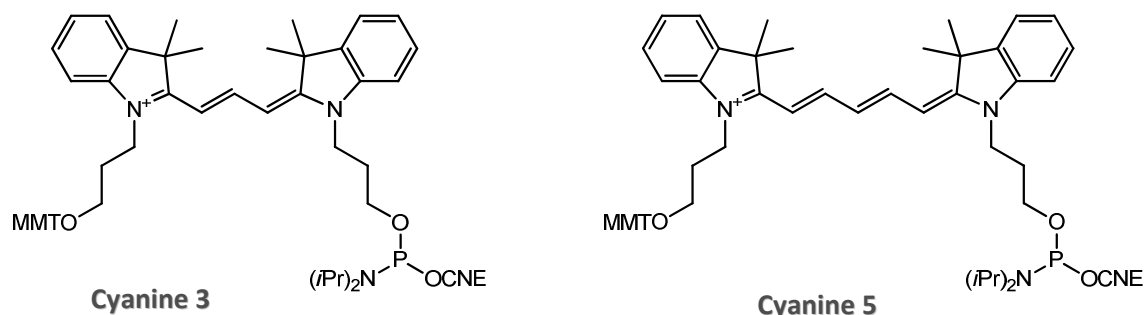


Figure 27: Structures chimiques des synthons phosphoramidites utilisés pour la fonctionnalisation des sondes.

Le cycle de condensation des synthons par la voie des phosphoramidites peut être décomposé en 5 étapes (Figure 26).

- 1) **La détritylation de la fonction alcool en 5'** protégée par un groupement diméthoxytrityle (DMT). Seules les cyanines sont protégées par un monométhoxytrityle (MMT). Ces groupements protecteurs sont labiles en milieu acide permettant leur déprotection sélective avec une solution à 2 % d'acide trichloroacétique dans du dichlorométhane.
- 2) **L'activation du phosphoramidite** par une solution de tétrazole 0.1 M : cet activateur agit d'abord comme un acide pour protoner l'azote du groupe partant aminé. Ensuite la forme acide du tétrazole substitue l'isopropylamine protonnée pour former une espèce tétrazolium hautement réactive.
- 3) **Le couplage internucléosidique**: l'intermédiaire tétrazolide subit une attaque nucléophile de l'alcool primaire 5' formant ainsi un phosphite. Notons qu'en pratique, les étapes 2 et 3 sont réalisées simultanément.
- 4) **L'oxydation du phosphite**: Cet intermédiaire trivalent étant instable, il est primordial de réaliser l'oxydation de celui-ci en phosphate pentavalent lors de chaque cycle. La réaction est conduite dans une solution d'iode à 0.1 M.
- 5) **Le capping** : les fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi lors du couplage sont désactivées par estérification. Il est préférable d'utiliser une solution d'anhydride phénoxyacétique plutôt que de l'anhydride acétique communément utilisé afin d'éviter la transamidation des amines exocycliques protégées par ce réactif (la transamidation avec l'anhydride phénoxyacétique forme le même composé).

L'élongation de l'oligonucléotide se poursuit par répétitions des étapes 1 à 5 autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention de la séquence désirée. Le rendement de chaque étape est estimé par une lecture de l'absorbance du cation DMT à 498 nm suite à la détritylation. Ainsi, le rendement de chaque étape est de 97-98 %. Les chromophores possèdent parfois une réactivité réduite expliquant des rendements plus faibles à l'origine de la chute du rendement global. Pour compenser ces pertes de rendements, le temps de couplage est augmenté et/ou un second couplage est réalisé (l'activateur et le phosphoramidite sont réinjectés sans capping ni détritylation préalables). En fin de synthèse, le clivage du support et la déprotection des bases et des phosphotriesters sont réalisés en une unique étape en incubant la phase dans une solution aqueuse d'hydroxyde d'ammonium à 30 %, 16 heures, à température ambiante.

Les oligonucléotides fluorescents ont été purifiés directement par HPLC. Les sondes quenchées en revanche sont prépurifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (détection visuelle). Les bandes correspondant aux produits attendus sont découpées puis les oligonucléotides sont élués dans l'eau. L'éluât est concentré et dessalé par chromatographie d'exclusion avant d'être,

in fine, purifié par HPLC. Les détails de la purification des sondes est disponible dans le chapitre VII Matériels et Méthodes.

4. Caractérisation des sondes

4.1. *Par chromatographie liquide haute performance*

Une fois purifiées, les sondes sont contrôlées par une HPLC analytique couplée à une détection par absorbance. L'ADN est visualisé à 260 nm, le dabcyI à 453 nm et le BHQ2 à 579 nm. Un fluorimètre en ligne permet également la détection des fluorophores ($\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 563 \text{ nm}$ pour le cy3 et $\lambda_{\text{exc}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$ pour le cy5). Les chromatogrammes pour les sondes Pst1, présentés en Figure 28 et Annexe 1, révèlent une pureté supérieure à 95 %.

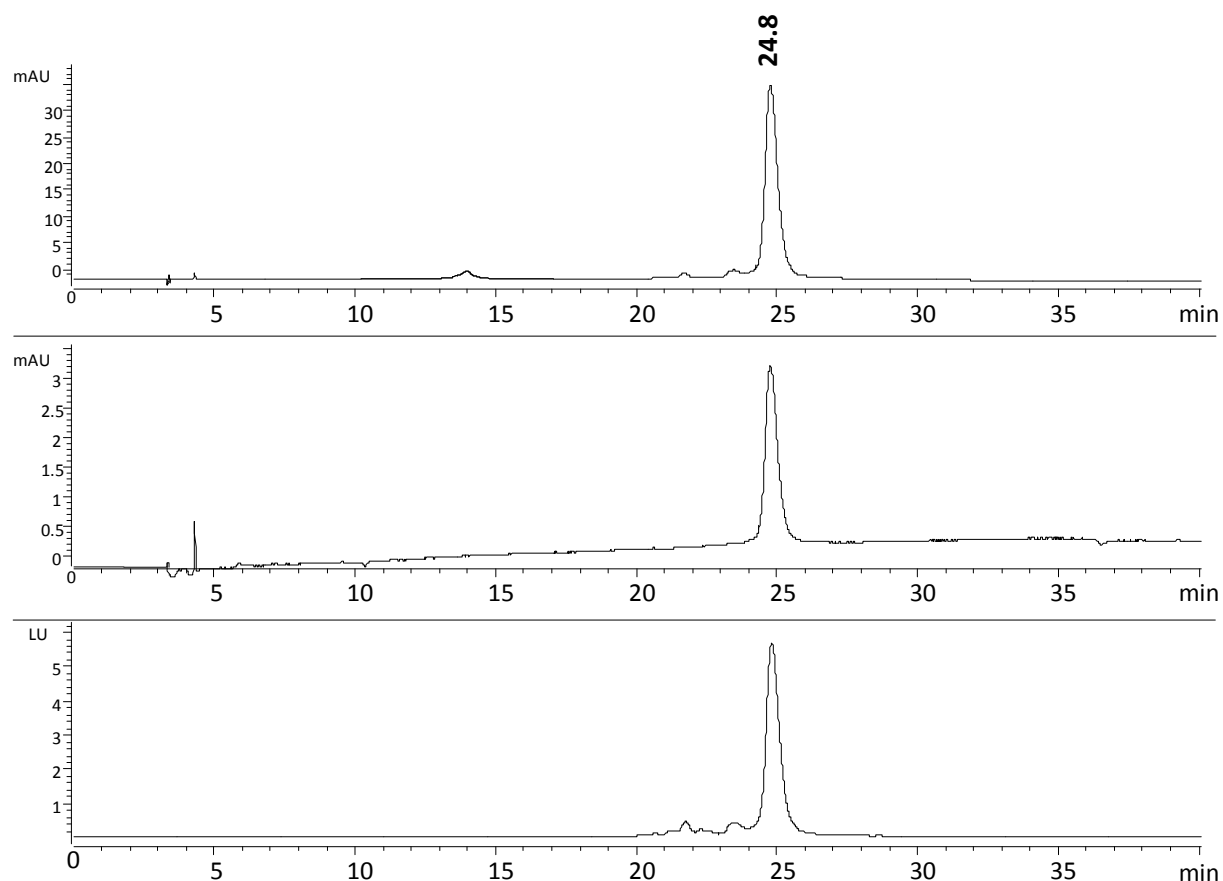


Figure 28: Profil chromatographique de la sonde *Pst1-Q* analysée par HPLC en phase inverse (colonne C18 250 x 4.60 mm, 5 μm , 50°C; gradient 0-35 % ACN dans TEAA 10 mM en 40 min) : détection en absorbance à 260 nm (haut), à 453 nm (milieu) et en fluorescence (bas, $\lambda_{\text{exc}} = 546 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 563 \text{ nm}$).

4.2. Par spectroscopie d'absorption UV-visible

Un spectre d'absorbance UV-visible vient compléter la caractérisation des sondes (cf. Figure 29). Ainsi pour chaque oligonucléotide, la présence des chromophores a pu être vérifiée. Chaque spectre présente plusieurs maximums d'absorbance. Le signal à 260 nm correspondant à l'absorbance des bases puriques et pyrimidiques (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$). Le triple signal observé autour de 550 nm pour *Pst1-F* et à 650 nm pour *Pst1-F3* correspond aux énergies de transitions entre l'état fondamental et les différents niveaux vibrationnels de l'état excité des cyanines. Ce signal caractéristique confirme l'incorporation du marqueur fluorescent. Dans le cas des sondes quençhées, les larges signaux autour de 450 et 580 nm témoignent de la présence du quençher dabcyll ou BHQ2, respectivement.

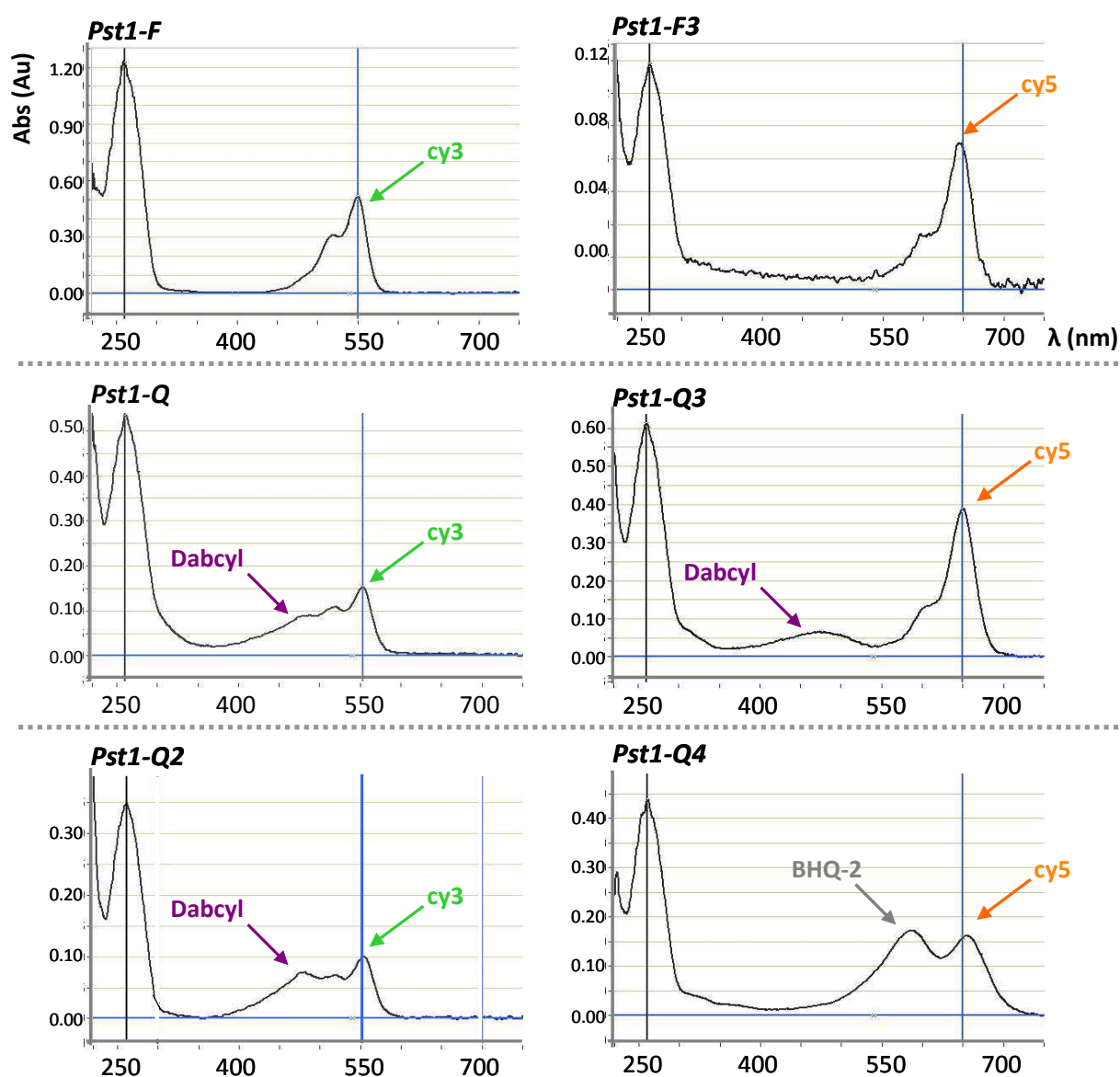


Figure 29: Spectres d'absorbance UV-visible enregistrés pour les sondes *Pst1* fluorescentes et quençhées.

4.3. Par fluorescence

L'intégrité du fluorophore et le quenching des sondes sont évalués par la mesure de l'émission de fluorescence des oligonucléotides *Pst1*. Pour cela, des solutions 1 μM sont préparées dans le tampon d'hybridation (« Binding & Washing », cf. Matériels et Méthodes). Un cycle d'hybridation (2 min, 90°C puis retour lent à t.a.) est réalisé afin de s'assurer de la structure double brin des *hairpins*. L'émission de fluorescence est alors analysée à 563 nm pour les sondes *F*, *Q* et *Q2* et à 665 nm pour les sondes *F3*, *Q3* et *Q4* (Figure 30). La superposition des signaux obtenus pour les sondes marquées par la cyanine 3 démontre l'émission de fluorescence effective de la sonde *Pst1-F* et le quenching efficace de ce marqueur par le dabcyI (sondes *Pst1-Q* et *Q2*). De même, le signal enregistré pour la sonde *Pst1-F3* confirme l'incorporation et l'intégrité de la cyanine 5. L'efficacité de quenching de la sonde *Pst1-Q3* est de 75 %. En revanche, le quenching du cy5 par le BHQ2 (*Pst1-Q4*) est beaucoup plus efficace et quasi quantitatif (> 99 %).

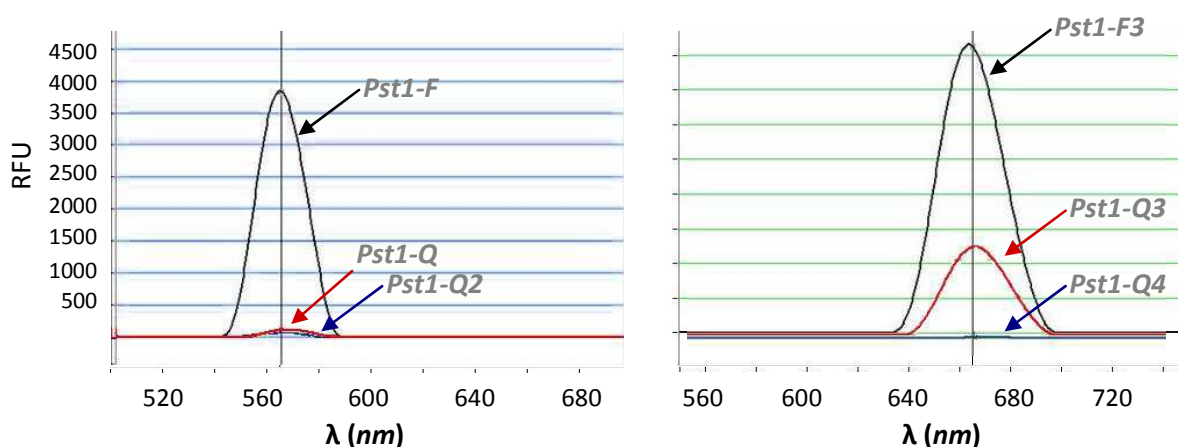
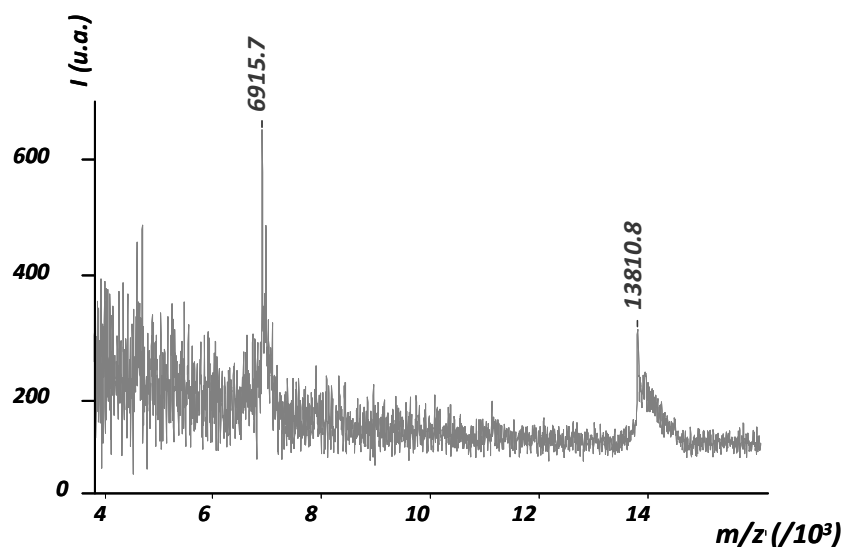


Figure 30: Signal d'émission de fluorescence des sondes *Pst1* fluorescentes et quenchées : sondes marquées par la cyanine 3 (gauche) et par la cyanine 5 (droite) : excitation en lumière blanche.

4.4. Par spectrométrie de masse

La structure chimique des sondes est vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Les spectres obtenus pour chaque sonde présentent 2 pics (Figure 31). Le premier ($m/z = 13810,8$ Da pour *THF-F*) correspond au produit désiré (avec $z = 1$). Le second ($m/z = 6915.8$ Da) correspond à l'ion pseudo-moléculaire bi-chargée ($z = 2$). Les masses théoriques sont très proches de celles obtenues expérimentalement, validant ainsi la structure de ces sondes (cf. Figure 31).



Sonde	M théorique (Da)	M obtenue (Da)
<i>Pst-F</i>	13934.4	13939.1
<i>EcoR1-F</i>	13930.5	13930.5
<i>THF-F</i>	13810.3	13810.8
<i>Ino-F</i>	13933.5	13934.4

Figure 31: Spectre de masse MALDI-ToF (mode linéaire négatif) de la sonde *THF-F* et tableau des masses théoriques et obtenues pour les *ODN-F*.

La fonctionnalité des sondes fluorescentes a été évaluée par digestion enzymatique avec chaque enzyme cible purifiée. 50 pmol des sondes *Pst1-F* et *EcoR1-F* sont incubées avec l'enzyme de restriction correspondante. La sonde *THF-F* est digérée par l'AP-endonucléase 1 (APE1) et la sonde *Ino-F* est digérée avec l'AAG humaine (hAAG) en présence ou non d'APE1. Les produits de digestion sont finalement analysés par MALDI-ToF, après dessalage et élimination des protéines par chromatographie sur Zip-Tip (Figure 32). Ainsi, les masses des oligonucléotides obtenues après digestion correspondent aux masses théoriques attendues. Les activités endonucléases de EcoR1, Pst1 et APE1 génèrent des extrémités 3'-OH et 5'-phosphate.

Sonde (enzyme)	Produits de digestion			
	➔ = incision	OH = extrémité hydroxyle	Ⓟ = extrémité phosphate	
EcoR1-F (EcoR1)	5' T Cy3 TGAAG ↓ Ⓟ <u>AATTCCTCCTTTTTAGGAGG</u> ↓ Ⓟ AATTCCTTCATTTTTT TEGBiot 3'	Mth = 2338.8 Mobt = 2338.5	Mth = 6482.1 Mobt = 6484.4	Mth = 5147.5 Mobt = 5150.3
Pst1-F (Pst1)	T Cy3 TGA ACTGCA ↓ Ⓟ <u>GCTCCTTTTTAGGAGCTGCA</u> ↓ Ⓟ <u>GTTCA</u> TTTTTT TEGBiot	Mth = 3534.6 Mobt = 3535.2	Mth = 6483.1 Mobt = 6483.7	Mth = 3952.8 Mobt = 3954.0
THF-F (APE1)	T Cy3 TGAAC ↓ Ⓟ <u>THF</u> GCAGCTCCTTTTTAGGAGCTGCAGTTCATTTTTT TEGBiot	Mth = 2298.8 Mobt = 2298.1	Mth = 11539.6 Mobt = 11727.6	
Ino-F (AAG)	T Cy3 TGAAGA AP <u>TTCCTCCTTTTTAGGAGGAATTCTTCATTTTTT</u> TEGBiot		Mth = 13815.3 Mobt = 13811.3	
Ino-F (AAG/APE1)	T Cy3 TGAAGA ↓ Ⓟ AP <u>TTCCTCCTTTTTAGGAGGAATTCTTCATTTTTT</u> TEGBiot	Mth = 2652.0 Mobt = 2651.9	Mth = 11181.6 Mobt = 10938.8 (perte du dRP)	

AP
(forme hémiacétal)

\rightleftharpoons

AP
(forme aldéhydique)

$\xrightarrow{\beta\text{-élimination}}$

dRP

+
Ⓟ-R

Figure 32: Résultats de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF (en mode linéaire négatif) de la digestion enzymatique des *ODN-F* : présentation des masses théoriques attendues et des masses obtenues. La double digestion de la sonde *Ino-F* conduit *in fine* à la décomposition du site abasique par β -élimination (en bas).

III DETECTION D'ACTIVITES DE REPARATION PAR EXCISION DE BASE PAR SPECTROFLUORIMETRIE

1	Principe	134
2	Choix du matériel et de la chimie de greffage	135
3	Fonctionnalisation des billes magnétiques	136
	3.1. Calibration du spectrofluorimètre.....	136
	3.2. Immobilisation des sondes sur billes magnétiques commerciales.....	137
	3.3. Fonctionnalité des sondes supportées	138
4	Applications à l'étude de la réparation de l'ADN	140
	4.1. Activités d'enzymes purifiées.	140
	4.2. Détection d'activités du BER au sein d'extraits nucléaires.....	142
	4.3. Etude d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN.....	147
5	Conclusion et Limitations	149

1. Principe

Dans ce chapitre est exposé un nouveau test de détection d'activités de la BER en solution. L'outil mis au point dans ce but est composé de sondes nucléiques lésées, substrats d'une activité enzymatique spécifique. Ces sondes sont modifiées par un fluorophore terminal et immobilisées par l'autre extrémité sur des microbilles magnétiques. L'activité de réparation conduit à l'incision du double brin d'ADN et au relargage d'un fragment nucléique fluorescent dans le surnageant. La fluorescence de ce dernier est mesurée dès la fin de la digestion par un spectrofluorimètre qui permet la quantification du clivage enzymatique Figure 33.

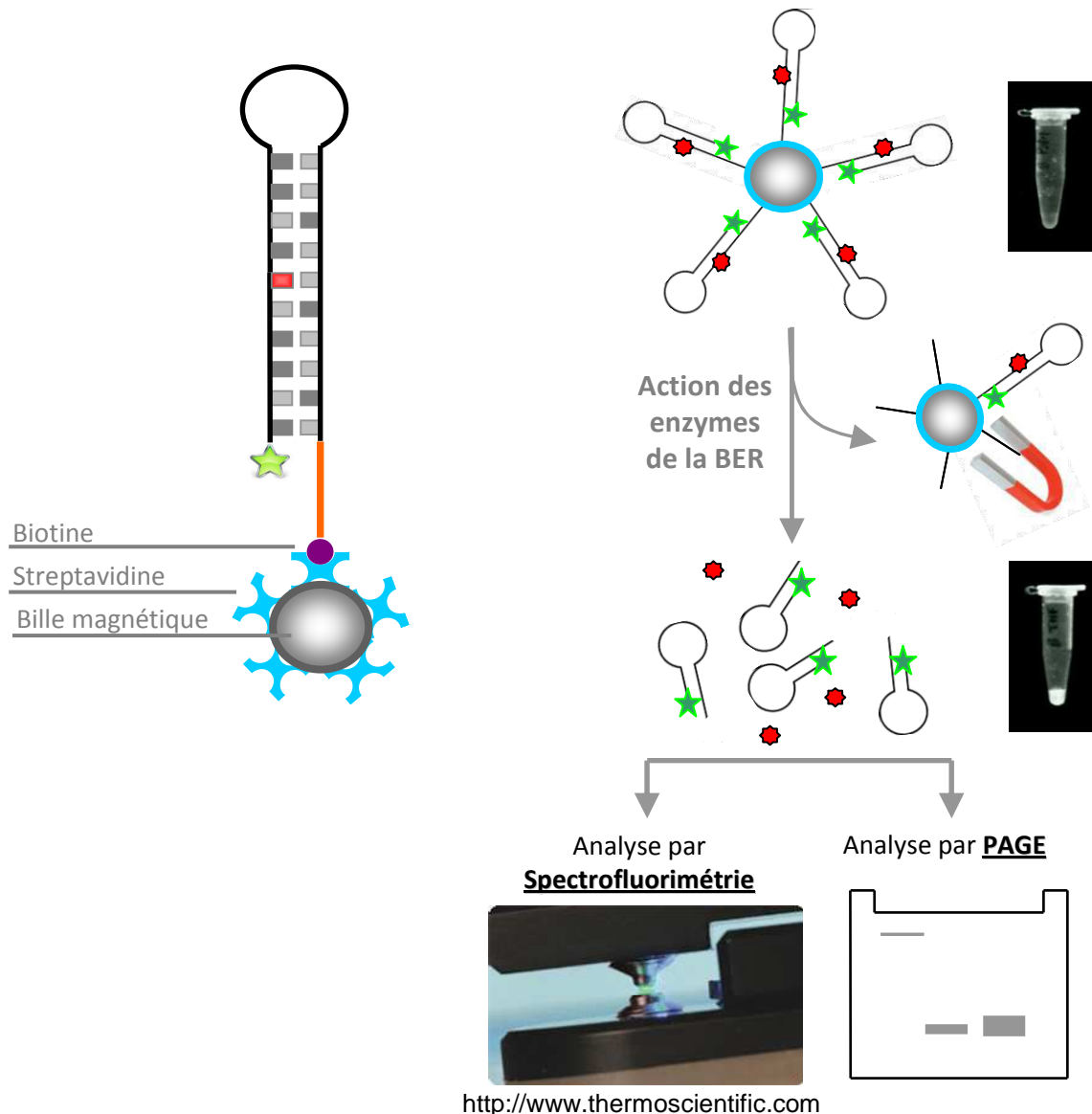


Figure 33: Principe de la détection par spectrofluorimétrie du clivage induit par les enzymes de la réparation par excision de base : les microbilles recouvertes de streptavidine sont fonctionnalisées par les sondes fluorescentes (ODN-F) biotinylées. L'incision du duplexe conduit à la libération du fragment fluorescent en solution. Le surnageant est finalement analysé par un spectrofluorimètre en goutte, puis par électrophorèse sur gel de polyacrylamide employée comme technique de référence

2. Choix du matériel et de la chimie de greffage

Le choix du support a été la première étape dans le développement des différents tests exposés dans le présent manuscrit. Un outil de prédilection aujourd'hui largement utilisé dans le domaine des biotechnologies est la biopuce qui consiste à greffer les différentes sondes en des sites définis sur une petite surface composée de verre, de silicium ou de plastique [807]. Le développement d'une telle biopuce a fait l'objet de travaux antérieurs réalisés au laboratoire. Elle se compose d'une lame de verre portant des fonctions azotures sur laquelle sont « spottées » des sondes fluorescentes de type *hairpin*, modifiées par un alcyne primaire terminal. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I) [808, 809] permet le greffage sélectif, quantitatif et en une étape des sondes. Ce biocapteur présente de nombreux avantages : il autorise la parallélisation et le multiplexage des analyses et utilise des volumes réduits d'échantillons. Bien que cette biopuce ait démontré son efficacité pour la mesure d'activités glycosylases et AP-endonucléases, sa préparation multi-étape est longue et son utilisation nécessite du matériel spécifique (spotter, scanner,...), disponible dans peu de laboratoires.

Un système similaire de sondes substrats supportées sur microbilles permettrait d'assouplir les procédures de fonctionnalisation du support et d'augmenter la versatilité de l'outil. Une étude préliminaire a été conduite au laboratoire reposant sur la synthèse *in situ* de *molecular beacons* sur les microbilles de verre à porosité contrôlée (« Control Pore Glass », CPG) classiquement utilisée en synthèse automatisée d'oligonucléotides. Cette conception intéressante combine directement la synthèse supportée des sondes nucléiques à l'utilisation du support comme outil de mesure d'activités de coupure de l'ADN. L'absence d'étape de purification, bien que simplifiant l'utilisation de ce système, introduit un facteur variable supplémentaire provenant du rendement final des synthèses. Aussi, le diamètre important (65 μm) implique une quantification fastidieuse de celles-ci sous microscope, en raison de leur sédimentation rapide, excluant une analyse automatisée.

Inspirés de l'ensemble de ces développements, nous nous sommes orientés vers la fonctionnalisation de microbilles par les sondes substrats fluorescentes, purifiées (cf. Chapitre III). Nous avons opté pour l'immobilisation rapide et simple de sondes biotinylées sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Cette fonctionnalisation n'utilise aucun réactif et est quasi irréversible, à l'instar d'un greffage covalent ($K_{d \text{ strepta/biot}} = 10^{-15} \text{ M}^{-1}$) [810]. Ainsi, l'interaction entre la biotine et la streptavidine ne peut être rompue que dans des conditions extrêmes de température et de force ionique, souvent dénaturantes. Les billes commerciales Dynabeads M-280 Strepta (*Life technologies*) ont été utilisées dans ce premier développement (notées billes "D"). Elles ont un diamètre de 2.8 μm et ne sédimentent que très lentement. En outre la coquille de silice est recouverte d'une monocouche de streptavidine garantissant la reproductibilité de l'étape de

fonctionnalisation par les sondes nucléiques et favorisant l'accessibilité de ces dernières aux enzymes. D'autre part, le cœur ferromagnétique permet le culottage rapide des billes grâce à un aimant tout en empêchant leur agglomération en champ magnétique nul.

3. Fonctionnalisation des billes magnétiques

3.1. Calibration du spectrofluorimètre

Le développement d'un test simple et rapide de détection d'activités de coupure de l'ADN, est rendu possible par l'emploi d'un spectrofluorimètre en goutte (Nanodrop ND-3300, *ThermoScientific*). Cet appareil permet l'analyse non destructive d'un échantillon en quelques secondes et ne nécessitent que 2 μ L de solution pour former un trajet optique de 1 mm.

Afin de permettre une mesure quantitative de la concentration des sondes marquées par la cyanine 3 en solution, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage à partir de différentes dilutions de la sonde *EcoR1-F* (cf. Figure 34). Les résultats montrent que le signal de fluorescence est proportionnel à la concentration en oligonucléotide dans la gamme de concentrations étudiée. Une régression linéaire permet d'obtenir simplement l'équation de cette droite, utilisée par la suite pour le calcul des concentrations de sondes :

$$y = 4.16 x \text{ avec } y = \text{signal ND-3300 en unités de fluorescence relative (RFU) et } x = [\text{ODN cy3}] \text{ en nM}$$

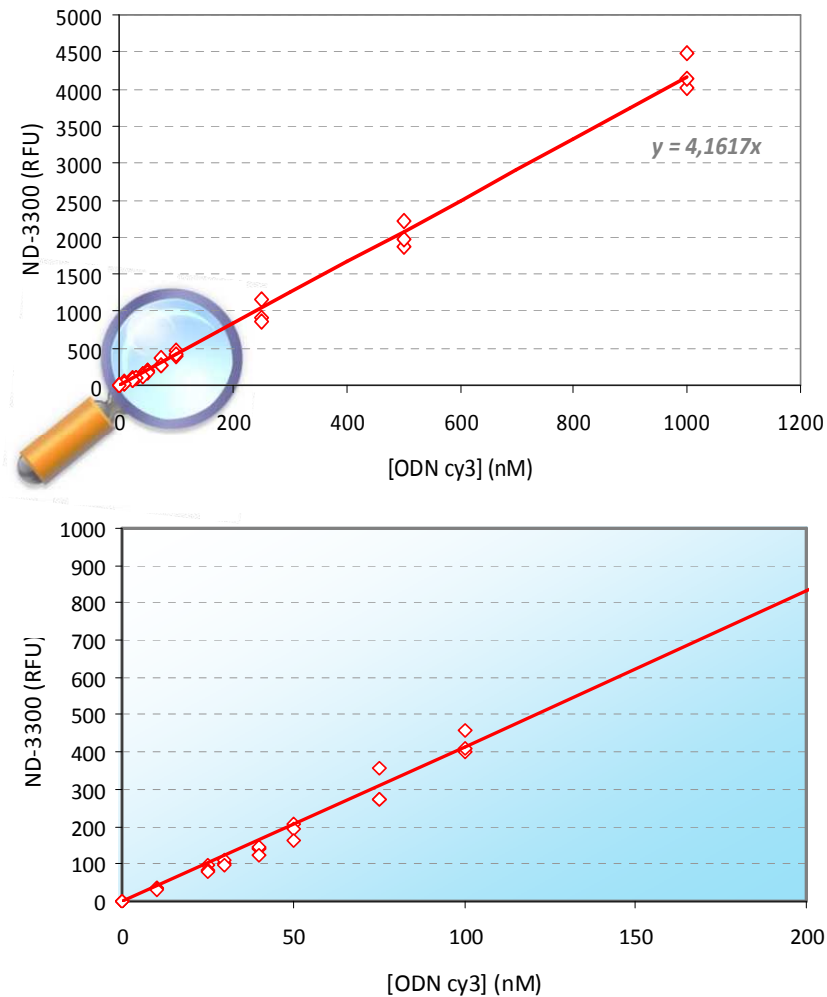


Figure 34 : Courbe de calibration du fluorimètre en goutte obtenue pour la sonde *EcoRI-F*.

3.2. Immobilisation des sondes sur billes magnétiques commerciales

Le ratio oligonucléotides/billes a été préalablement évalué. Pour cela, nous avons déterminé la quantité de billes nécessaire à l'immobilisation de 10 pmol de sondes fluorescentes (Figure 35a). 60 μ L de sondes (167 nM) sont mis en présence d'une quantité variable de microbilles Dynabeads M-280-Strepta. La fluorescence résiduelle du surnageant est analysée par spectrofluorimétrie après une heure d'incubation à température ambiante. Le taux d'immobilisation est calculé à partir de la courbe de calibration exposée précédemment. On observe que le taux de fixation des sondes pour 75 μ g de billes est inférieur de seulement 4 % au taux d'immobilisation pour 100 μ g de billes. Pour la suite des expériences, il a été choisi d'utiliser une quantité intermédiaire de billes fixée à 90 μ g pour 10 pmol de sondes. Dans ces conditions, les sites de fixation des streptavidines disponibles en surface sont saturés par les ODN biotinylées. Ce paramètre a été jugé comme essentiel pour la

reproductibilité des expériences de digestions enzymatiques. A cette étape, il a été estimé que chaque bille supporte approximativement 10^6 oligonucléotides de type *hairpin*. Cette valeur est en accord avec les $1.85 \cdot 10^6$ ODN simple brin par bille donnés par le fournisseur.

Le temps nécessaire à la fixation des sondes sur les particules a été défini. Pour cela la cinétique d'immobilisation des oligonucléotides *Pst1-F* et *EcoR1-F* a été réalisée par suivi de la fluorescence résiduelle au cours du temps (12 pmol de sondes pour 100 μ g de Dynabeads ; Figure 35b). L'interaction biotine/streptavidine est extrêmement rapide. Ainsi, dès 5 minutes d'incubation, la grande majorité des sondes est supportée. Le taux d'immobilisation est stable après 45 minutes. Pour des raisons pratiques, le temps d'immobilisation finalement retenu est de 60 minutes, permettant la fixation répétable et reproductible des différentes sondes.

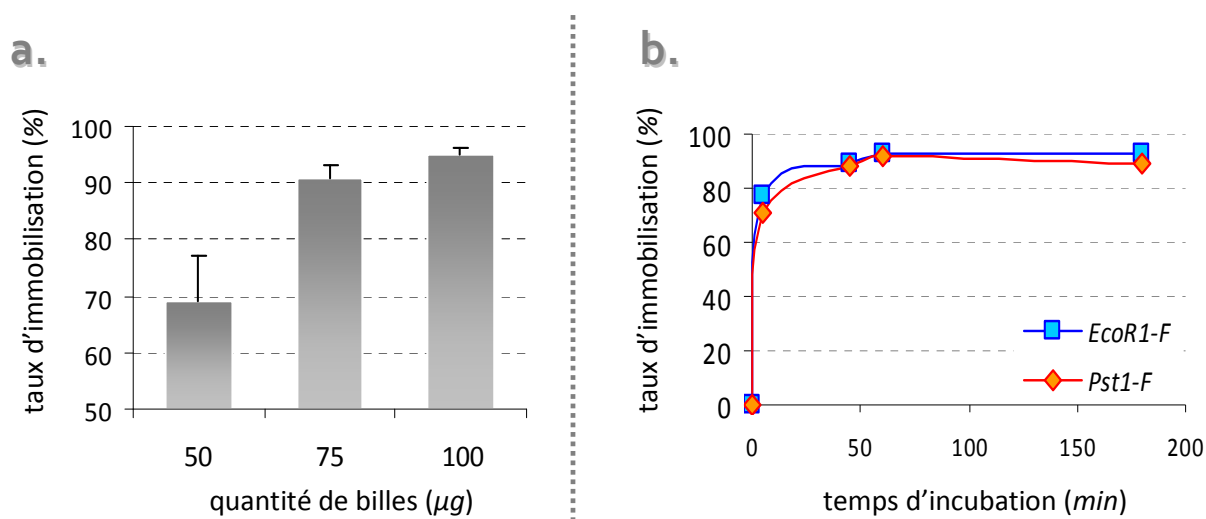


Figure 35: Caractérisation de l'immobilisation des sondes nucléiques biotinylées sur microbilles. a) Quantification du taux d'immobilisation de 10 pmol de sonde *EcoR1-F* en fonction de la quantité de billes; b) Cinétique d'immobilisation de 12 pmol de sondes fluorescentes sur 100 μ g de billes D.

3.3. Fonctionnalité des sondes supportées

Les séquences des oligonucléotides non lésées *EcoR1-F* et *Pst1-F* contiennent dans la partie duplexe auto-complémentaire, les sites de restriction des enzymes Pst1 et EcoR1 respectivement (cf. Figure 25). Afin d'apprécier les propriétés de l'outil, concernant notamment l'accessibilité des sites de restriction aux enzymes correspondantes, 1 pmol de sondes en solution ou supportées est incubée avec 10 unités de protéines. La même expérience a été conduite avec la sonde *Ino-F*. En effet, il a été montré que cette lésion n'a pas d'influence sur l'activité d'EcoR1 [811]. L'analyse de la coupure des sondes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide révèle que 82-90 % des sondes oligonucléotidiques sont clivées par l'enzyme de restriction en solution (Figure 36a). Notons que le

produit de coupure simple brin du coté 3' de la tige est plus important pour la sonde *Ino-F* que pour les sondes non lésées. Pour étudier l'excision de cette lésion, celle-ci remplace l'adénosine contenu dans le site de restriction de *EcoR1*, alors que dans les travaux de Doi et al. [811], elle remplace une guanosine. Ainsi, il semble probable que dans ce contexte, l'hypoxanthine entrave de façon non négligeable l'activité de l'enzyme de restriction.

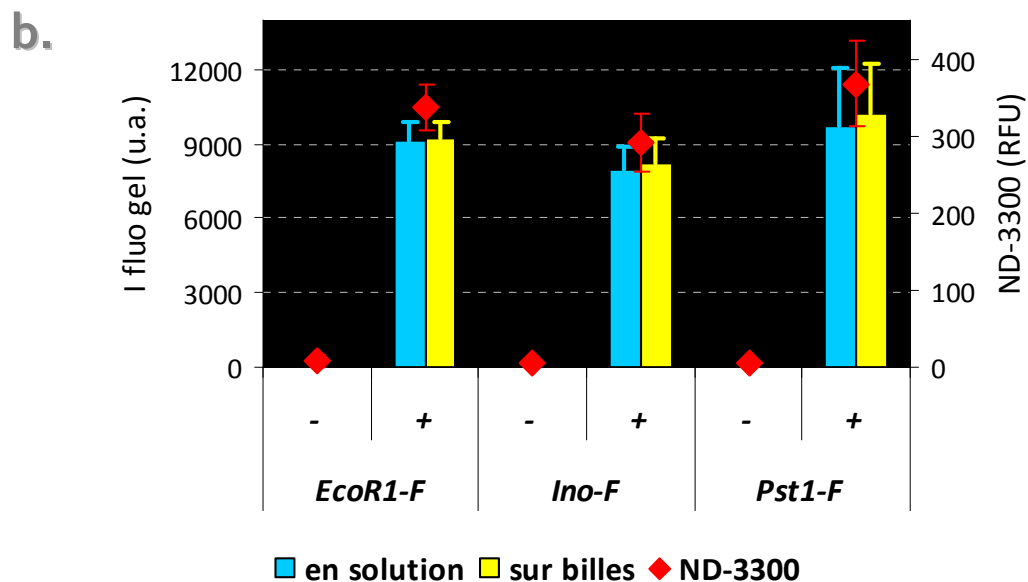
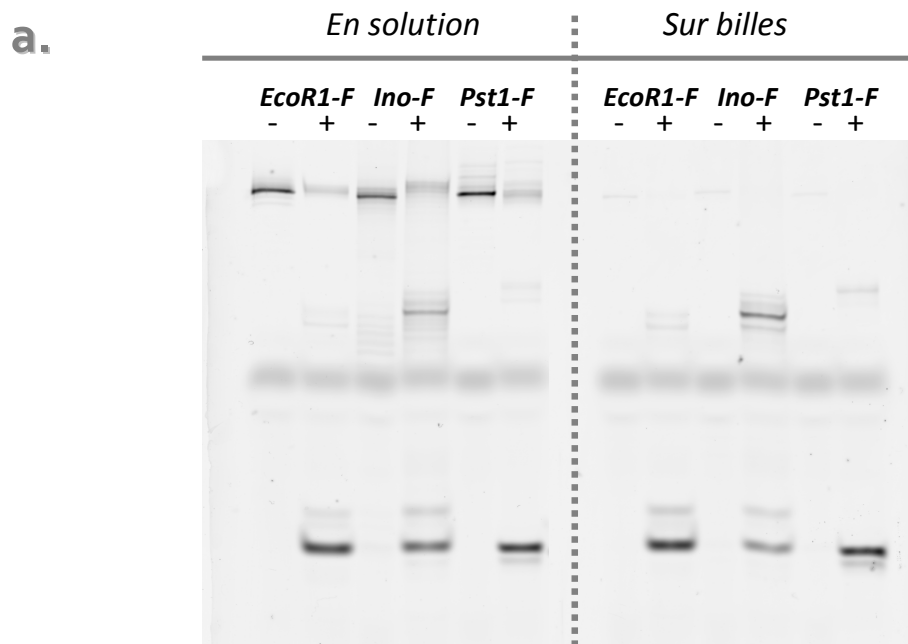


Figure 36: Détection de l'activité d'enzymes de restriction : digestion de 1 pmol de sonde *ODN-F* supportée ou en solution par 10 unités d'enzyme de restriction (*EcoR1* pour les sondes *EcoR1-F* et *Ino-F*, *Pst1* pour la sonde *Pst1-F*). a) Analyse par PAGE ; b) Comparaison des intensités de fluorescence des produits de coupure sur gel (histogrammes) et du signal mesuré dans le surnageant des billes par spectrofluorimétrie (diamants).

Aussi, l'intensité de fluorescence des produits de coupure des oligonucléotides supportés analysés par PAGE n'est pas significativement modifiée par rapport à l'expérience en solution. Ceci prouve d'une part que la quantité d'oligonucléotides immobilisés sur billes est en accord avec celle que nous avons calculée. D'autre part, il semble donc que la présence de la particule n'entrave pas l'accessibilité de ces enzymes à leur substrat.

4. Applications à l'étude de la réparation de l'ADN

4.1. Activités d'enzymes purifiées.

La sonde *THF-F* cible l'activité d'AP-endonucléases spécifiques. La sonde *Ino-F* est conçue pour détecter l'activité de la glycosylase monofonctionnelle Aag. La preuve de concept a été réalisée avec des enzymes purifiées. Ainsi, les billes *THF-F* sont incubées avec une quantité variable d'APE1 (AP-endonucléase humaine). Cette enzyme incise la structure tige-boucle au niveau du site abasique et le fragment fluorescent, relargué en solution, est directement analysé par spectrofluorimétrie. La sonde *Ino-F* est incubée avec une concentration croissante en AAG (alkyl adénine glycosylase humaine). Dans cette seconde expérience, l'AAG génère des sites abasiques qu'il est nécessaire de couper dans un second temps. Nous avons choisi de les révéler enzymatiquement par l'ajout d'un excès d'APE1 fixé à 2.5 u, conjointement à l'AAG. Les Figures 36a et 36b montrent que le signal mesuré par spectrofluorimétrie suite à la digestion est dose dépendant de la concentration en enzyme dans les deux cas. La limite de détection inférieure de l'activité AAG est de l'ordre de 10^{-3} unité (u). Le signal maximum est atteint pour 10^{-2} u d'enzyme, soit 100 fois moins que la quantité préconisée par le fournisseur²⁸. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans cette expérience, les sondes supportées sont co-digérées avec l'APE1. Or, il a été montré que cette enzyme augmente le turnover de l'AAG en déplaçant cette dernière de son produit (le site AP) pour lequel elle a une forte affinité [470]. Ce même phénomène expliquerait également le fait que, au-delà de 0.1 u d'AAG, on observe une inhibition du clivage de la sonde, inversement corrélée à la concentration en enzyme (Figure 37) [812]. Les ADN *N*-glycosylases hydrolysent les bases lésées, favorisant ainsi la formation de sites abasiques. La meilleure affinité de ces enzymes pour leur produit, plutôt que pour leur substrat, garantit la protection des cellules contre ces intermédiaires cytotoxiques, en empêchant leur transcription, répliation ou décomposition.

²⁸ 1 u est définie comme la quantité d'enzyme requise pour créer un site abasique à partir d'1 pmol d'un oligonucléotide contenant un seul résidu désoxyinosine (volume réactionnel de 10 μ L, 1h, 37°C)

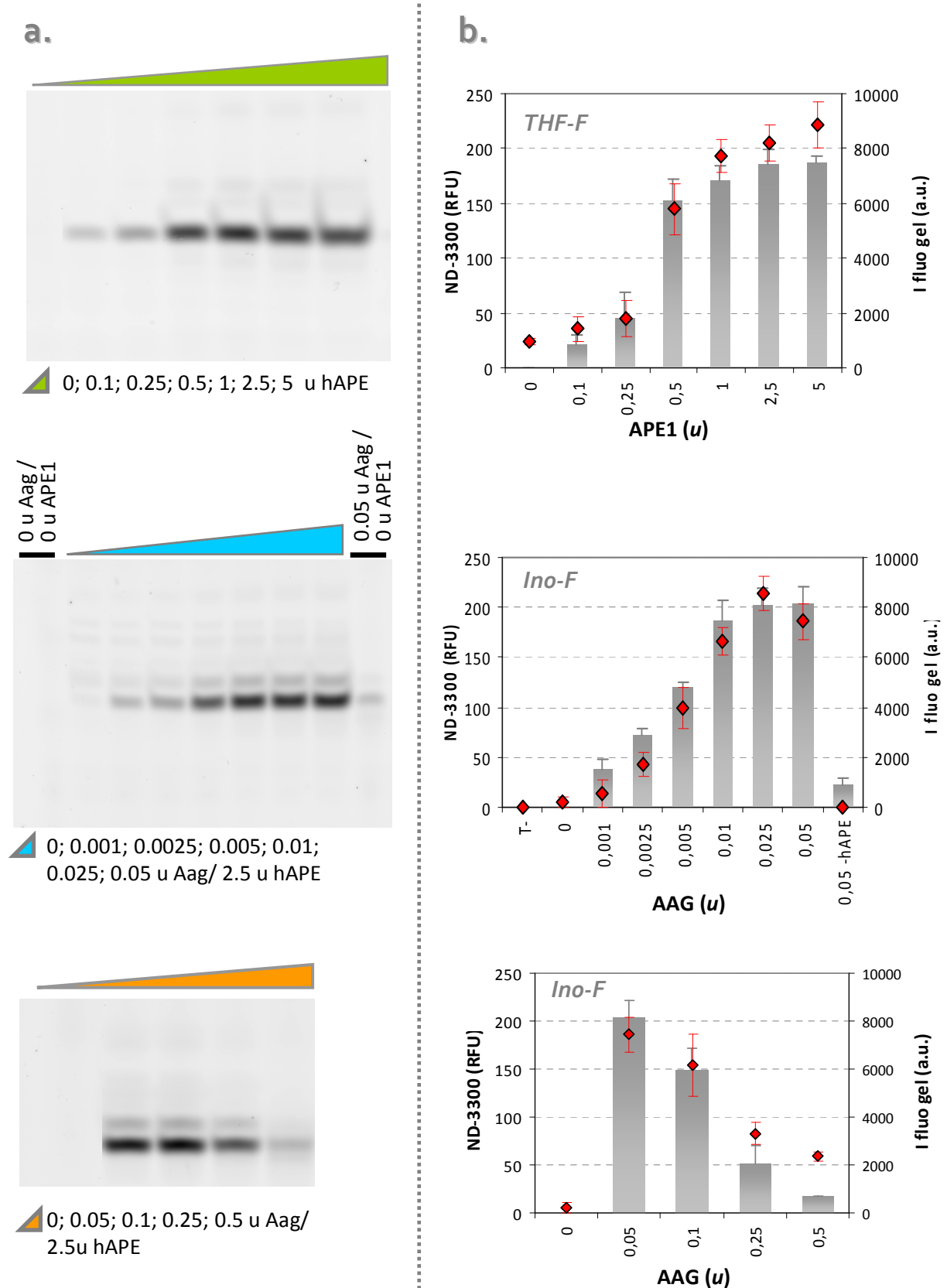


Figure 37 : Analyse comparée de la détection des activités APE1 et AAG par spectrofluorimétrie et par PAGE. 1 pmol de sonde *THF-F* supportée est incubée avec une gamme d'APE1 purifiée et 1 pmol de sonde *Ino-F* supportée est incubée avec une gamme Aag (APE1 fixée à 2.5 u). a) Analyse par PAGE du surnageant, b) Comparaison des intensités de fluorescence des produits de coupure sur gel (histogrammes) et du signal mesuré dans le surnageant des billes par spectrofluorimétrie (diamants).

Il est important de souligner que le signal enregistré avec le Nanodrop corrèle très bien avec l'intensité de fluorescence obtenue par PAGE. Aussi, on observe sur gel le produit de coupure de la sonde *Ino-F* incubée uniquement avec l'AAG (sans APE1). Bien que de faible intensité, ce signal n'ai pas mesuré en spectrofluorimétrie. Le produit visualisé par PAGE dans ce cas est probablement formé par dégradation du site abasique formé par l'AAG, dans les conditions dénaturantes de dépôt sur gel suite à l'analyse par le spectrofluorimètre en goutte (30 % formamide, 3 minutes à 90°C).

Ensemble, ces résultats confirment la pertinence de notre outil, couplé à une détection rapide et instantanée par spectrofluorimétrie. Cette méthode de détection présente une sensibilité similaire à la technique d'électrophorèse.

4.2. Détection d'activités du BER au sein d'extraits nucléaires

Les premières applications de ce biocapteur à partir d'extraits cellulaires ont été conduites avec les extraits nucléaires de cellules HeLa²⁹ commerciaux. Tout d'abord, nous avons déterminé le tampon optimal pour la digestion spécifique des sondes par le système glycosylase/AP-endonucléase, tout en minimisant la dégradation de l'ADN. Dans cette optique, une étude préliminaire a été conduite : 1 pmol de l'ODN non lésé *EcoR1-F* ou de la sonde *Ino-F* en solution est incubée avec une concentration fixée à 500 µg/mL d'extrait HeLa dans différents tampons et les échantillons sont analysés par PAGE (Figure 38). Cette étude nous a renseignés sur plusieurs paramètres, importants pour visualiser efficacement l'activité du BER au sein d'extraits nucléaires. Premièrement, il apparait que la présence d'un cation divalent est indispensable pour l'activité catalytique de l'AP-endo. En effet, le cation magnésium est un cofacteur présent au sein du site catalytique de la protéine qui permet l'activation du substrat par modification conformationnelle de celui-ci (490). Cependant il semble préférable d'utiliser le cation Zn²⁺ plutôt que Mg²⁺, ce dernier étant aussi un cofacteur indispensable pour de nombreuses nucléases non spécifiques, ce qui favorise la dégradation des sondes nucléiques (tampons 2 et 7).

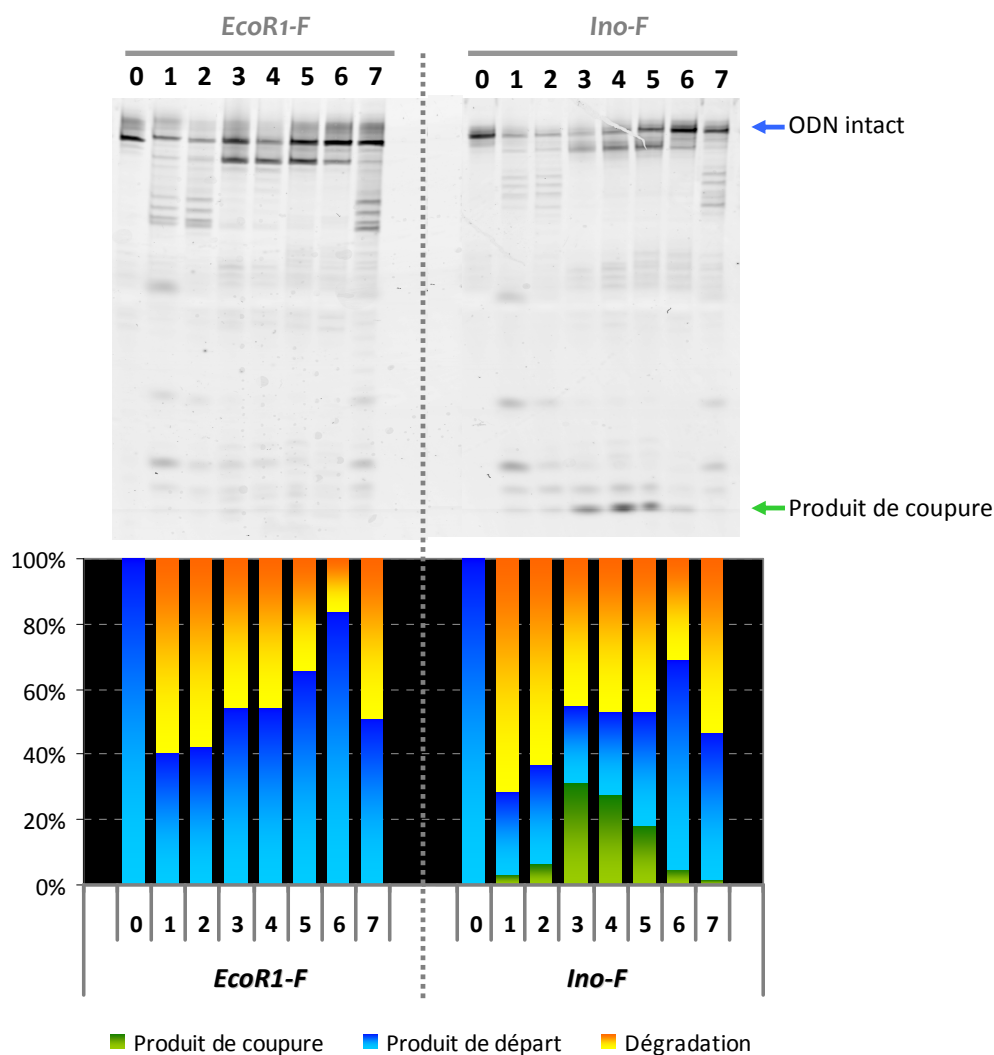
Le pH du tampon est également crucial : il s'avère que l'enzyme hAPE est très peu active à pH légèrement basique contrairement à l'AAG qui est aussi active à pH 7.5 qu'à pH 8.8 (tampon 1).

Il est également intéressant de signaler que les tampons les plus efficaces contiennent généralement de la BSA (tampon 4). Il a été montré que cette protéine stabilise l'AAG, permettant d'augmenter le nombre de cycles catalytiques de l'enzyme (tampon 6) [470]. Suite à ces expériences, dont les principaux résultats sont exposés ci-dessus, le tampon optimal de digestion retenu est

²⁹ Cette lignée cellulaire immortalisée est classiquement utilisée en biologie cellulaire. Elle est dérivée de cellules néoplasiques prélevées en 1951 sur la patiente Henrietta Lacks († 4 octobre 1951, 31 ans) alors atteinte d'un cancer du col de l'utérus.

composé de 10 mM HEPES/KOH (pH 7.8), 2 mM EGTA/KOH, 80 mM KCl, 0.1 mM ZnCl₂, 1 mM DTT et 0.5 mg/mL BSA.

L'analyse PAGE présentée en Figure 38 laisse entrevoir une difficulté supplémentaire dans la détection d'activités de coupure de l'ADN à partir d'extraits nucléaires : on observe dans les conditions de l'expérience de la dégradation non-spécifique aussi bien de la sonde témoin que de la sonde lésée.



- 1 | 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1 % Triton X-100
- 2 | 10 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂
- 3 | 10 mM HEPES-KOH pH 7.8, 2 mM EGTA, 80 mM KCl, 0.1 mM ZnCl₂, 1 mM DTT
- 4 | Tampon 3 + 0.5 mg/mL BSA
- 5 | 25 mM HEPES-KOH pH 7.8, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 % glycérol
- 6 | 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM KCl, 5 mM HS-EtOH, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 µg/mL BSA
- 7 | Tampon 6 + 10 mM MgCl₂

Figure 38: Choix du tampon pour la détection des activités AAG/APE1 à partir d'extraits nucléaires: Analyse et quantification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (20 % dénaturant) de la digestion de 1 pmol de sondes EcoR1-F ou Ino-F avec 500 µg/mL d'extrait HeLa, dans différents tampons (1-7).

Afin d'évaluer l'influence de l'immobilisation des oligonucléotides sur microbilles, une gamme de concentrations en extrait nucléaire est utilisée pour la digestion des sondes libres ou supportées. L'analyse PAGE (Figure 39) atteste de la dégradation intense des sondes nucléiques en solution dès 50 µg/mL d'extrait (30 % de dégradation). La décomposition de l'ODN est de 70 % à une concentration 10 fois supérieure et atteint 90 % à 3000 µg/mL. On remarque que la digestion non spécifique est principalement médiée par les 3'-exonucléases cellulaires, dont témoigne la dégradation séquentielle de l'extrémité 3'-biotine libre. En comparaison, la sonde supportée ne subit qu'une détérioration mineure, même aux plus hautes concentrations en extrait. Cette expérience démontre la capacité des billes à protéger les oligonucléotides contre une digestion non spécifique par les nucléases cellulaires.

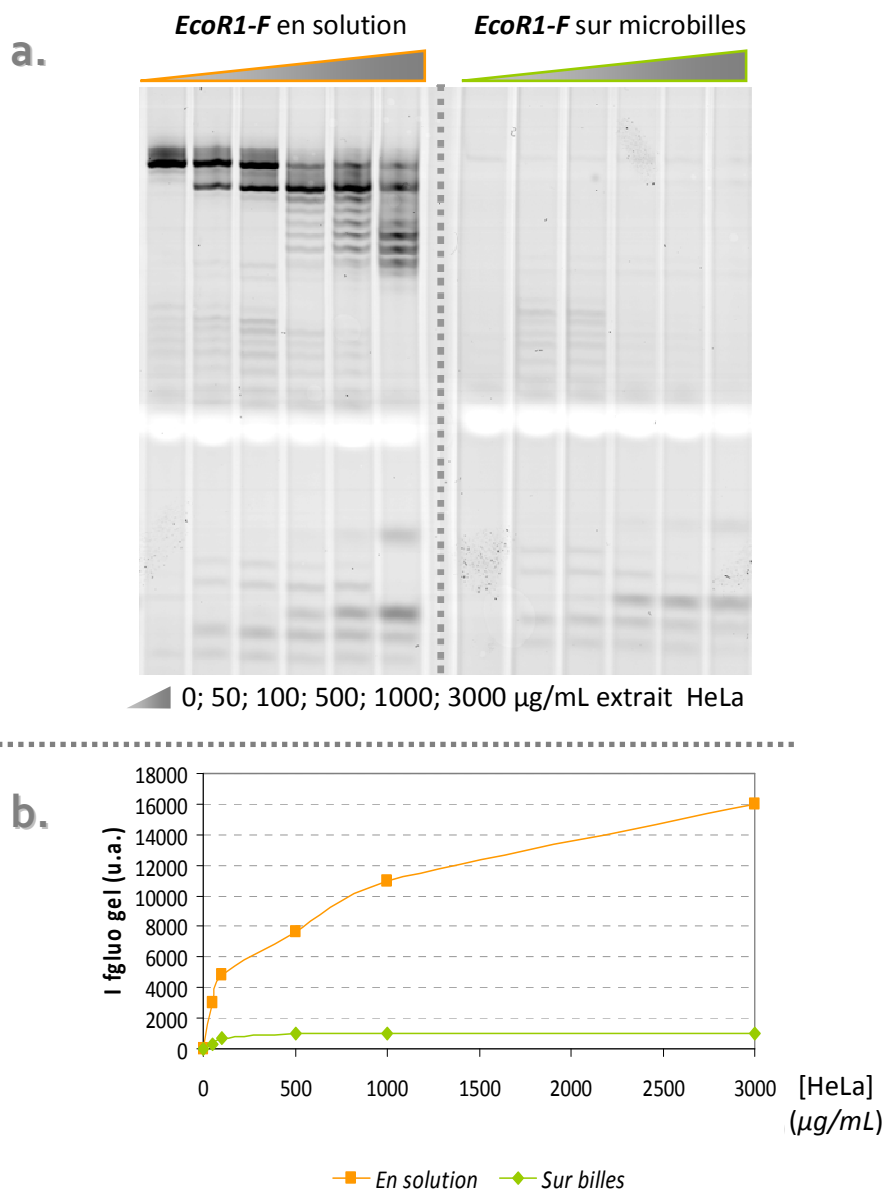


Figure 39: Effet de l'immobilisation des sondes sur microbilles vis-à-vis de la dégradation par les nucléases cellulaires : 1 pmol de la sonde *EcoR1-F* en solution ou supportée est incubée avec une quantité croissante d'extrait nucléaire de cellules HeLa. A) Analyse par PAGE; B) Quantification de la dégradation à partir du gel.

Ayant validé la robustesse de ce biocapteur dans un extrait cellulaire, celui-ci a été mis à profit pour la détection des activités APE1 et AAG avec les sondes adéquates. Les sondes supportées *EcoR1-F*, *THF-F* et *Ino-F* sont incubées avec une concentration croissante en extrait HeLa. A l'issue de l'incubation (1h, 37°C), le surnageant est analysé par spectrofluorimétrie puis par PAGE (Figure 40). On observe sur gel comme par spectrofluorimétrie que l'intensité du signal est dose dépendante de la concentration en extrait pour les sondes *Ino-F* et *THF-F*. Aussi, la limite de détection de l'activité APE1 est inférieure à 1 µg/mL d'extrait HeLa. Comme énoncé dans l'étude bibliographique cette enzyme possède de nombreuses fonctions dans la cellule et est donc présente en quantité importante. En revanche, des concentrations supérieures à 50 µg/mL sont nécessaires pour détecter l'activité de l'AAG. Ceci s'explique d'une part par le fait que le clivage de la sonde *Ino-F* nécessite l'action de deux enzymes ; d'autre part, cette glycosylase très spécifique des purines endommagées n'est que faiblement produite dans les cellules.

L'analyse PAGE confirme que le signal mesuré par fluorimétrie correspond au relargage du fragment nucléique fluorescent suite à l'action des enzymes de la réparation ciblées. Toutefois, il est intéressant de remarquer que le Nanodrop mesure un signal de fluorescence non négligeable dans le cas de la digestion de la sonde témoin *EcoR1-F*, qui n'ai pas attribué à de la dégradation non spécifique (d'après les analyses PAGE, cf. Figures 38 et 39). Ce biais n'étant pas visible lors de la détection avec les enzymes purifiées, il est possible que ce signal non linéaire provienne de la présence de quantités importantes de protéines, susceptibles d'interagir avec la fluorescence et de modifier les propriétés optiques du tampon. La normalisation des données par rapport à l'échantillon témoin (sans extrait) permet de rendre compte du différentiel entre la sonde lésée et non lésée, permettant une analyse rapide des activités glycosylases et AP-endonucléases à partir d'extraits nucléaires (cf. Figure 40c).

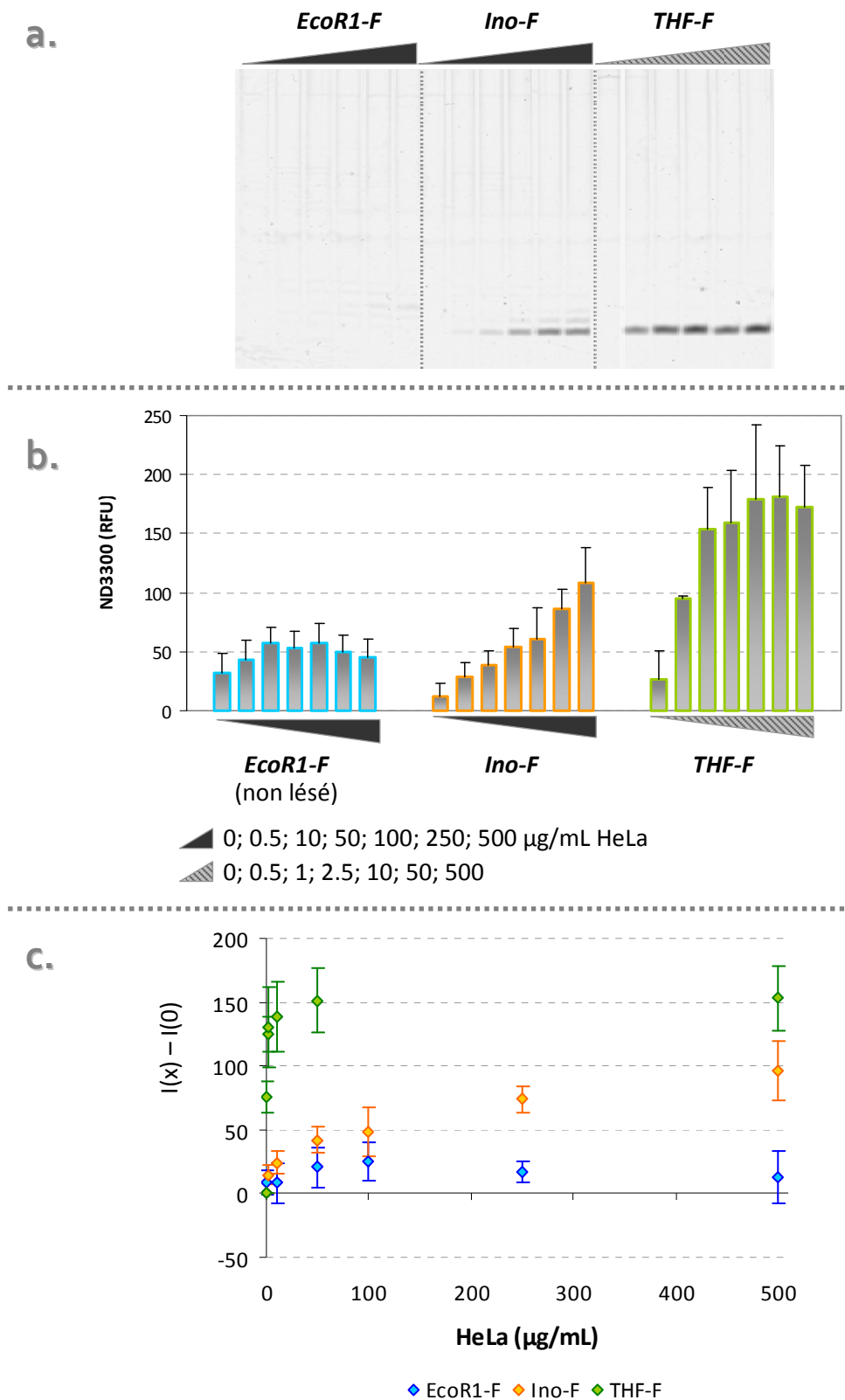


Figure 40: Détection par spectrofluorimétrie et PAGE des activités AAG et APE1 au sein d'extraits nucléaires HeLa : 1 pmol de sonde *ODN-F* supportée est incubée avec une concentration croissante en extrait nucléaire de cellules HeLa. a) Analyse par PAGE; b) Analyse par spectrofluorimétrie; c) Normalisation des résultats obtenus par spectrofluorimétrie par rapport au témoin négatif (sans extrait).

4.3. Etude d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN

Le développement de nouveaux inhibiteurs des activités de réparation de l'ADN est actuellement un enjeu fondamental pour optimiser les thérapies anticancéreuses. Le test fluorescent développé dans ce chapitre est potentiellement un outil de choix pour tester l'effet inhibiteur de molécules vis-à-vis d'une activité enzymatique spécifique. Dans cette perspective nous avons évalué les capacités du biocapteur à mettre en évidence ces activités inhibitrices. La méthoxyamine (Mx), inhibiteur indirect de l'activité AP-endonucléase [595, 813], a été employée pour réaliser la preuve de concept. Cette petite molécule organique réagit avec la fonction aldéhyde du 2-désoxyribose non cyclique des sites abasiques, formant un éther d'oxime (structure et mécanisme en Figure 41). Ce produit de réaction, stable, n'est alors plus substrat pour l'AP-endonucléase, conférant l'activité inhibitrice de la Mx vis-à-vis de cette enzyme. Les tests ont été conduits à partir des microbilles fonctionnalisées avec les sondes *Ino-F* et *THF-F*. Les particules sont incubées avec 500 $\mu\text{g/mL}$ d'extrait HeLa en présence d'une concentration de méthoxyamine variant de 0 à 400 mM.

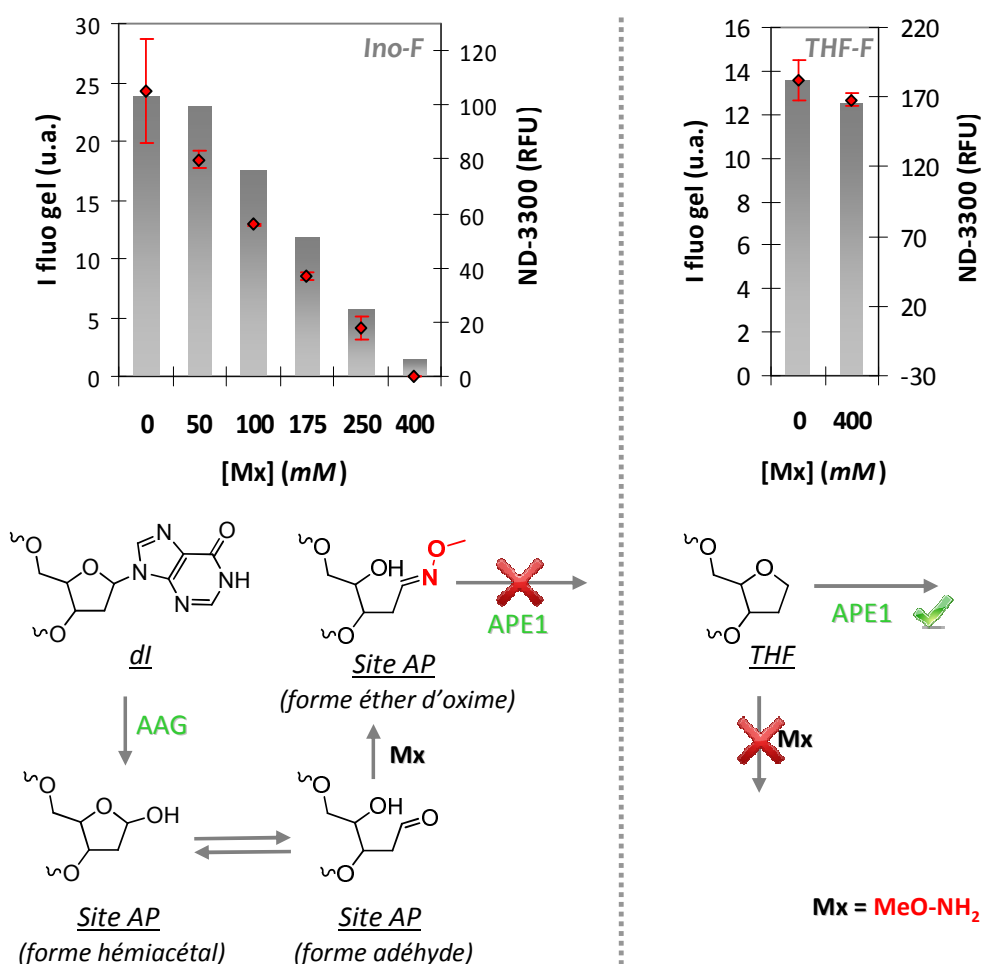


Figure 41: Mise en évidence de l'inhibition de l'AP-endonucléase par la méthoxyamine (Mx) au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa: 1 pmol des sondes *Ino-F* et *THF-F* supportées sont incubées avec 500 $\mu\text{g/mL}$ d'extrait HeLa en présence d'une concentration croissante en Mx. Analyses comparées par PAGE (histogramme) et par spectrofluorimétrie (diamants) illustrées du mécanisme d'inhibition de l'AP-endonucléase par la méthoxyamine.

On constate d'après la Figure 41 que le clivage de la sonde *Ino-F* est effectivement inhibé de façon concentration dépendante par la méthoxyamine. A contrario, la coupure de la sonde *THF-F* reste maximum, même à la plus grande concentration en Mx. Ces résultats sont en accord avec le présent mécanisme d'inhibition, du fait de l'absence de la fonction aldéhyde dans la structure tétrahydrofurane.

On remarque que l'effet inhibiteur de la Mx est significatif à des concentrations élevées, supérieures au millimolaire. L' IC_{50} pour cette molécule, dans les conditions du test, est de l'ordre de 100 mM (cf. Figure 42). Cette valeur est en complet accord avec les observations de Rosa et al. [596]: dans cette étude, un oligonucléotide contenant la lésion uracile (270 fmol) est incubé avec 20 μ g d'extrait nucléaire HeLa en présence de Mx. Dans ces conditions, l'inhibition du clivage de l'oligonucléotide par APE1 à partir d'un extrait nucléaire HeLa est totale pour 200 mM de Mx. Cette faible efficacité s'explique par le fait que la molécule n'inhibe pas spécifiquement l'AP-endonucléase par un mécanisme de type compétitif ou non-compétitif mais modifie la structure du substrat de l'enzyme en réagissant avec le groupement aldéhydique du site AP. Or, de nombreuses autres molécules peuvent réagir avec la Mx, rendant indisponible ce composé. Cet effet, nommé « off-target » (traduit par hors cible), explique le besoin de grandes concentrations en Mx pour observer l'inhibition d'APE1 au sein d'extraits cellulaires [814]. Bien que cette molécule ait montré une efficacité thérapeutique convaincante dans plusieurs études [599, 813, 815], le développement d'inhibiteurs spécifiques des enzymes de la BER permettrait de maximiser l'effet synergique obtenu en combinaison avec des agents génotoxiques [597, 602, 604]. La méthode de détection décrite dans ce chapitre, déclinable en test moyen/haut débit, se révèle adaptée pour la mise en évidence de molécules inhibitrices d'intérêt thérapeutique.

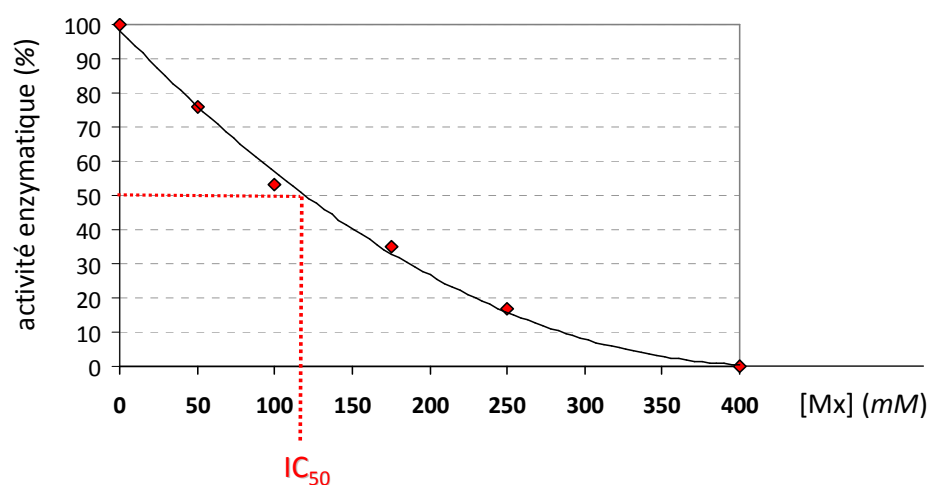


Figure 42: Inhibition de l'enzyme APE1 par la méthoxyamine: calcul de la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}).

5. Conclusion et Limitations

Au cours de cette première étude, nous avons mis au point un dispositif performant qui permet l'analyse de la fonctionnalité d'enzymes de la réparation de l'ADN. Ce projet a été ciblé sur deux enzymes majeures de la réparation par excision de base : une ADN *N*-glycosylase, AAG et une AP-endonucléase, APE1. L'outil se caractérise par une sonde d'acide nucléique lésée, auto-complémentaire (structure tige-boucle), immobilisée sur des billes magnétiques (de 2,8 μm de diamètre) par une interaction streptavidine/biotine. Ce format, permet l'utilisation d'un volume réduit d'échantillon, fixé à 10 μL .

Nous avons au préalable démontré que les sondes nucléiques possédant les séquences et la structure appropriées, peuvent être clivées efficacement par des enzymes de restriction. Par la suite, l'outil s'est révélé également pertinent pour l'analyse rapide, fiable et reproductible de l'activité d'enzymes de la réparation purifiées. Dans ce format, ce test est directement applicable à un criblage d'inhibiteurs enzymatiques conduisant à l'incision d'acides nucléiques (AP-endonucléases, glycosylases, enzymes de restriction, nucléases,...).

Pour répondre à certaines problématiques biologiques, il s'avère utile de pouvoir disposer d'un test fonctionnel pour mesurer les activités glycosylases ou AP-endonculéases à partir d'extraits nucléaires de cellules d'intérêt. Pour valider notre test dans ce type d'applications, nous avons montré que l'outil possède une bonne spécificité pour discriminer les activités AAG et APE1 au sein d'un extrait nucléaire de cellules HeLa. La sensibilité pour la détection d'APE1 est excellente du fait de l'omniprésence de cette protéine dans l'extrait. La détection de l'AAG, plus faiblement produite, est également possible pour de plus grandes concentrations en extrait. Toutefois, dans ces conditions, un biais expérimental est introduit par la présence de grande quantité de matériel biologique, susceptible de modifier le signal de fluorescence (observé pour la sonde témoin). La quantification directe d'activités enzymatiques peut donc s'avérer délicate. Toutefois, ce test reste idéalement adapté pour la comparaison de divers extraits nucléaires, dès lors que l'on se place dans des conditions de test identiques (2 lignées cellulaires, cellules ayant subits différents traitements génotoxiques,...).

IV ANALYSE DE LA REPARATION PAR EXCISION DE BASE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

1	La cytométrie en flux : principe et fonctionnement.....	152
2	Stratégies.....	154
3	Caractérisation et calibration des billes par cytométrie en flux.	155
	3.1. <i>Caractérisation des billes</i>	155
	3.2. <i>Calibration du cytomètre</i>	156
4	Détection « signal off » vs « signal on »	158
	4.1. <i>Activités des enzymes purifiées</i>	158
	4.1.a Analyse par cytométrie en flux.....	158
	4.1.b Détection du clivage enzymatique en temps réel.....	159
	4.2. <i>Activités enzymatiques au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa</i>	161
	4.2.a Stratégie « signal off »	161
	4.2.b Stratégie « signal on »	164
5	Optimisations de la détection par cytométrie en flux.....	166
	5.1. <i>Orientation des oligonucléotides</i>	166
	5.2. <i>Choix du couple de chromophores</i>	167
	5.3. <i>Changement de support</i>	169
6	Expériences applicatives.....	173
	6.1. <i>Détection des activités APE1 et UNG dans les extraits de cellules HeLa</i>	173
	6.2. <i>Etude des activités de lignées de glioblastomes humains LN428</i>	175
7	Conclusion	180

Dans le chapitre précédent est décrit le couplage de l'outil sondes supportées sur billes magnétiques associé à une détection en solution par fluorimétrie. La principale limitation de ce test concerne la détection des activités de la BER à partir d'extraits protéiques. En effet, pour des concentrations élevées en extrait, le signal s'avère biaisé, probablement par la présence d'une quantité importante de protéines. Afin de pallier à cette difficulté, nous avons envisagé d'analyser directement la fluorescence des sondes à la surface des billes, plutôt qu'en solution. Cette méthode permettrait de s'affranchir de la présence des protéines lors de l'analyse par simple lavage des microbilles. Egalement, ces dernières peuvent être resuspendues dans un tampon commun d'analyse, indépendamment du tampon utilisé lors de la digestion. Une méthode d'analyse de choix dans la poursuite de cet objectif est la cytométrie en flux.

1. La cytométrie en flux : principe et fonctionnement

La cytométrie en flux (« *flow cytometry* », FC) est une technique d'analyse de cellules ou de particules individuelles (Figure 43). La suspension à analyser est injectée sous pression au centre d'une gaine liquide pressurisée. Sous la contrainte du flux hydrodynamique, les particules (cellules, billes,...) sont alignées une à une afin de traverser individuellement un faisceau laser focalisé sur le jet. Les méthodes de mesure sont basées sur l'absorption et la diffusion du rayon laser. Le temps d'écrantage du faisceau sur un détecteur placé à 180° (FSC, dans l'alignement de la source, de l'autre côté du jet) donne accès à la taille des objets analysés. Un second détecteur (SSC) recevant la lumière réfractée à 90° donne des informations sur la granulométrie des cellules. Ces deux paramètres permettent par exemple de différencier les lymphocytes, les monocytes et les granulocytes présents dans des échantillons sanguins. D'autre part, l'émission de fluorescence peut également être analysée simultanément. Les signaux émis sont focalisés et séparés en fonction de leur longueur d'onde par un jeu de miroirs et de filtres optiques avant d'atteindre les détecteurs correspondants.

cytomètre en flux commercialisé par la société Becton Dickinson, le FACScalibur®, équipé d'un premier laser permettant l'analyse de trois fluorophores grâce au détecteurs FI1 à FI3 (cf. Figure 43). Egalement, une diode laser rouge autorise la mesure d'une quatrième fluorescence (FI4).

2. Stratégies

L'analyse de la réparation sur microbilles par cytométrie en flux a été pensée selon deux stratégies, illustrées en Figure 44.

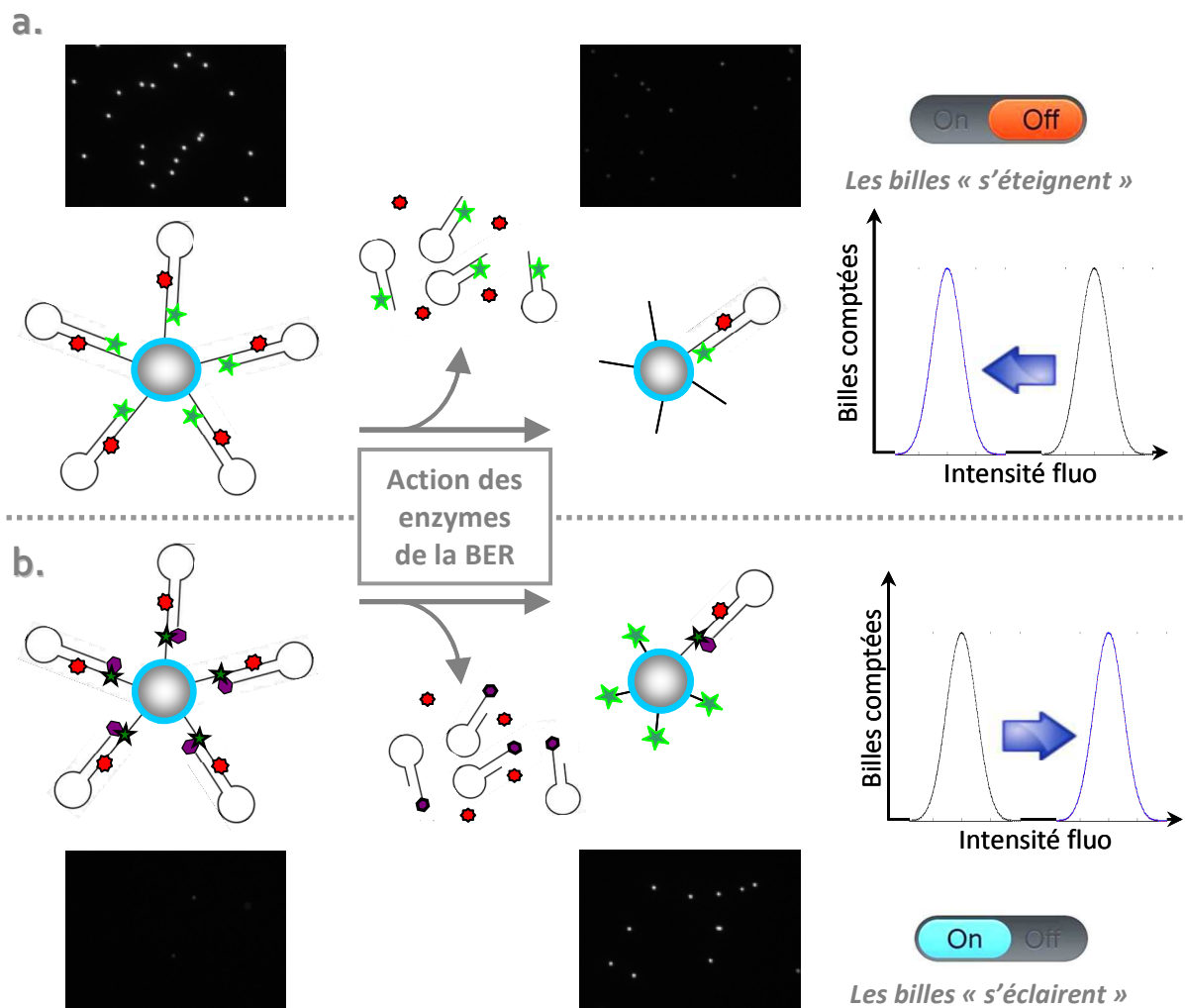


Figure 44: Principe de détection par cytométrie en flux d'activités de réparation par excision de base : a) à l'aide de sondes fluorescentes supportées ; b) à l'aide de sondes quenchées supportées. Représentation schématique du test, illustrée par l'image des billes fonctionnalisées obtenues par microscopie de fluorescence.

La première approche, nommée « signal off » dans la suite de ce manuscrit, utilise les billes magnétiques fonctionnalisées avec les sondes auto-complémentaires fluorescentes. Dans ce cas, le clivage des sondes se traduit par une diminution de la fluorescence en surface des particules. La seconde stratégie consiste à fonctionnaliser les microbilles avec des sondes pro-fluorescentes (dites « quenchées »). Ici, les sondes sont modifiées par un fluorophore introduit sur la partie de la tige immobilisée et par un « quencher » situé sur le brin opposé face au fluorophore. Initialement les billes sont donc « éteintes » et l'activité de réparation par excision conduit à l'augmentation de la fluorescence. Par opposition à la stratégie « signal off », ce test alternatif sera désigné « signal on ».

3. Caractérisation et calibration des billes par cytométrie en flux.

3.1. *Caractérisation des billes*

Avant d'entreprendre les expériences applicatives du test de détection par FC, la compatibilité des billes avec le cytomètre a été vérifiée. Les microbilles Dynabeads M-280 Strepta « nues » ont été analysées par le FACScalibur. On observe que la taille et la granulométrie des particules sont homogènes (Figure 45a), conditions essentielles pour espérer obtenir des valeurs de fluorescence exploitables, du fait de l'analyse bille à bille. Notons toutefois la présence de deux sous populations de particules distinctes. La population la plus dense correspond aux billes isolées, que l'on souhaite analyser. La seconde, caractérisée par une taille relative plus élevée, représente des doublets de billes formés par des interactions non spécifiques. Ainsi, ces objets possèdent une fluorescence deux fois plus élevée que les billes individualisées. De ce fait, il est important d'exclure les doublets lors du traitement des données.

Concernant la mesure de la fluorescence, on constate que le signal des billes fonctionnalisées avec les sondes fluorescentes (cy3) est bien distinct de celui des billes « nues », bien que la différence ne soit que d'une unité logarithmique. Aussi les billes portant les sondes quenchées possèdent un signal de fluorescence faible proche de celui des billes « nues », validant le quenching efficace des sondes immobilisées (Figure 45b).

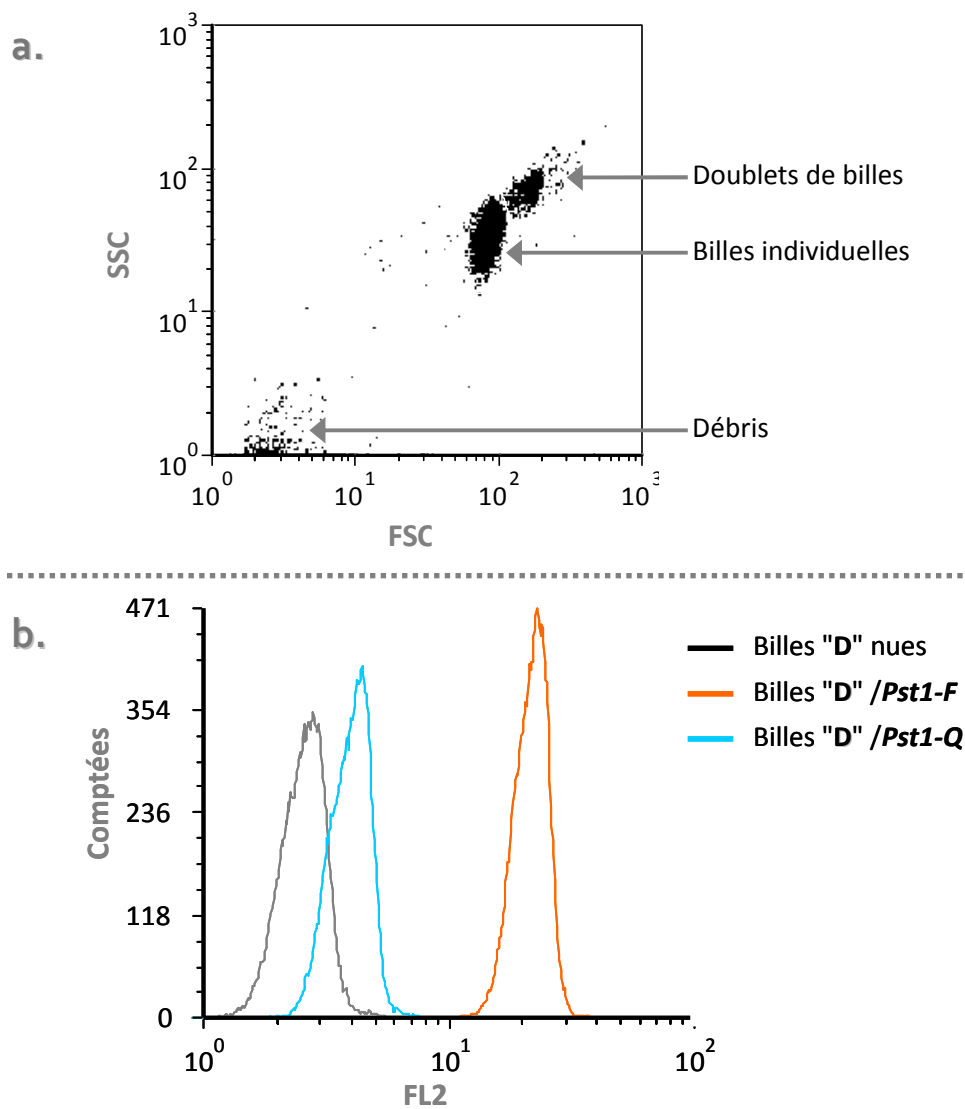


Figure 45: Analyse des microbilles D par cytométrie en flux: a) Diagramme taille (FSC) / granulométrie (SSC) des billes "nues"; b) Histogrammes de fluorescence FL2 (cy3) des billes « nues » et fonctionnalisées par *Pst1-F* ou *Pst1-Q*.

3.2. Calibration du cytomètre

La linéarité du signal fluorescent a été évaluée. Pour cela, les billes **D** sont fonctionnalisées avec une quantité croissante de sondes *EcoR1-F*. Le taux de fixation des sondes est mesuré par spectrofluorimétrie et les billes sont finalement analysées par cytométrie. Les résultats présentés en Figure 46 montrent que la fluorescence pour chaque quantité de sonde est homogène et résolue (coefficient de variation < 20 %). Aussi, on constate que le signal est effectivement proportionnel au taux de fonctionnalisation de billes, permettant alors la quantification du clivage enzymatique des oligonucléotides lors des processus de réparation par excision.

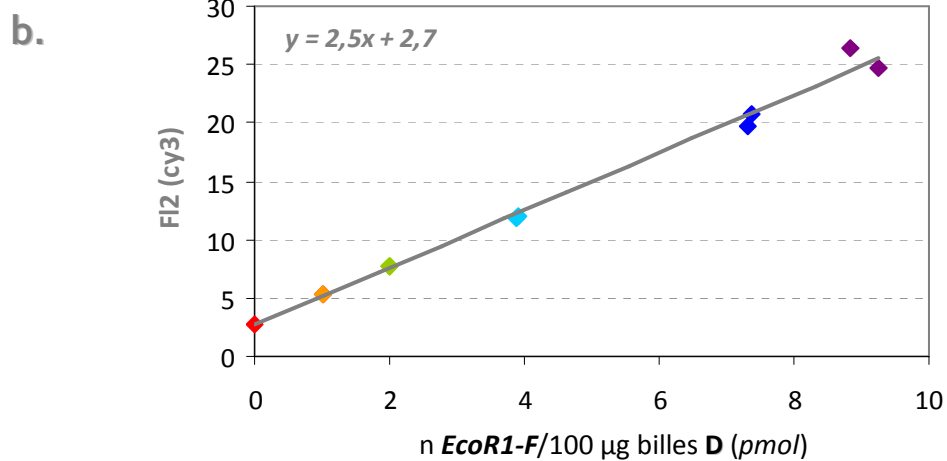
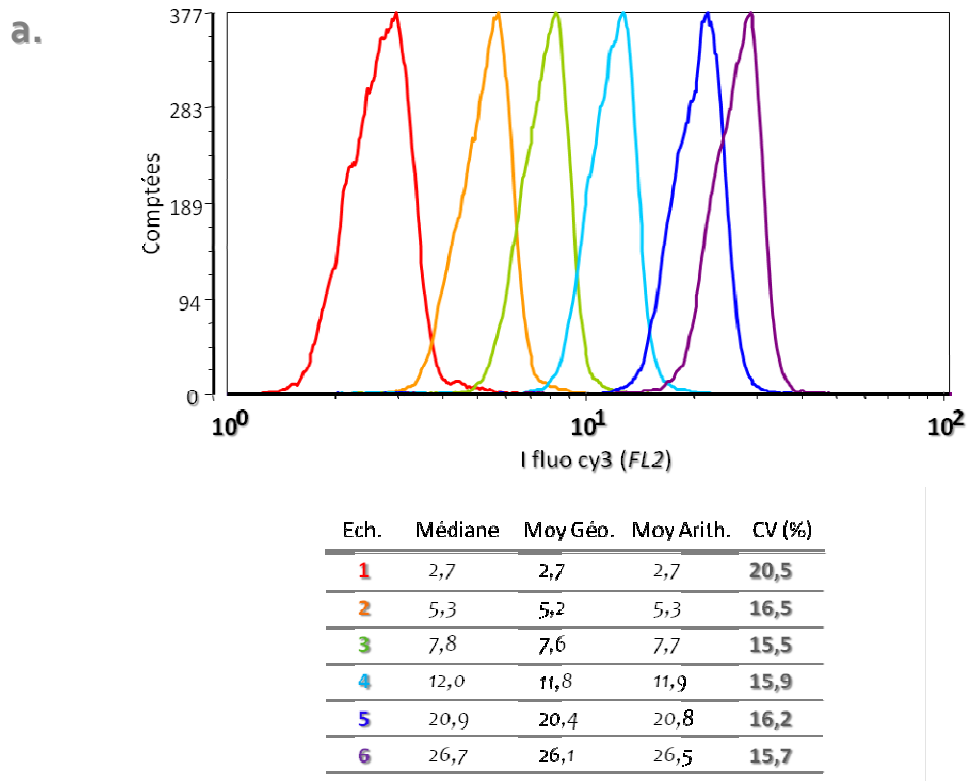


Figure 46: Calibration du cytomètre par les billes D fonctionnalisées par une quantité variable de sonde *EcoR1-F*: a) Histogrammes de fluorescence et données statistiques obtenus pour une série d'échantillons ; b) courbe de calibration obtenue à partir de deux séries d'échantillons indépendantes.

4. Détection « signal off » vs « signal on »

4.1. Activités des enzymes purifiées

4.1.a. Analyse par cytométrie en flux

La détection du clivage enzymatique généré par l'action d'enzymes de restriction ou de la réparation a été investiguée. Les sondes supportées *Pst1*-(F/Q), *THF*-(F/Q) et *Ino*-(F/Q) sont digérées par une quantité variable d'enzymes purifiées *Pst1*, APE1 ou AAG respectivement. Comme mentionné dans le paragraphe III.4.1, les sites abasiques formés par l'action de l'AAG sont révélés par un excès d'APE1.

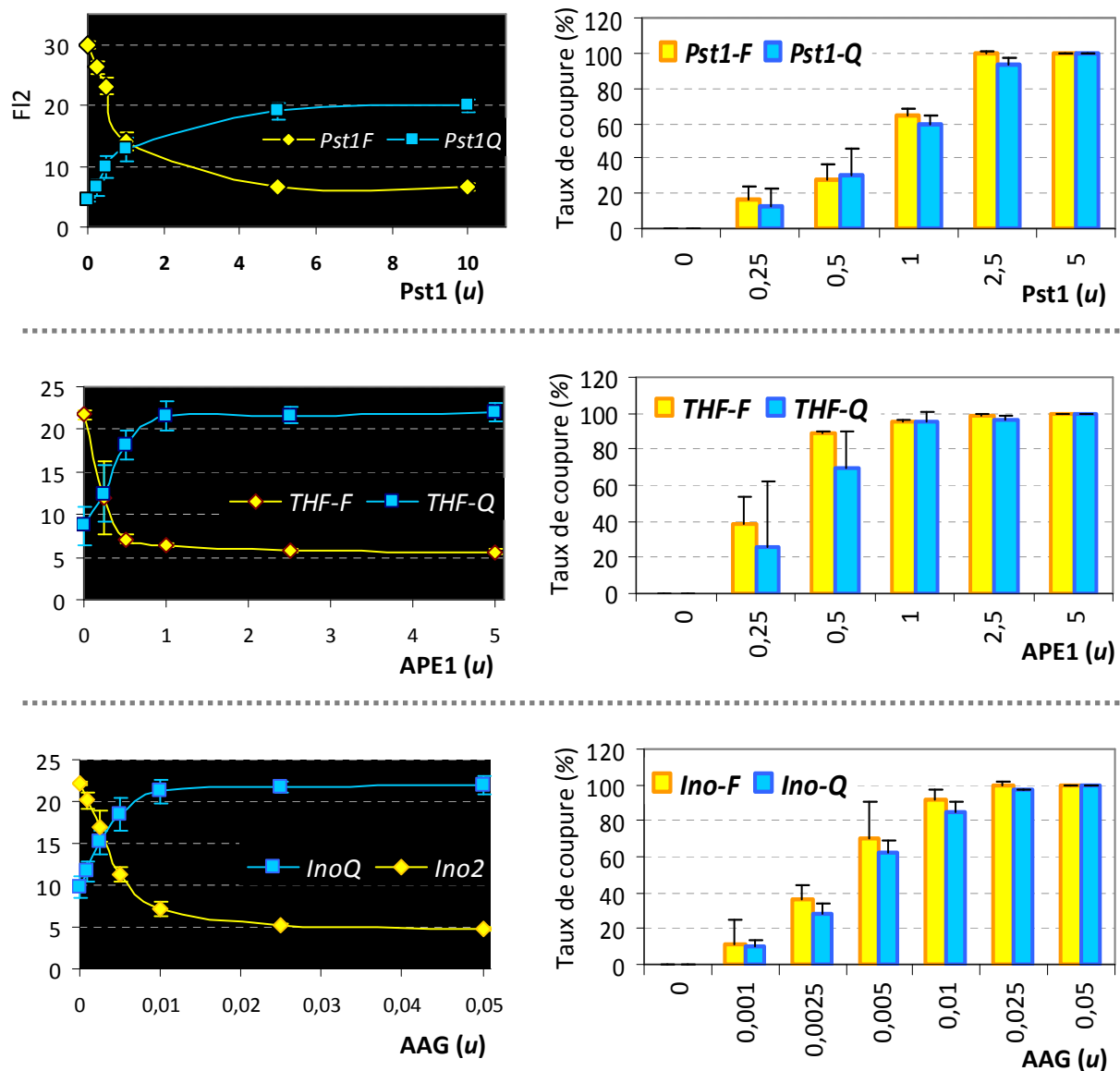


Figure 47: Comparaison des stratégies « signal on » et « signal off » pour la détection de l'activité d'enzymes purifiées : les sondes fluorescentes *ODN-F* ou quenchées *ODN-Q* supportées sont incubées avec une gamme d'enzymes purifiées correspondantes. Les résultats bruts enregistrés par cytométrie en flux (gauche) sont ramenés au taux de coupure de chaque enzyme (droite).

Les histogrammes exposés en Figure 47 démontrent l'uniformité de la digestion des billes, quelle que soit la concentration enzymatique. Les moyennes arithmétiques ont été utilisées pour quantifier le taux de coupure pour chaque échantillon. Pour chaque enzyme, Il est intéressant de constater que le taux de coupure des sondes fluorescentes ou pro-fluorescentes est sensiblement identique (Figure 47, histogrammes). Aussi, pour les lésions inosine et THF, le signal maximum atteint pour les sondes quenchées (22.5 ± 0.5) coïncide avec le signal initial (témoin négatif) pour les sondes fluorescentes correspondantes, confirmant une réparation quantitative des oligonucléotides. En revanche, la sonde *Pst1-F* présente un signal initial plus élevé (30.0 ± 0.3). Cette sonde est probablement de meilleure qualité en terme de fluorescence, le chromophore ayant pu conserver une meilleure intégrité lors de la synthèse, de la déprotection et/ou de la purification.

4.1.b. Détection du clivage enzymatique en temps réel

L'utilisation de sondes quenchées peut être mise à profit pour détecter la réparation de l'ADN en temps réel. Pour cela un « thermocycleur », utilisé conventionnellement pour réaliser des expériences de PCR quantitatives, a été détourné de sa fonction primaire pour être utilisé comme une plateforme de lecture de fluorescence en temps réel (format 96 puits; 10 μ L par échantillon).

La démarche expérimentale a été la suivante : les microbilles **D** supportant les sondes *ODN-Q*, sont refroidies à 4°C puis incubées avec une quantité variable d'enzyme purifiée ciblée (*Pst1*, *APE1* et *Aag* pour les sondes *Pst1-Q*, *THF-Q* et *Ino-Q*, respectivement). L'incubation se poursuit 1h dans le thermocycleur Stratagene Mx3005p (*Agilent Technologies*) à une température fixée à 37°C. L'intensité de fluorescence pour chaque échantillon est mesurée chaque minute. Les résultats exposés en Figure 48 montrent que la cinétique enzymatique est dépendante de la quantité d'enzyme pour chaque sonde. Notamment la pente à l'origine, calculée pour chaque concentration enzymatique à partir de trois expériences indépendantes, est constante traduisant une bonne reproductibilité de la vitesse initiale. Toutefois, le calcul des constantes enzymatiques (la vitesse maximale, V_{max} et la constante d'affinité, K_m) n'a pas été entrepris. Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec différentes quantités de sonde initiales afin de comparer l'affinité des enzymes pour les lésions supportées par rapport aux sondes en solution et aux constantes décrites dans la littérature. Le changement d'appareil de mesure serait alors nécessaire pour avoir accès à la vitesse initiale réelle. En effet, bien que les échantillons soient conservés dans la glace avant l'analyse par le thermocycleur, il existe un délai d'environ 2 minutes avant que ce dernier ne démarre les mesures, exposant ainsi les échantillons à température ambiante à laquelle sont partiellement actives les enzymes étudiées. Ce dernier point soulevé ici explique les différences d'intensités de fluorescence à $t = 0$ minute, dépendante de la concentration protéique.

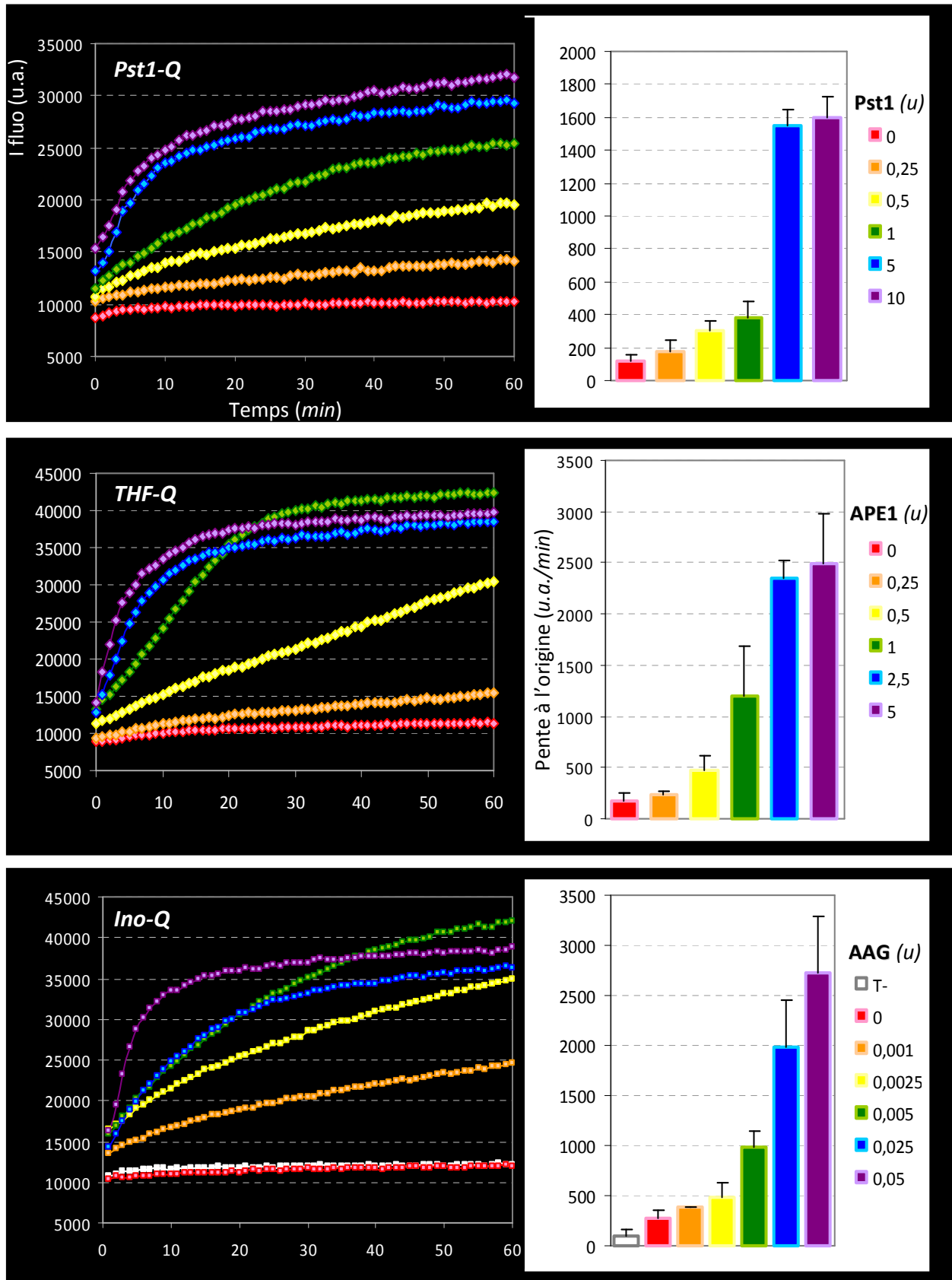


Figure 48: Cinétique de coupure des sondes *ODN-Q* supportées par les enzymes purifiées correspondantes. Détection en temps réel par fluorescence avec un thermocycleur (gauche, 1h à 37°C) et pente à l'origine calculées pour chaque quantité d'enzyme (droite).

4.2. Activités enzymatiques au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa

4.2.a. Stratégie « signal off »

Pour comparaison avec la détection par fluorimétrie, la détection par FC de la réparation à partir d'extraits de cellules HeLa avec les sondes fluorescentes supportées a été considérée. Avant l'analyse, les billes sont resuspendues dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 0.2 % de Tween 20. Ce dernier composant est important dans le cas de l'incubation des billes avec des extraits protéiques. Il limite l'agglomération des billes observée par FC (accumulation de doublets) lorsque les particules sont reprises dans du PBS seul.

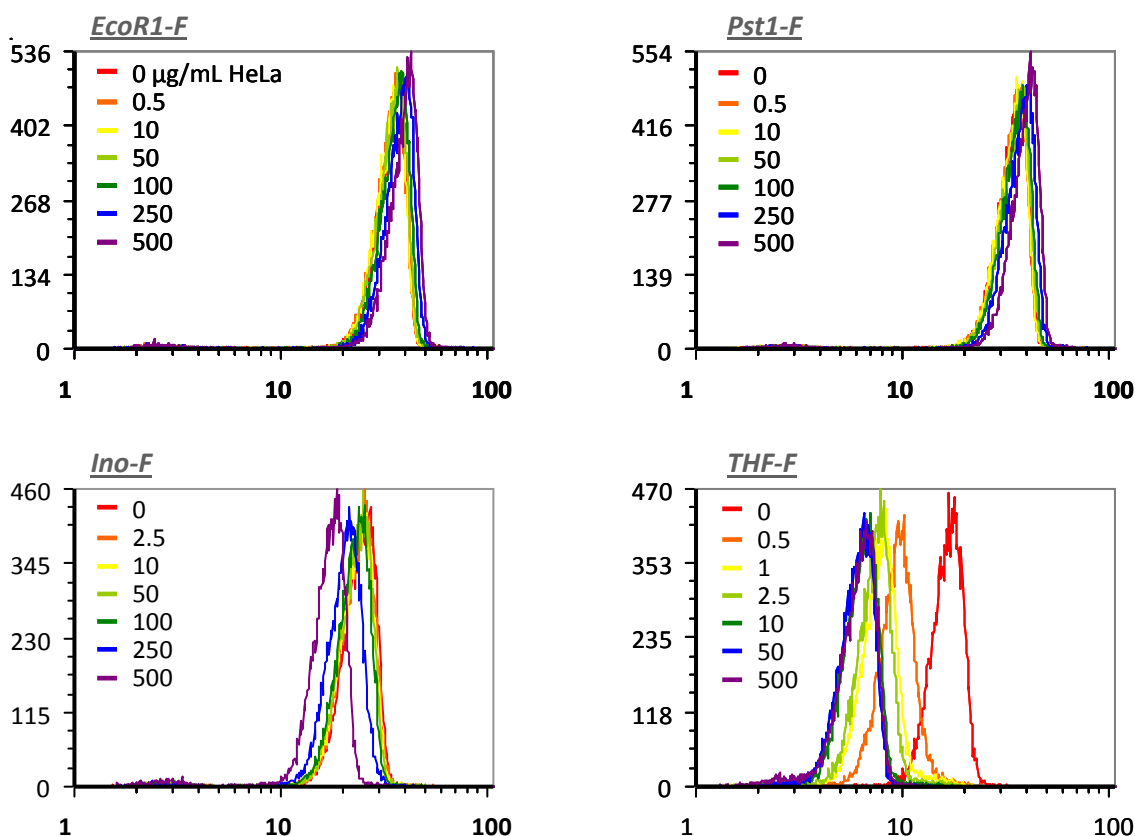


Figure 49: Détection par cytométrie en flux (« signal on ») des activités enzymatiques ciblées au sein d'extraits nucléaires HeLa : Les sondes fluorescentes supportées sont incubées avec une concentration croissante en extrait nucléaire de cellules HeLa (1h, 37°C). Les données brutes sont représentées sous forme d'histogrammes superposés, correspondant chacun à une concentration en extrait.

Premièrement, on remarque comme pour l'analyse spectrofluorimétrique que la sonde *THF-F* est incisée plus efficacement que la sonde *Ino-F* (Figure 49). Aussi, la limite de détection inférieure respective est de 0.5 et 50 µg de protéines/mL. Il est également surprenant de constater que le signal pour les sondes témoins augmente avec la concentration en extraits. On enregistre entre 10 et 12 % d'augmentation de la fluorescence à 500 µg/mL. Il est connu que la fluorescence des cyanines est sensible à son environnement proche. Par exemple, la présence d'un nucléotide en face du fluorophore peut atténuer ou au contraire accroître la fluorescence de celui-ci [817]. Certaines protéines peuvent également moduler l'intensité de fluorescence de ces chromophores [818]. L'observation expérimentale mentionnée n'est donc pas anormale mais pourrait être le résultat d'une ouverture partielle du duplexe, médiée par la fixation de protéines, et/ou de l'interaction directe du fluorophore avec certaines protéines nucléaires. La conséquence de ce phénomène est une sous-estimation du taux de clivage des sondes lésées. Dans un but ultérieur de quantifier précisément ces activités de réparation, il est important de développer une méthode de normalisation des données en fonction de la sonde témoin, tenant compte de ce biais expérimental. La normalisation des données par rapport au témoin négatif, sans extrait (Figure 50), permet de mettre en évidence la coupure effective de la sonde *Ino-F*. Un protocole de lavage ou de chauffage des billes avant l'analyse est également envisagé.

La courbe de calibration permet de calculer approximativement le taux de coupure maximal des sondes. Ce dernier approche les 40 % pour la sonde *Ino-F* et est supérieur à 90 % pour la sonde *THF-F*. Notons que ce faible taux de coupure par l'Aag est également rapporté dans la littérature [761, 771, 773].

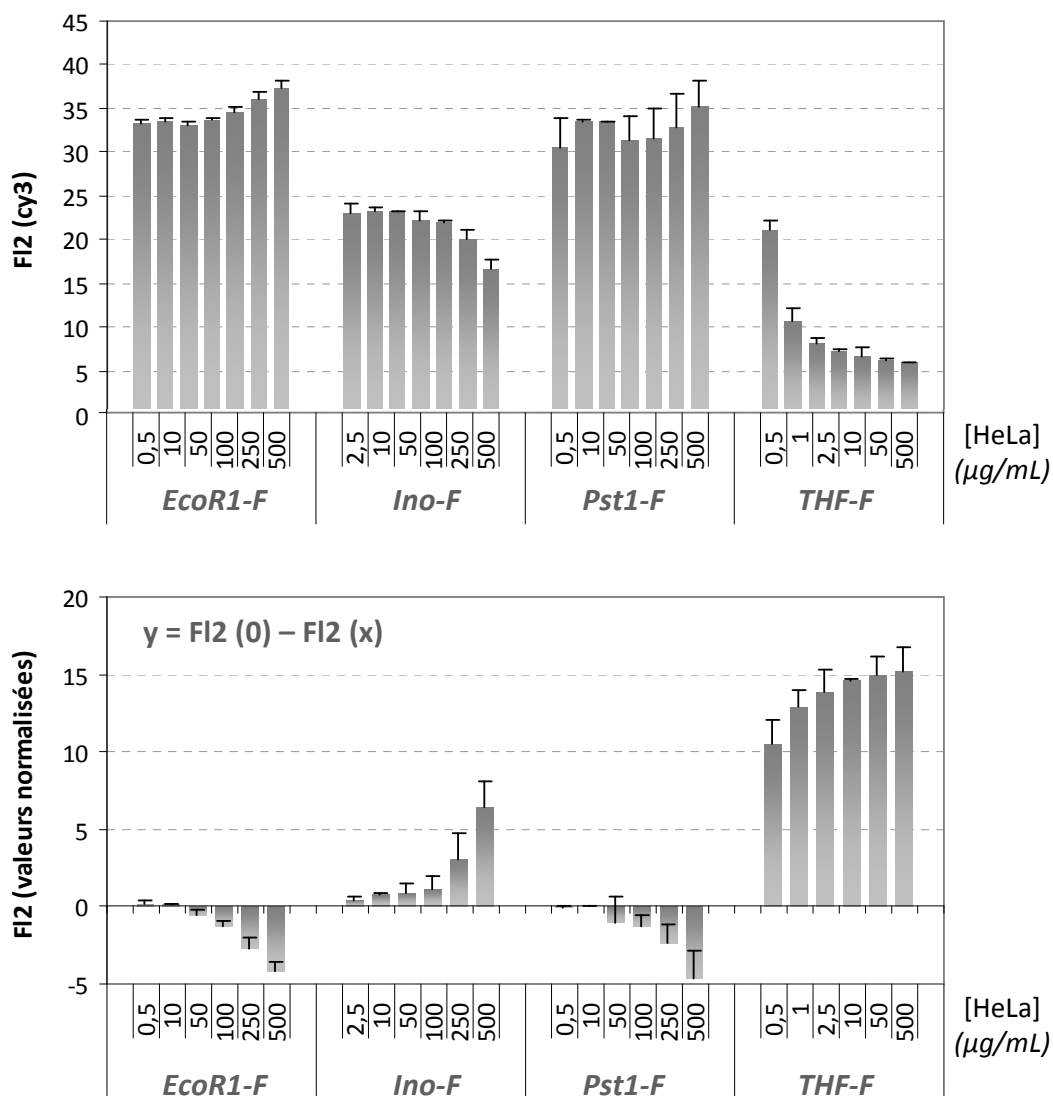


Figure 50: Normalisation des données par rapport au témoin négatif : les données brutes (haut) sont normalisées par rapport au témoin négatif sans extrait (bas).

La question de l'accessibilité de l'hypoxanthine à l'Aag s'est alors posée, en vue d'expliquer le taux de coupure plafonné pour la sonde *Ino-F*. Pour tester ce paramètre, les billes correspondantes ont été incubées avec 500 µg/mL d'extrait HeLa avec ou sans complément d'Aag (fixé à 0.05 u).

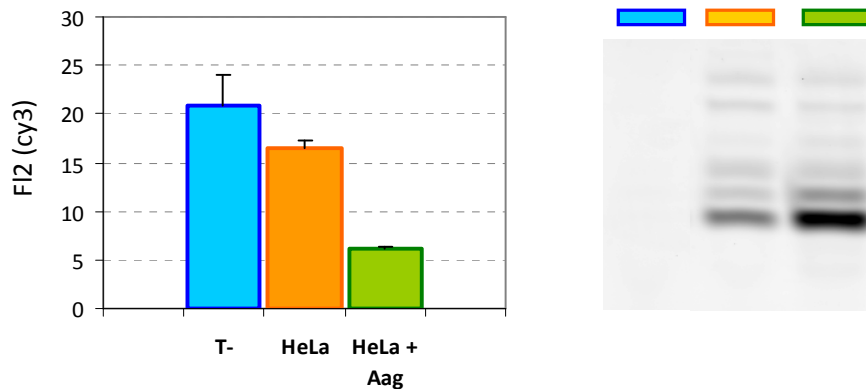


Figure 51: Effet de la complémentation de l'extrait HeLa avec l'AAG purifiée : la sonde *Ino-F* supportée est digérée par 500 µg/mL d'extrait HeLa avec ou sans complément d'Aag (0.05 u). Analyse par cytométrie en flux (gauche) et par PAGE (droite).

On constate que l'addition de l'enzyme purifiée permet de cliver quantitativement les sondes (mesuré par cytométrie en flux et visualisé par PAGE, Figure 51). Ce résultat prouve que l'accessibilité des sondes n'est pas le facteur limitant dans la détection de l'activité glycosylase. En revanche, la faible expression de l'Aag dans la lignée étudiée explique la faible diminution de signal déterminée par cytométrie et confirmée par PAGE.

Ainsi, l'analyse par cytométrie en flux de microbilles supportant les sondes fluorescentes permet de détecter des activités enzymatiques prépondérantes telles qu'APE1 mais également des enzymes présentes en plus faible quantité dans les extraits telles que la glycosylase AAG.

4.2.b. Stratégie « signal on »

La même expérience a été conduite avec les sondes pro-fluorescentes sur support (Figure 52). Étonnamment, on constate que la sonde témoin *Pst1-Q* enregistre un signal fluorescent positif dès 10 µg/mL d'extrait, maximum à 100 µg/mL (Figure 52a). Cette observation rend ininterprétable les données pour les sondes lésées. L'analyse PAGE de la digestion de cette sonde en solution (Figure 52b) révèle la formation d'un produit migrant légèrement plus rapidement, sans dégradation additionnelle, même aux plus grandes concentrations protéiques. Le chromatogramme HPLC de ce produit isolé (Figure 52c) atteste d'un temps de rétention plus faible que l'oligonucléotide substrat ainsi que de l'absence du signal d'absorbance à 453 nm, ordinairement caractéristique du dabcy1. Le spectre UV-visible du composé formé dans l'extrait HeLa confirme l'absence de ce résidu (Figure 52d). Il semblerait donc que l'entité dabcy1, en 3' des sondes *ODN-Q*, soit excisée quasi spécifiquement dans l'extrait nucléaire étudié ici.

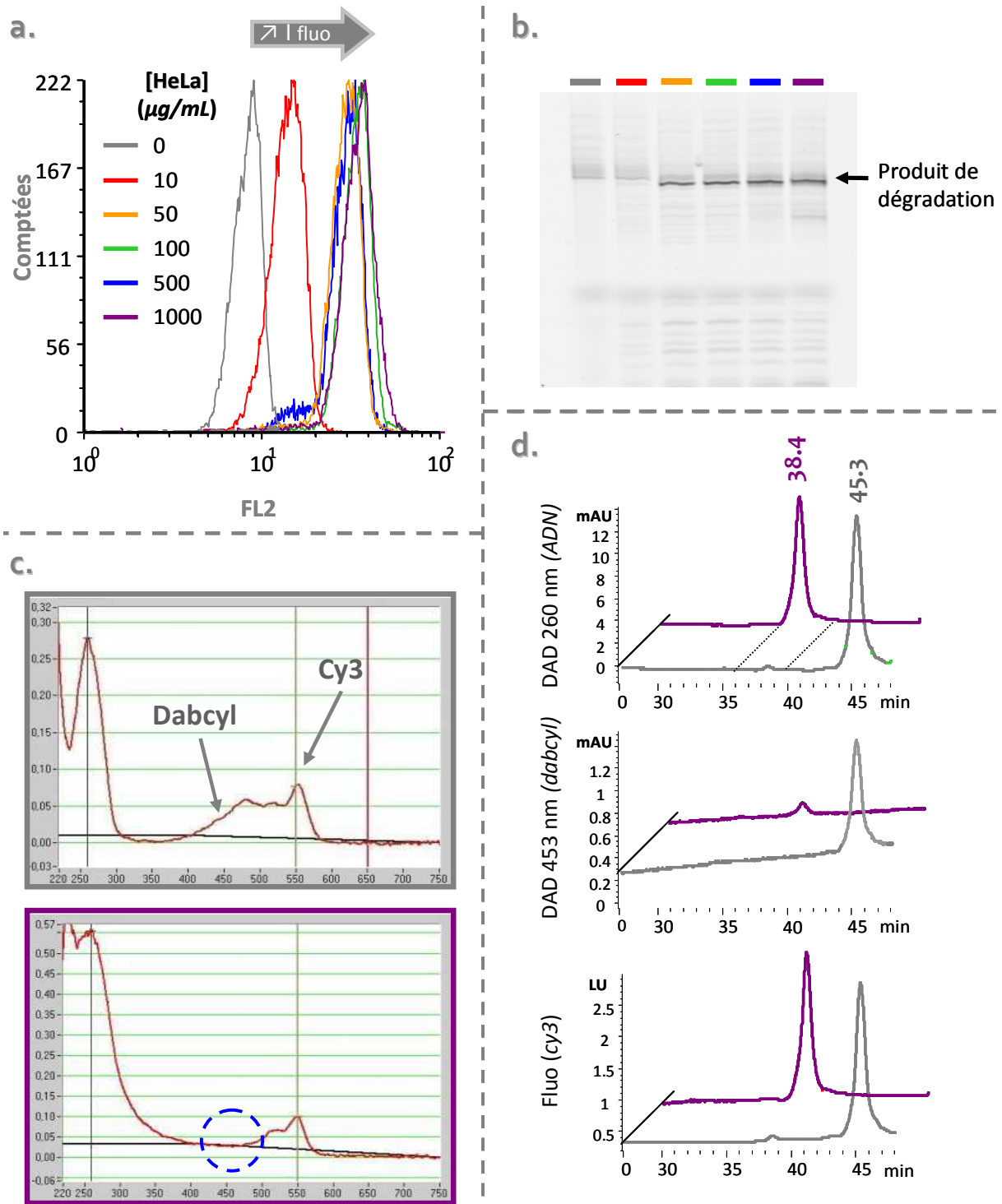


Figure 52: Mise en évidence de la dégradation de la sonde *Pst1-Q* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa: a) Analyse par cytométrie en flux de la digestion de 1 pmol de sonde *Pst1-Q* supportée par une concentration croissante en extrait; b) Analyse par PAGE de la digestion de 1 pmol de sonde *Pst1-Q* en solution par la même gamme d'extrait; c) Spectre UV-visible du produit de dégradation visualisé sur le gel d'acrylamide; d) Chromatogramme de ce même produit (colonne C18 250 x 4.60 mm, 5 µm, 50°C; gradient 0-35 % ACN dans TEAA 10 mM en 40 min): détection en absorbance à 260 nm (haut), à 453 nm (milieu) et en fluorescence (bas, $\lambda_{ex} = 546$ nm; $\lambda_{em} = 563$ nm).

5. Optimisations de la détection par cytométrie en flux

Nous venons d'établir que les sondes *ODN-Q* sont inexploitable pour la détection de la réparation dans les extraits cellulaires du fait de leur dégradation (§ IV.4.2.b). Malgré ce résultat négatif, l'utilisation de sondes quenchées reste pertinente pour l'analyse en temps réel. Ainsi, le test « signal on » a été optimisé selon plusieurs paramètres détaillés ci-après.

5.1. Orientation des oligonucléotides

Tout d'abord il est primordial de stabiliser les sondes en présence d'extraits protéiques. Partant de l'hypothèse que l'excision du quencher dabcy1 dans ces conditions est due à son positionnement à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide, nous avons évalué l'effet de l'inversement de l'orientation du double brin. Les sondes *ODN-Q2* ont été synthétisées dans ce but. L'immobilisation de ces sondes est guidée par l'extrémité 3' tandis que le quencher est introduit à l'extrémité 5'. La digestion par un extrait HeLa des billes fonctionnalisées par la sonde *Pst1-Q2* (dabcy1 5') ou par la sonde *Pst1-Q* (dabcy1 3') démontre que la dégradation de la première est grandement limitée par rapport à la seconde (Figure 53). Ce résultat prouve que l'immobilisation des sondes sur le support par l'extrémité 3' améliore la stabilité des oligonucléotides dans un milieu biologique complexe. Dans cette configuration, le dabcy1 introduit en 5' n'est pas reconnu et excisé par les nucléases cellulaires, validant cette méthode d'analyse pour la détection des activités de la réparation dans les extraits cellulaires.

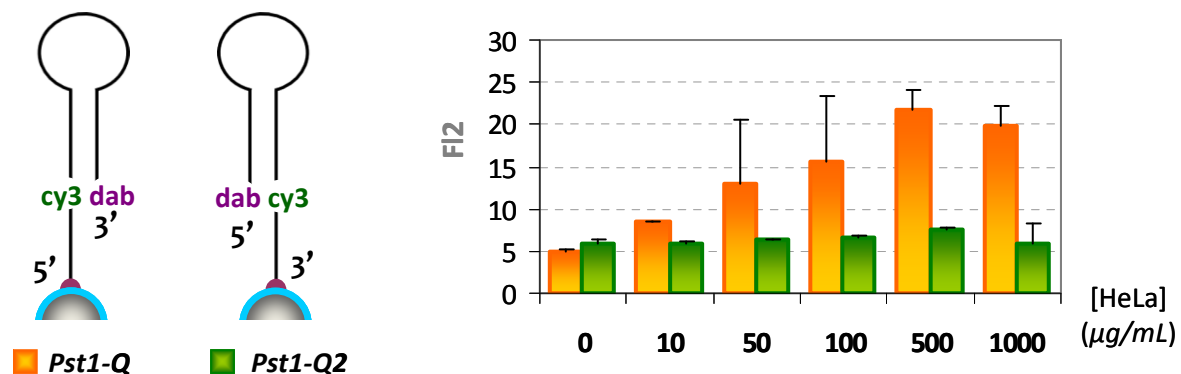


Figure 53: Evaluation de la stabilité des sondes *Q2* dans un extrait nucléaire de cellules HeLa: analyse par cytométrie en flux de la digestion de 1 pmol de sonde *Pst1-Q* ou *Pst1-Q2* supportées par une concentration croissante en extrait.

5.2. Choix du couple de chromophores

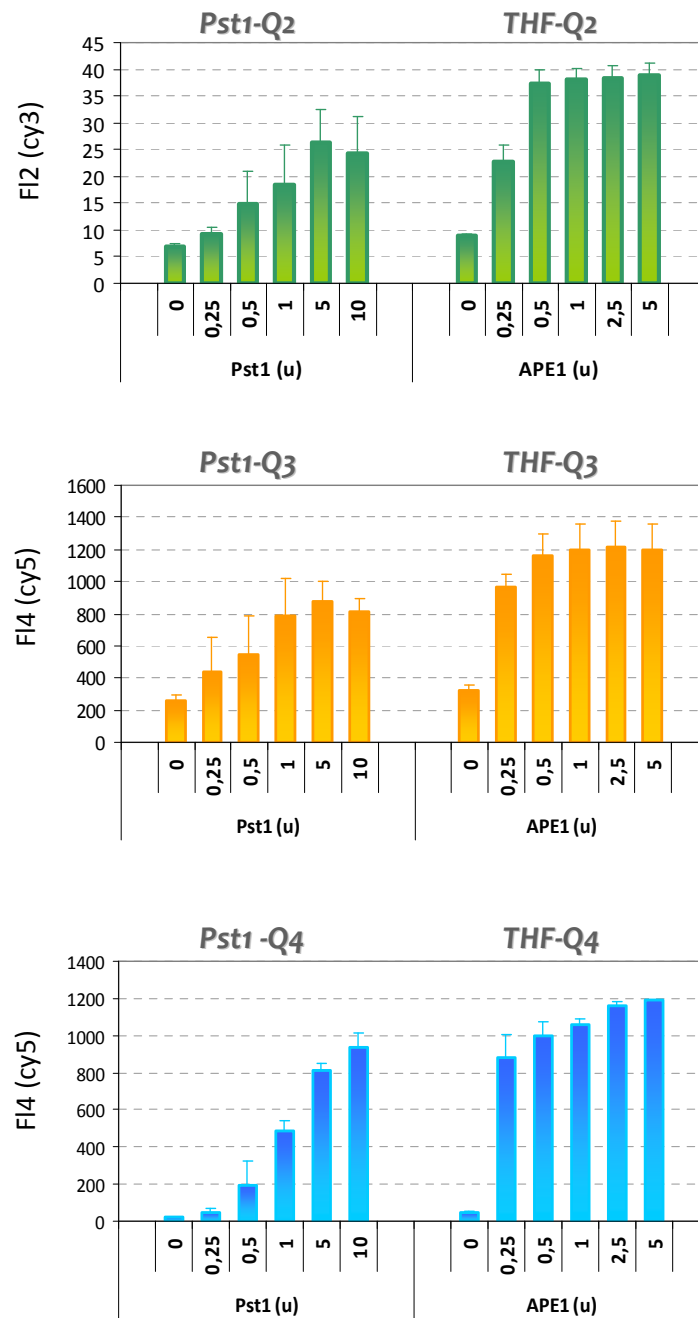
Dans le but d'augmenter le rapport signal sur bruit des billes fonctionnalisées, le remplacement des chromophores a été examiné. En effet, le cytomètre utilisé possède deux sources d'excitation. Un laser à argon fixé à 488 nm et une diode laser émettant à 635 nm. D'après le spectre d'excitation de la cyanine 3, il s'avère que la source à 488 nm ne permet pas d'exploiter au maximum le potentiel de ce fluorophore qui présente un maximum d'excitation à 550 nm. Ceci explique que le signal maximum observé avec le cy3 soit modéré (différence d'un \log_{10} avec le signal minimal). En revanche, la cyanine 5 possède un maximum d'excitation à 650 nm, relativement proche de la longueur d'onde de la diode laser rouge. Par conséquent, nous avons évalué le bénéfice apporté par le remplacement de la cyanine 3 par la cyanine 5. Pour cela, les sondes *ODN-Q2* et *ODN-Q3* sont incubées avec une quantité croissante d'enzymes purifiées (*Pst1* et *APE1* pour les sondes *Pst1* et *THF* respectivement). Les résultats sont reportés en Figure 54. On remarque que le signal maximal mesuré est nettement supérieur dans le cas du marquage des sondes avec la cyanine 5 par rapport à la cyanine 3. Notons que ces valeurs sont exprimées en unités arbitraires et dépendent du réglage du photomultiplicateur correspondant (détecteur F12 pour le cy3 et F14 pour le cy5). Ainsi, elles ne sont pas directement comparables entre elles. Néanmoins, la différence de signal de deux logs décimaux permet de conclure que la cyanine 5 est un marqueur plus adapté, du fait de sa brillance accrue et de l'excitation optimisée.

D'autre part, il se trouve que le bruit, c'est-à-dire le signal mesuré pour les billes en absence de digestion, est également augmenté. Dans ce cas, le dabcy1 n'apparaît pas comme le quencher idéal de la cyanine 5 ($\text{EffQ}^{30} = 75\%$). Ce résultat a été présenté dans le paragraphe II.4.3.

Le quenching de la cyanine 5 a été amélioré par le remplacement du dabcy1 par le *Black Hole Quencher 2* (BHQ-2). Dans ce cas, on observe que le signal après coupure reste centré autour de 10^3 u.a. (Figure 54). Surtout, le bruit est diminué d'un facteur 7 par rapport aux sondes *ODN-Q3*. L'efficacité de quenching pour le couple cy5/BHQ-2 est supérieure à 95 %. Il est intéressant de noter que la sonde *Pst1-Q4* enregistre un meilleur rapport signal/bruit (« *signal to noise ratio* », STNR). Que la sonde *THF* associée. Ce différentiel est attribué à l'emploi d'un synthon différent pour la synthèse de la sonde *Pst1-Q4*, réalisée par la société *Eurogentec*. Dans ce cas, la cyanine 5 est introduite *via* un conjugué désoxythymidine (dT-cy5). Nous supposons que le degré de liberté supplémentaire apporté par le linker entre le résidu thymidilate et la cyanine 5 permet d'optimiser l'interaction avec le quencher et favorise le transfert d'énergie. Dans le cas de la sonde *THF-Q4*, la cyanine 5 est insérée *via* le phosphoramidite correspondant, sous-entendant une flexibilité réduite à l'intérieur du double

³⁰ EffQ= efficacité de quenching i.e. le rapport maximum entre le signal mesuré pour la sonde clivée et celui de la sonde quenchée.

brin. Cette observation sera également manifeste quel que soit le support utilisé et la méthode de détection employée.



<u>STNR</u>	<i>Pst1</i>	<i>THF</i>
Cy3/Dab	3.9	4.9
Cy5/Dab	3.4	3.7
Cy5/BHQ-2	41.8	25.9

Figure 54: Optimisation du choix des chromophores et évaluation du rapport signal sur bruit (STNR) : les sondes *Pst1* et *THF* supportées sur microbilles D sont incubées avec une quantité croissante de l'enzyme purifiée correspondante (1h, 37°C). Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux sont reportés sous forme d'histogrammes.

En conclusion, il apparaît que le couple cy5/BHQ-2 est le plus adapté pour la détection du clivage des sondes quenchées supportées. Cependant, certaines expériences décrites dans la suite de ce manuscrit sont réalisées avec les sondes Q2 ou Q3, du fait de la chronologie de synthèse des différentes sondes.

5.3. Changement de support

La cytométrie étant une technique permettant de mesurer la fluorescence de particules une à une, le changement de support est un facteur important, susceptible de modifier la sensibilité de notre outil. Dans le but d'optimiser ce paramètre, nous avons remplacé les billes D par des billes de plus grand diamètre fournies par la société Kisker. Ces nouvelles particules magnétiques (billes K) ont un diamètre compris entre 4 et 4,5 μm et sont fonctionnalisées par des groupements biotine covalentement couplés à l'albumine de sérum bovin (BSA). Ainsi, les billes K sont préalablement fonctionnalisées par un excès de streptavidine. Cette protéine possédant quatre sites de fixation, elle autorise l'immobilisation consécutive des sondes ODN-Q4. Le biocapteur ainsi obtenu, chaque lot de sondes (*Pst1* ou *THF*) est, comme précédemment, digéré par une gamme croissante d'enzymes purifiées avant d'être analysé par cytométrie en flux. Les résultats présentés en Figure 55 indiquent que ces nouvelles billes permettent un gain supplémentaire de signal d'un facteur 1.8. Ce dispositif, utilisant des billes d'une taille supérieure, semble être un bon candidat dans la perspective de développer un test plus sensible.

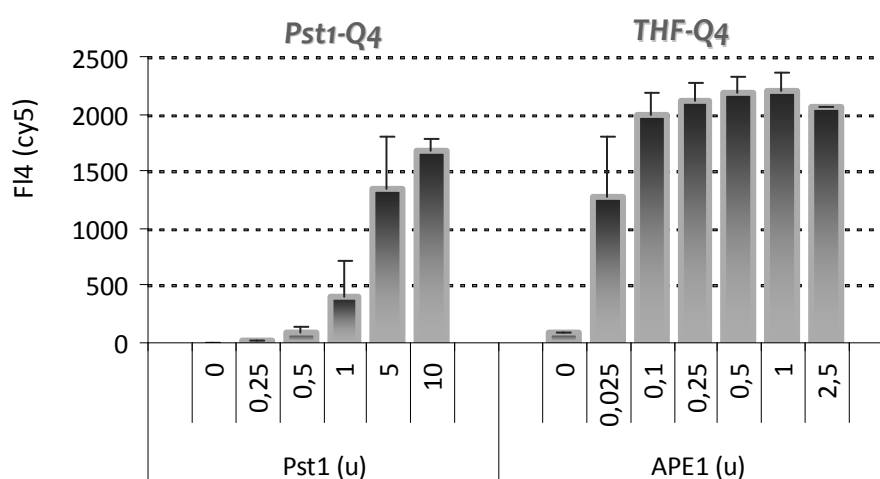


Figure 55: Analyse par cytométrie en flux de la digestion des sondes *Pst1-Q4* et *THF-Q4* supportées sur billes K par l'enzyme purifiée correspondante.

Afin justement d'évaluer la sensibilité de cet outil, une nouvelle sonde a été synthétisée dans le but de détecter les activités uracile *N*-glycosylases. Ces enzymes conservées des bactéries aux mammifères sont des glycosylases monofonctionnelles capables d'exciser spécifiquement les bases uracile présentes dans l'ADN simple ou double brin mais pas dans l'ARN (c.f. I.5.2). La sonde d'ADN contient donc dans la tige, une désoxyuridine remplaçant une désoxycytidine (c.f. Tableau 6). La Figure 56 montre les résultats de l'analyse par cytométrie de la digestion de la sonde *Ura-Q4* supportées sur billes *K*. On observe que la limite de détection de l'activité UDG de *E. Coli* (*Biolabs*) est de $5 \cdot 10^{-5}$ u soit $5 \cdot 10^{-3}$ u/mL. Une étude récente relatant la détection de cette même enzyme par un biocapteur électrochimique expose une limite de détection basse sensiblement supérieure de $8 \cdot 10^{-3}$ u/mL [776].

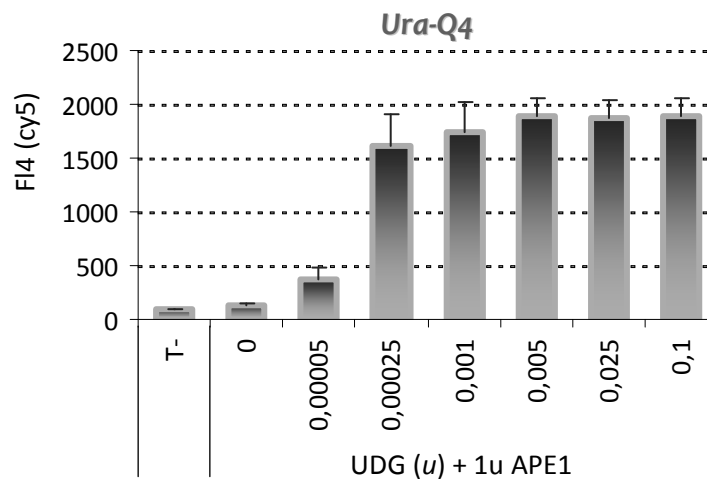


Figure 56: Analyse par cytométrie en flux de la digestion de la sonde *Ura-Q4* supportée sur billes *K* par l'UDG purifiée (+ 1 u APE1).

La confirmation de la spécificité des sondes est donnée par l'analyse PAGE de la digestion des sondes *Ura* et *THF-Q4* par les enzymes ciblées UDG et APE1, respectivement (Figure 57): le clivage de la sonde portant la lésion uracile est observé uniquement lorsque UDG et APE1 sont présents (ligne 3). Or cette même sonde n'est pas coupée par l'action de l'AP-endonucléase seule (ligne 2), contrairement à la sonde incluant l'analogue de site abasique *THF* (ligne 5).

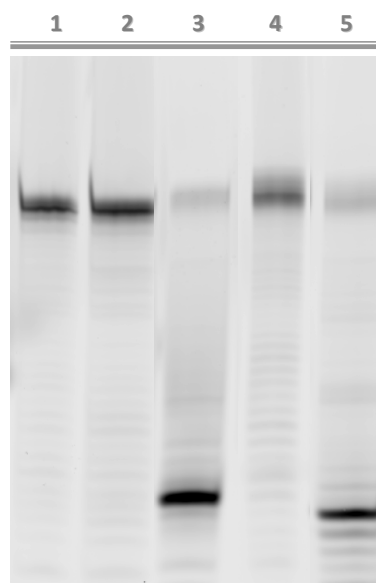


Figure 57: Validation de la spécificité des sondes pour la détection des enzymes ciblées : analyse PAGE de la digestion des sondes *Ura-Q4* (lignes 1-3) et *THF-Q4* (lignes 4-5) en solution (1 pmol, 100 nM), par les enzymes purifiées. Lignes 1 et 4 = témoins négatifs, lignes 2 et 5 = 1 u APE1, ligne 3 = 0.1 u UDG + 1 u APE1.

Des expériences complémentaires ont été menées afin de visualiser les cinétiques des digestions enzymatiques pour les trois sondes immobilisées sur les billes **K**. La Figure 58 montre la relation dose-réponse qu'il existe entre la quantité d'enzyme utilisée et l'augmentation de la fluorescence au cours du temps. Aussi, on constate que la sonde *Pst1-Q4* enregistre un signal initial environ deux fois plus faible que pour les deux autres sondes lésées. Comme théorisé dans le paragraphe IV.5.2, le meilleur quenching apparent de la sonde non lésée résulterait de l'utilisation d'un monomère fluorescent plus à même d'être proche du quencher (conjugué cy5-dT). En revanche, cette même sonde atteint un signal maximal 2 à 2.5 fois plus faible que pour les sondes THF et *Ura-Q4* (20 000 contre 45-50 000 u.a.). Or, cet écart n'est pas aussi prononcé lors de la détection par cytométrie en flux (Figure 55). Bien qu'aucune explication n'ait été avancée pour cette observation, nous pouvons émettre l'hypothèse que ce phénomène résulte de l'adsorption non spécifique, ou par hybridation du fragment nucléique généré par le double clivage enzymatique de *Pst1* (séquence de 8 monomères de l'extrémité 5', incluant le quencher). Dans le cas de la digestion par les enzymes de la réparation un seul fragment plus long est libéré, dont l'interaction avec la surface des billes devrait être minimisée du fait de sa taille (29-30 monomères). Egalement, l'utilisation du conjugué dT-cy5 (sonde *Pst1*) plutôt que du phosphoramidite cy5 pourrait jouer un rôle. On peut imaginer que l'interaction avec le BHQ2 est plus stable dans le premier cas que dans le second et serait suffisamment énergétique pour retenir en partie le quencher à proximité du fluorophore, même après la coupure. La resuspension des billes dans du PBS contenant 0.2 % de Tween 20 avant

l'analyse par cytométrie permettrait la rupture de ces interactions, expliquant ainsi une différence d'intensité de signal mineure dans ce cas.

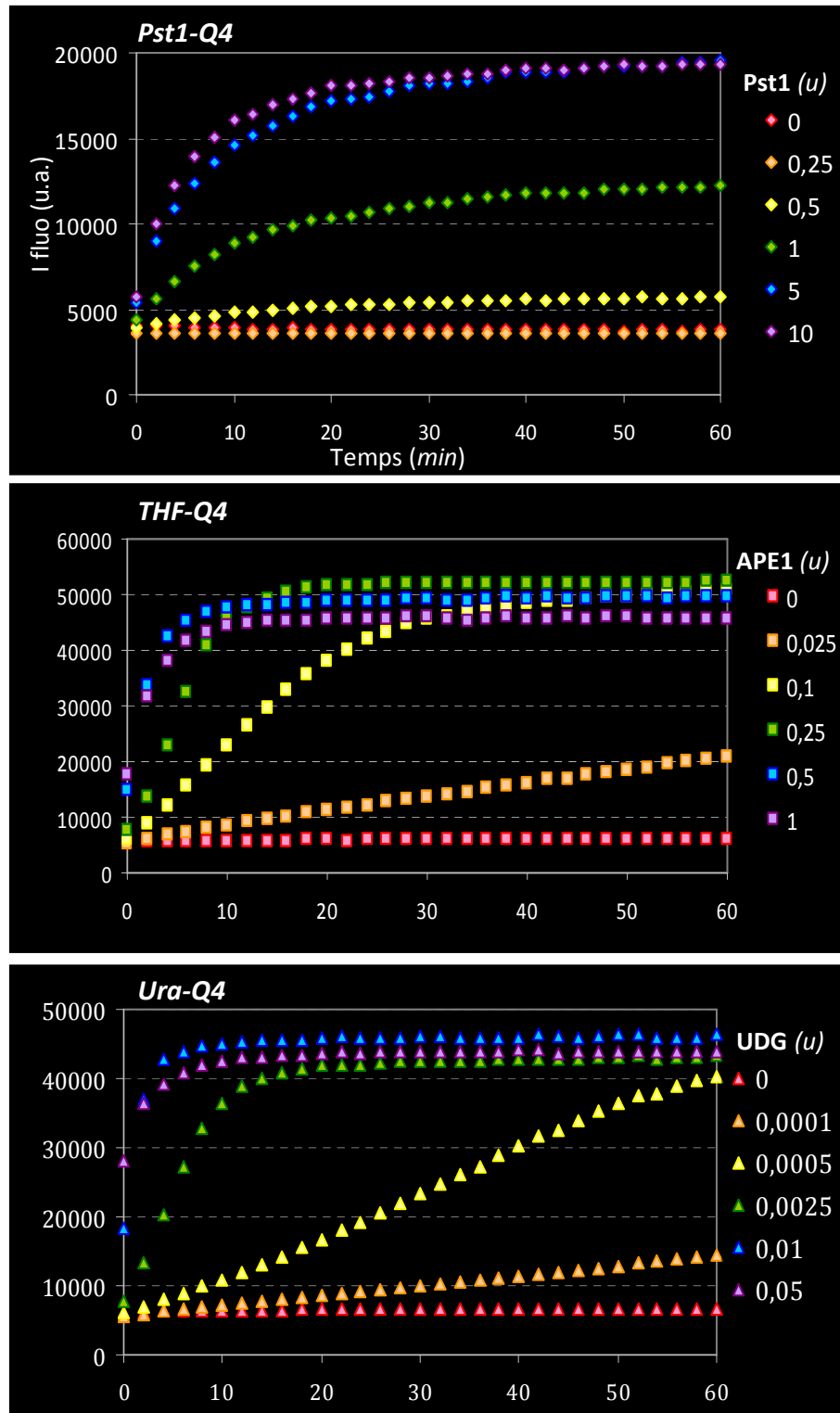


Figure 58: Cinétique de coupure des sondes *ODN-Q4* supportées sur billes K par les enzymes purifiées correspondantes (1h à 37°C). Détection en temps réel par fluorescence avec un appareil de type thermocycleur.

6. Expériences applicatives

Dans cette partie seront exposés quelques exemples d'applications mises en œuvre pour évaluer la spécificité, la sensibilité et la solidité de notre biocapteur et de la méthode de détection associée.

6.1. *Détection des activités APE1 et UNG dans les extraits de cellules HeLa*

La détection des activités de la BER à partir d'extraits nucléaires HeLa a été évaluée. Les billes **D** sont fonctionnalisées par les 3 oligonucléotides *Pst1*, *THF* et *Ura-Q4*. Les billes sont ensuite incubées avec une concentration variable d'un extrait nucléaire de cellules HeLa. Le clivage des sondes est suivi en temps réel à 37°C par mesure de fluorescence (Figure 59a). Finalement, les particules sont suspendues dans du PBS et analysées par cytométrie en flux (Figure 59b). La résistance du biocapteur est validée par l'absence de dégradation des sondes non lésées *Pst1-Q4*. Pour les billes *THF-Q4*, nous retrouvons des caractéristiques similaires aux billes *THF-F* : La limite de détection basse est inférieure à 1 µg/mL d'extrait tandis que le signal maximum est obtenu pour 10 µg/mL. Aussi, l'activité uracile glycosylase dans ce même extrait est détectée également dès 1 µg/mL et est dose-dépendante de la concentration en protéines.

On constate également que la vitesse initiale de digestion augmente avec la concentration en extrait (Figure 59a). Comme on pouvait s'y attendre, la cinétique de coupure des sondes *THF-Q4* est plus rapide que pour les sondes *Ura-Q4*. L'hypothèse la plus probable est que le clivage de la sonde *THF* nécessite l'action d'APE1 uniquement alors que la sonde *Ura* est incisée suite à l'action conjointe de la glycosylase puis d'APE1. Dans le cas de la réparation de l'uracile par les extraits nucléaires, nous faisons principalement référence à la réparation par la glycosylase prépondérante UNG2 [427, 737]. Toutefois, il n'est pas exclu que d'autres ADN N-glycosylases participent à l'excision de cette lésion dans les conditions du test. Nous pouvons raisonnablement penser que SMUG1 joue un rôle non négligeable dans ce contexte [358]. TDG et MBD4, plus spécialisés, joueraient un rôle modeste. L'utilisation d'extraits déficients en UNG2 permettrait d'évaluer la contribution des autres glycosylases à la réparation des sondes supportées développées [436].

D'autres effets peuvent expliquer cette différence de cinétique : il est possible que l'activité d'UNG dans le tampon commun de digestion ne soit pas optimale (force ionique, présence de cofacteurs ou de protéines accessoires telle que PCNA [427, 432]). Notamment, il a été montré

qu'UNG est stimulée par la présence de Mg^{2+} [354], cation absent du tampon de digestion pour limiter la dégradation non spécifique par les nucléases.

La fluorescence finale enregistrée par le lecteur de fluorescence ($t = 60$ min) corrèle avec l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux. En effet, on relève un signal maximal à 10 et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les sondes *THF* et *Ura-Q4* respectivement, avec ces deux méthodes de détection.

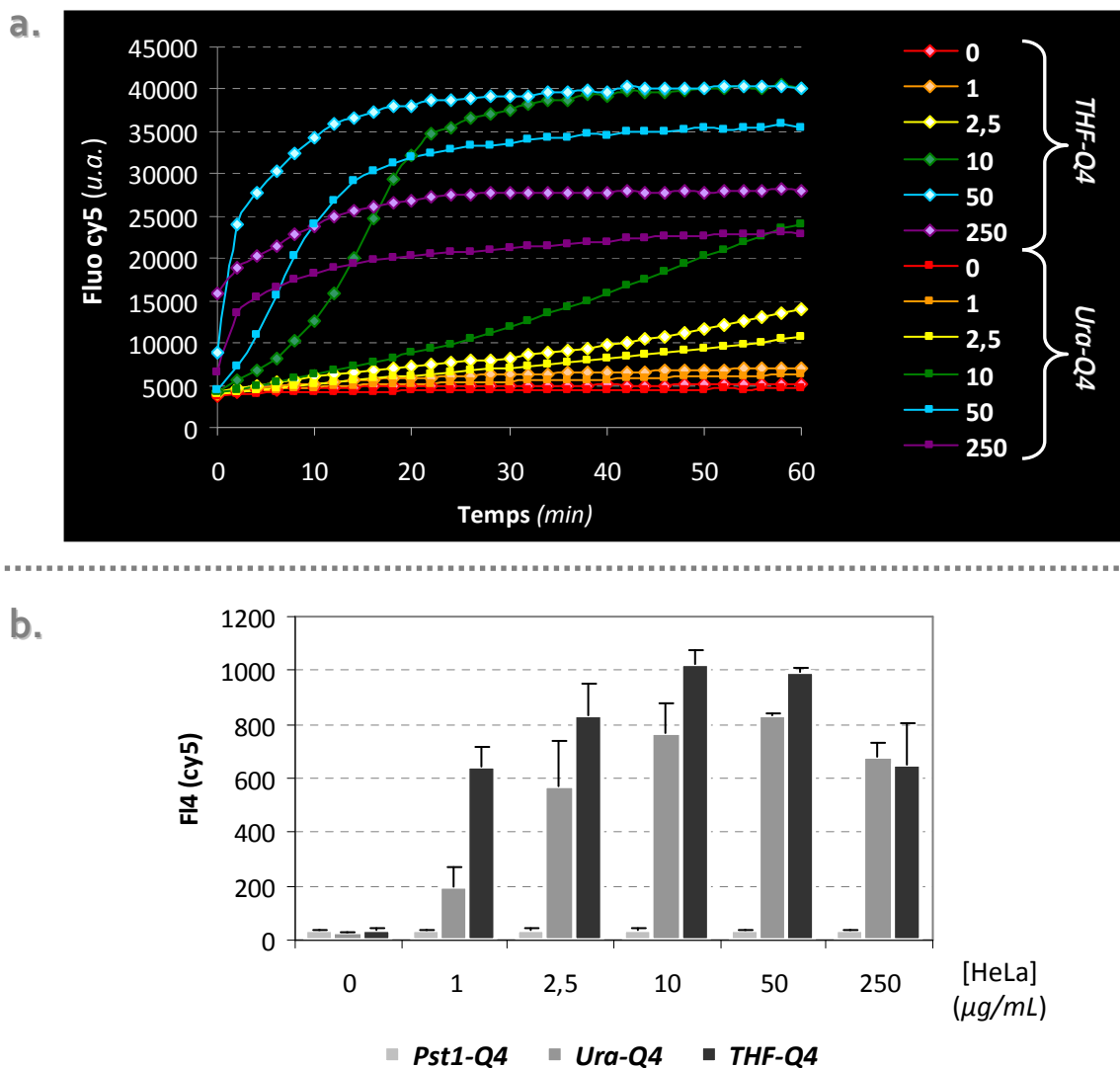


Figure 59: Détection des activités APE1 et UNG à partir d'un extrait nucléaire de cellules HeLa: a) détection en temps réel de la digestion d'1 pmol de sonde THF-Q4 ou Ura-Q4 par une gamme d'extrait (1h, 37°C) suivi de b) l'analyse par cytométrie en flux des microbilles fonctionnalisées.

6.2. Etude des activités de lignées de glioblastomes humains LN428

Dans le chapitre I, nous avons discuté du rôle des systèmes de réparation de l'ADN, plus précisément de leur dysfonctionnement, dans l'étiologie de pathologies telles que le cancer, certaines maladies génétiques ou neurodégénératives. Plusieurs déficiences sont mises en cause dans les processus de carcinogénèse, c'est-à-dire dans le développement et l'installation de la maladie. En outre, il a été montré qu'une surexpression ou sous expression d'une enzyme de la réparation, dont certaines du BER, peut être à l'origine de phénomènes de résistances aux traitements anticancéreux, entravant la rémission. L'enjeu actuel de la médecine est de mettre au point des traitements personnalisés, adaptés à chaque patient afin de combattre au mieux la progression tumorale³¹. Dans cette expectativa, il est nécessaire de disposer de tests rapides et sensibles capables de discriminer les différences d'activités enzymatiques liées à ces résistances. L'outil développé ici a été soumis et validé vis-à-vis de différents extraits nucléaires afin d'évaluer ses capacités de discrimination.

Le modèle choisi pour cette étude est une lignée de glioblastome humain LN428, p53 déficient (société *Trevigen*). La lignée est dérivée en deux sous-lignées : l'une, contrôle (KD-CTRL), exprime un plasmide « vide » (sans fonction); L'autre exprime un plasmide codant pour un shARN (« *small hairpin* » ARN) dirigé contre APE1. Ainsi, cette seconde population cellulaire sous produit cette enzyme (« knowdown APE1 », KD-APE1) par la technique d'interférence par ARN (cf. Figure 60). Brièvement, le plasmide possède un promoteur d'expression qui n'est ni spatialement ni temporellement régulé afin de promouvoir une inhibition constitutive de la production de la protéine cible. Ainsi, le plasmide est traduit en pré-shARN (ARN pré-messager) qui va lui-même être métabolisé en shARN. Cette entité nucléique est en fait un fragment d'ARN auto-complémentaire et donc double brin. Ce double brin d'ARN est reconnu par l'endoriboucléase Dicer, qui le morcèle en fragments courts de 20 à 25 nucléotides, nommés siARN (pour « *small interfering* » ARN ou ARN interférents). Ces fragments nucléiques sont pris en charge par le complexe multiprotéique RISC (« RNA-induced silencing complex ») qui, par une sous unité hélicase, déshybride le double brin. Le brin « passager » est alors éliminé tandis que le brin « guide » reste intégré au complexe. Celui-ci, complémentaire d'une portion de l'ARN ciblé (en l'occurrence codant pour la protéine APE1), s'hybride alors à ce dernier nouvellement synthétisé. L'unité catalytique Argonaute (Ago2) du

³¹ Au-delà des contraintes économiques restreignant la pratique à grande échelle d'une telle médecine personnalisée.

complexe RISC dégrade l'ARN cible, par son activité RNase, empêchant *in fine* sa traduction en protéine.

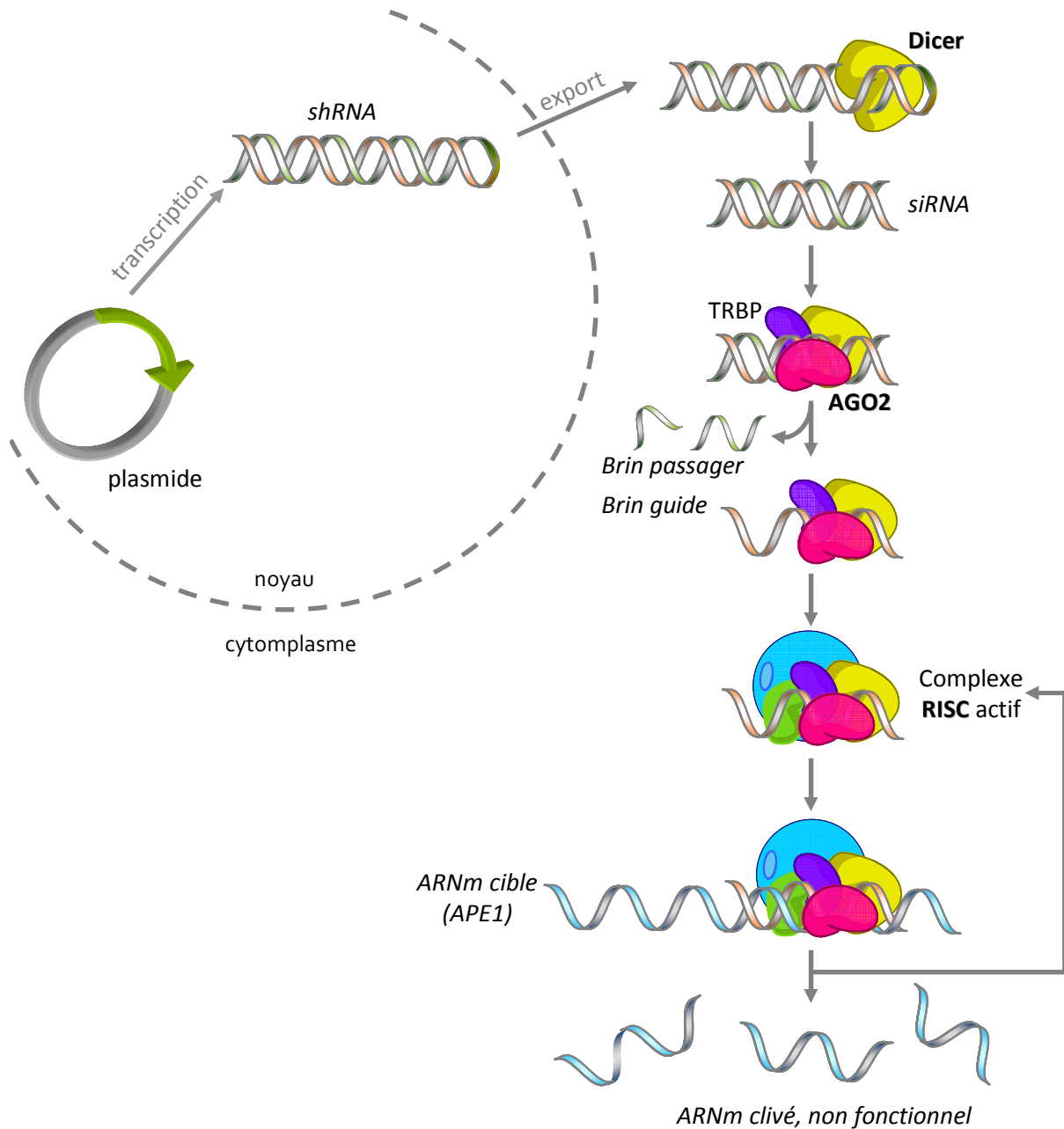


Figure 60: Principe de l'inhibition de la production de la protéine APE1 par interférence à ARN: un plasmide exprimant un shARN dirigé contre l'ARNm codant pour la protéine est introduit dans une lignée cellulaire. Le shARN traduit à partir du plasmide est exporté dans le cytoplasme où il est métabolisé par l'endoribonucléase Dicer qui génère des ARN interférents (siARN) de 20-25 nucléotides. Le brin, dit « guide », est intégré dans le complexe RISC tandis que le brin « passager » est éliminé. L'hybridation du brin guide à sa cible (ARNm de codant pour APE1) conduit à la dégradation de ce dernier par la protéine Ago2. Le cycle hybridation/dégradation induit la déplétion du pool d'ARNm et par conséquent la baisse de la production de l'enzyme.

Nous avons préparé des extraits nucléaires des deux lignées cellulaires KD-CTRL et KD-APE1, en accord avec le protocole détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Préalablement, nous avons montré, de même qu'avec les extraits HeLa, que la sonde non lésée supportée (*Pst1-Q3*) n'est pas dégradée dans ces extraits nucléaires (Figure 61).

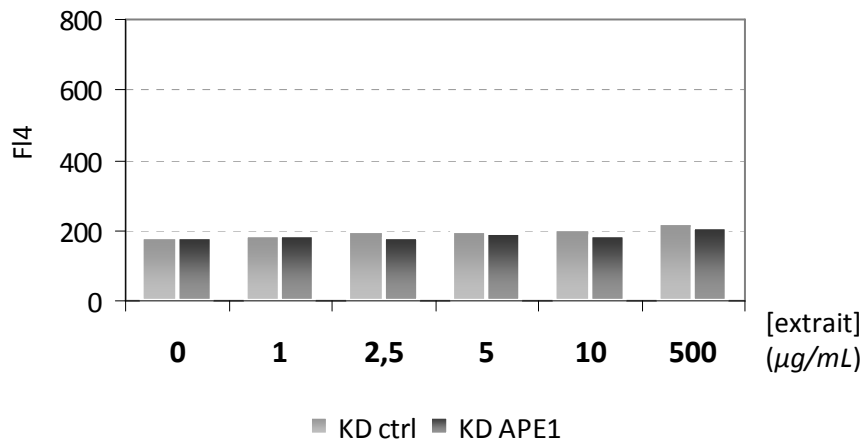


Figure 61: Mise en évidence de la stabilité des sondes *Q4* au sein des extraits nucléaires de cellules KD-CTRL et KD-APE1 : analyse par cytométrie en flux de la digestion de la sonde *Pst1-Q4* supportée sur bille K par une gamme d'extrait.

L'activité APE1 dans les deux lignées a été déterminée avec les microbilles **D** conjuguées à la sonde *THF-Q3*. La détection du clivage des oligonucléotides en temps réel est couplée à une analyse en point final par cytométrie en flux (Figure 62). Les résultats des mesures cinétiques sont normalisés par rapport au témoin négatif, sans extrait. L'analyse par cytométrie en flux révèle une baisse significative de l'activité APE1 dans les extraits déficients par rapport aux extraits contrôles à 0.5 et 1 µg/mL de protéines (p-valeur = 0.007 et 0.005, respectivement). Aussi, cette différence s'estompe à de plus grandes concentrations en extraits (p = 0.16 à 2.5 µg/mL et non significatif à 5 µg/mL). L'analyse étant réalisée après 60 minutes d'incubation, il est raisonnable de penser que dans ce laps de temps, la quantité d'enzymes présente dans l'extrait KD-APE1, bien que plus faible que dans l'extrait KD-CTRL, est suffisante pour cliver quantitativement la sonde contenant le site abasique. Néanmoins, la cinétique d'apparition de fluorescence traduit une diminution effective de la vitesse de clivage des sondes, attribuée à une production d'APE1 réduite. A un temps donné, l'écart entre les deux lignées devient significatif : on note une p-valeur < 5 % entre 21 et 60 minutes pour 1 µg/mL d'extrait, entre 20 et 40 minutes pour 2.5 µg/mL d'extrait et entre 1 et 15 minutes pour 5 µg/mL. Ces résultats rendent compte de l'importance de l'effet cinétique pour la discrimination d'activités au sein de deux lignées cellulaires. Suite à ces expériences, il serait intéressant de réaliser une analyse

par cytométrie en flux à des temps inférieurs (30 minutes, 15 minutes) afin de comparer la significativité de ce résultat.

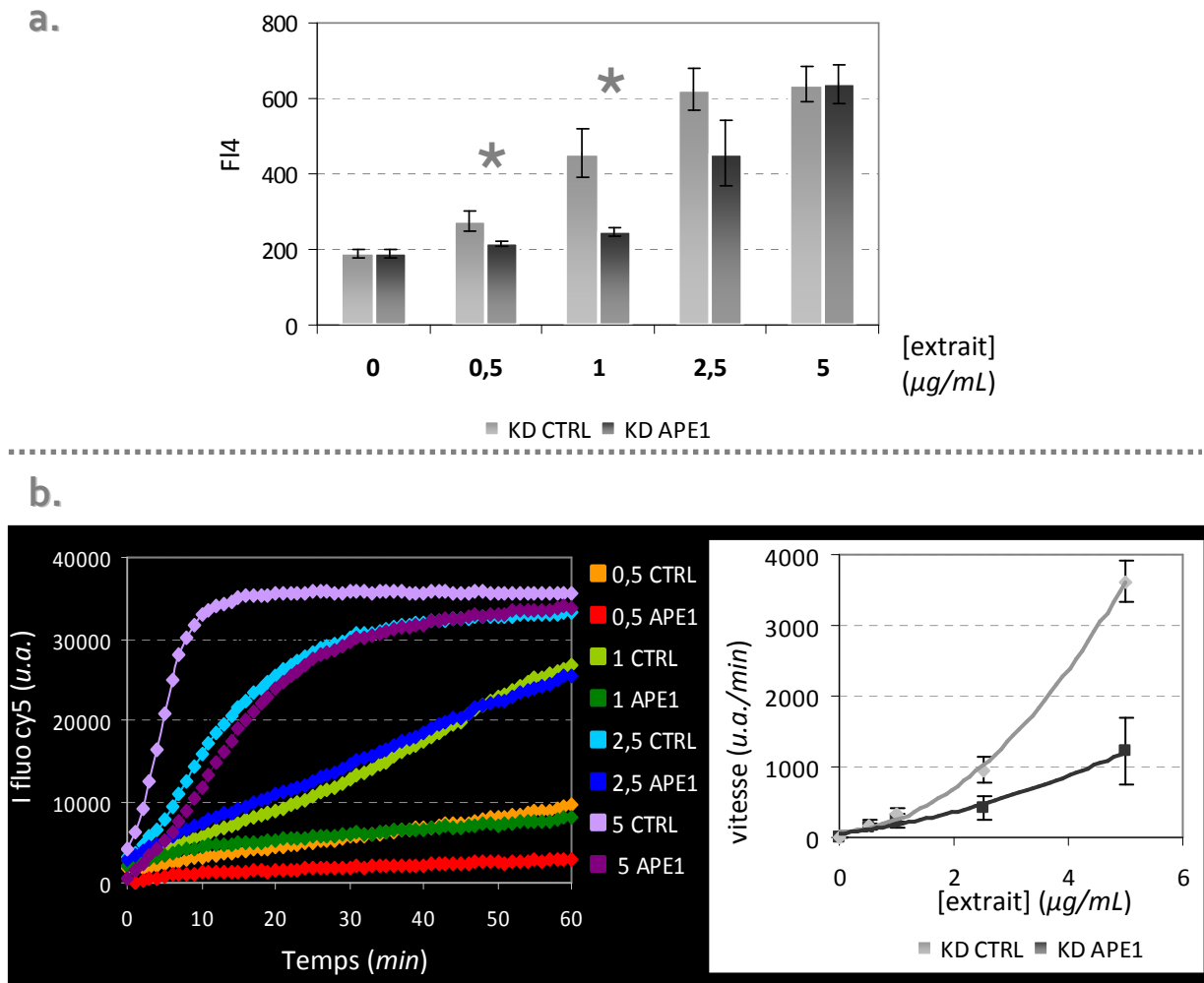


Figure 62: Détection de l'activité APE1 à partir des extraits nucléaires de cellules KD-CTRL et KD-APE1 : a) analyse par cytométrie en flux de la digestion de la sonde *THF-Q4* supportée sur billes K par une gamme d'extraits ; b) détection de l'activité APE1 en temps réel à partir des mêmes échantillons et calcul de la pente à l'origine : les résultats sont normalisés par rapport au témoin sans extrait.

Partant du postulat établi que l'activité APE1 est plus faible dans la lignée knockdown, nous avons évalué la sensibilité de cette lignée vis-à-vis de la méthoxyamine (Mx), inhibiteur spécifique de l'AP-endonucléase (cf. § III.4.3). Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes : les billes **D**, fonctionnalisées par la sonde *Ino-F*, sont incubées avec une concentration fixée à 2.5 µg/mL d'extraits KD-CTRL ou APE1 auxquelles est ajoutée 0.05 u d'Aag. Cette concentration correspond à la concentration minimale pour obtenir 100 % de coupure des sondes quel que soit l'extrait. Le complément d'Aag est nécessaire pour la conversion quantitative des résidus désoxyinosine en sites abasiques. De là, une gamme en concentration de Mx est réalisée pour chaque lignée. Les mesures de la fluorescence des surnageants par spectrofluorimétrie et de la fluorescence des billes par

cytométrie sont synthétisées en Figure 63. Nous notons tout d'abord qu'il n'y a pas de différence de signal significative entre les deux extraits, en absence de méthoxyamine. Aussi, l'inhibition concentration-dépendante de la coupure de la sonde se traduit par une diminution de la fluorescence enregistrée dans le surnageant (ND-3300) et donc réciproquement par une augmentation du signal des microbilles (FI2, FACScalibur). Nous constatons un écart significatif entre les lignées KD-CTRL et KD-APE1 à 1 et 5 mM pour les deux méthodes de détection ($p < 0.01$ pour cytométrie en flux et $p < 0.05$ pour spectrofluorimétrie). Nous pouvons rationnellement conclure que notre outil, basé sur un test fonctionnel, est capable de mettre en évidence une différence de sensibilité à un inhibiteur entre deux lignées cellulaires (en l'occurrence de l'activité APE1 dans le cas présent).

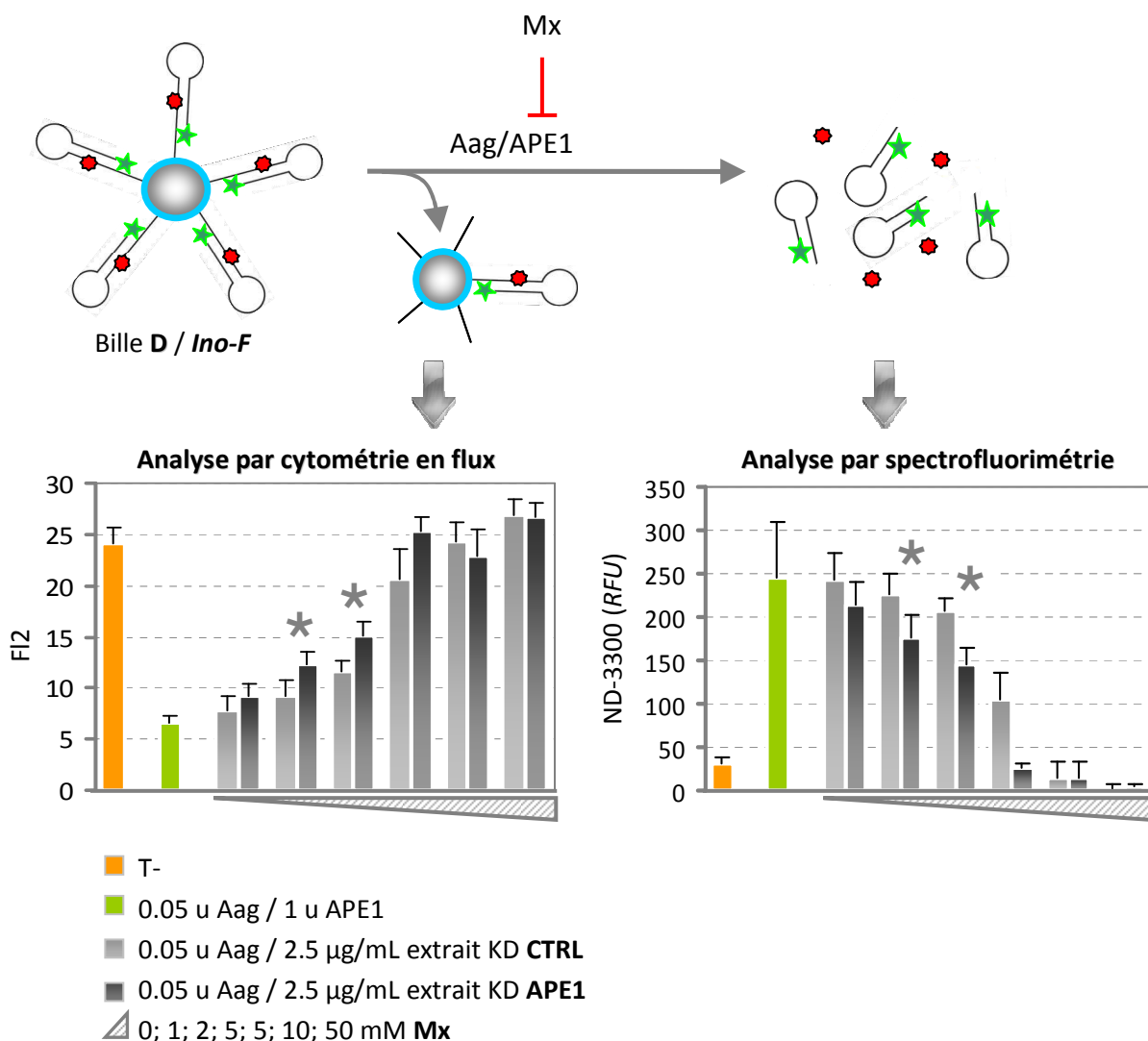


Figure 63: Effet de la méthoxyamine sur la coupure de la sonde *Ino-F* par les extraits KD-CTRL et KD-APE1: 1 pmol de sonde supportée sur billes K est co-digérée par 2.5 µg/mL d'extrait dopé avec 0.05 u d'Aag purifiée en présence d'une concentration croissante en Mx (1h, 37°C). Analyse parallélisée des billes par cytométrie en flux (gauche) et du surnageant par spectrofluorimétrie.

7. Conclusion

L'utilisation de la cytométrie en flux pour la détection d'activités du BER s'est avérée fiable et efficace. La mesure d'activités d'enzymes purifiées est possible et ce avec une bonne sensibilité. Toutefois, il a fallu optimiser la synthèse des sondes pour pallier aux premières limitations de notre test. L'emploi de sondes quenchées plutôt que fluorescentes n'a pas permis d'augmenter la sensibilité de notre outil, mais s'avère indéniablement avantageux dans le but de suivre en temps réel la réparation des lésions. Cependant, nous avons mis en évidence un phénomène de dégradation des oligonucléotides pro-fluorescents dans un extrait cellulaire, lorsque le quencher est inséré à l'extrémité 3' (*ODN-Q*). L'inversement de l'orientation des sondes (*ODN-Q2*) a permis de stabiliser celles-ci vis-à-vis des nucléases cellulaires. Partant de cette configuration, la sonde a été optimisée pour obtenir le meilleur rapport signal sur bruit, nécessaire pour améliorer encore la sensibilité de la méthode de détection. Nous avons conclu que le couple cy5/BHQ2 (*ODN-Q4*) répondait à ces exigences de par l'excellente brillance du fluorophore et l'efficacité supérieure du quencher par rapport au résidu dabcy1.

L'ensemble des expériences menées a démontré une très bonne reproductibilité et une variabilité intra et inter-expérience faible. Pour preuve, le traitement des résultats ne requiert pas de technique de normalisation afin de corrélérer les données entre les manipulations. Notons toutefois, une variabilité des signaux maximums, dépendante de la qualité de l'oligonucléotide utilisé, et notamment de l'intégrité du fluorophore. Dans les perspectives générales de ce travail de thèse, nous proposons une nouvelle méthode d'obtention de ces sondes, pouvant pallier à ce problème et faciliter les synthèses.

La cytométrie en flux autorise l'analyse rapide de plusieurs dizaines d'échantillons (10-15 secondes par tube). Un dispositif automatisé permettrait d'améliorer d'autant plus le débit d'analyse. Pour disposer d'une moyenne de fluorescence fiable, 10 000 microbilles minimum sont analysées pour chaque échantillon. Dans ce cas, chaque test ne nécessite qu'une faible quantité de sondes, estimée à 10 fmol, soit 100 fois moins que pour la détection par spectrofluorimétrie qui nécessite une concentration en oligonucléotide de 100 nM dans un volume réduit à 10 μ L. En revanche, la principale limitation du test décrit dans ce chapitre concerne une capacité de multiplexage nulle. En effet, chaque activité enzymatique doit être mesurée séparément et donc, nécessite de disposer de quantités importantes d'échantillons, bien que le test soit réalisé en volume réduit. Aussi, le temps d'analyse est multiplié par autant d'activités à mesurer, modérant l'exploitation de cet outil dans un format haut débit. Cette limitation sera adressée dans le chapitre V.

V DETECTION MULTIPLEXEE DES ACTIVITES GLYCOSYLASES ET AP-ENDONUCLEASES

1. Approche « 1 sonde = 1 lésion = 1 fluorophore »	182
1.1. Méthodologie	182
1.2. Détection d'activités à partir d'enzymes purifiées	183
1.3. Détection d'activités à partir d'extraits nucléaires	186
2. Encodage des billes magnétiques.....	187
2.1. Etat de l'art.....	189
2.2. Stratégie.....	190
2.3. Encodage.....	192
2.4. Fonctionnalisation par les ODN.....	195
2.5. Traitement des données.....	196
2.6. Applications.....	199
2.6.a. Détection multiplexée de l'activité enzymatique de protéines purifiées.....	199
2.6.b. Détection multiplexée d'activités enzymatiques au sein d'extraits de cellules HeLa	200
3. Conclusion et Perspectives	203

Dans les chapitres précédents, nous avons évoqué la conception d'un nouvel outil destiné à la détection d'activités de réparation de l'ADN. La digestion de billes magnétiques fonctionnalisées par des sondes nucléiques fluorescentes ou quenchées est couplée à une analyse du surnageant par spectrofluorimétrie (cf. Chapitre III) ou des billes elles-mêmes par cytométrie en flux (cf. Chapitre IV). Bien qu'ayant prouvé leur efficacité, ces techniques ne remplissent pas le critère « multiplexage » fixé dans le cahier des charges initialement établi. Par multiplexage, nous entendons ici que l'outil doit permettre la détection simultanée, dans le même échantillon, de plusieurs activités enzymatiques. Bien qu'il existe des fluorimètres capables de mesurer simultanément plusieurs fluorophores, le cytomètre en flux s'avère être un appareillage de choix dans ce but. En effet, le cytomètre que nous utilisons est doté de quatre détecteurs de fluorescence et certains appareils actuels sont capables d'analyser jusqu'à 15 fluorophores parallèlement. Dans ce chapitre nous relatons donc le développement selon deux stratégies d'une telle méthode de détection multiplexée basée sur l'analyse par cytométrie en flux. La première technique détaillée ci-après consiste à utiliser diverses sondes nucléiques, chacune modifiée par un fluorophore différent. Dans un second temps, nous développerons une nouvelle stratégie basée sur l'encodage des billes magnétiques par fluorescence pour la distinction des sondes lésées.

1. Approche « 1 sonde = 1 lésion = 1 fluorophore »

1.1. Méthodologie

La détection par fluorescence, contrairement à la radioactivité, offre la possibilité d'utiliser plusieurs marqueurs pour la détection de diverses activités enzymatiques simultanément. Basé sur ce principe, nous avons utilisé des sondes quenchées marquées par la cyanine 3 ou par la cyanine 5 pour réaliser une preuve de concept.

Deux méthodologies ont été comparées. La première consiste à fonctionnaliser deux lots de billes **D** distincts par deux sondes différentes (cf. Figure 64, « 1 bille = 1 sonde »). Un premier lot, noté [*Pst1-Q2*], est fonctionnalisé avec la sonde *Pst1-Q2* tandis que le second, nommé [*THF-Q3*], est modifié par l'ODN *THF-Q3*. En parallèle, nous avons conçu un troisième lot de microbilles (marqué [*Pst1-Q2 & THF-Q3*]) modifié par les deux sondes en quantité équimolaire, désignant ainsi la seconde méthodologie (cf. Figure 64, « 1 bille = 2 sondes »).

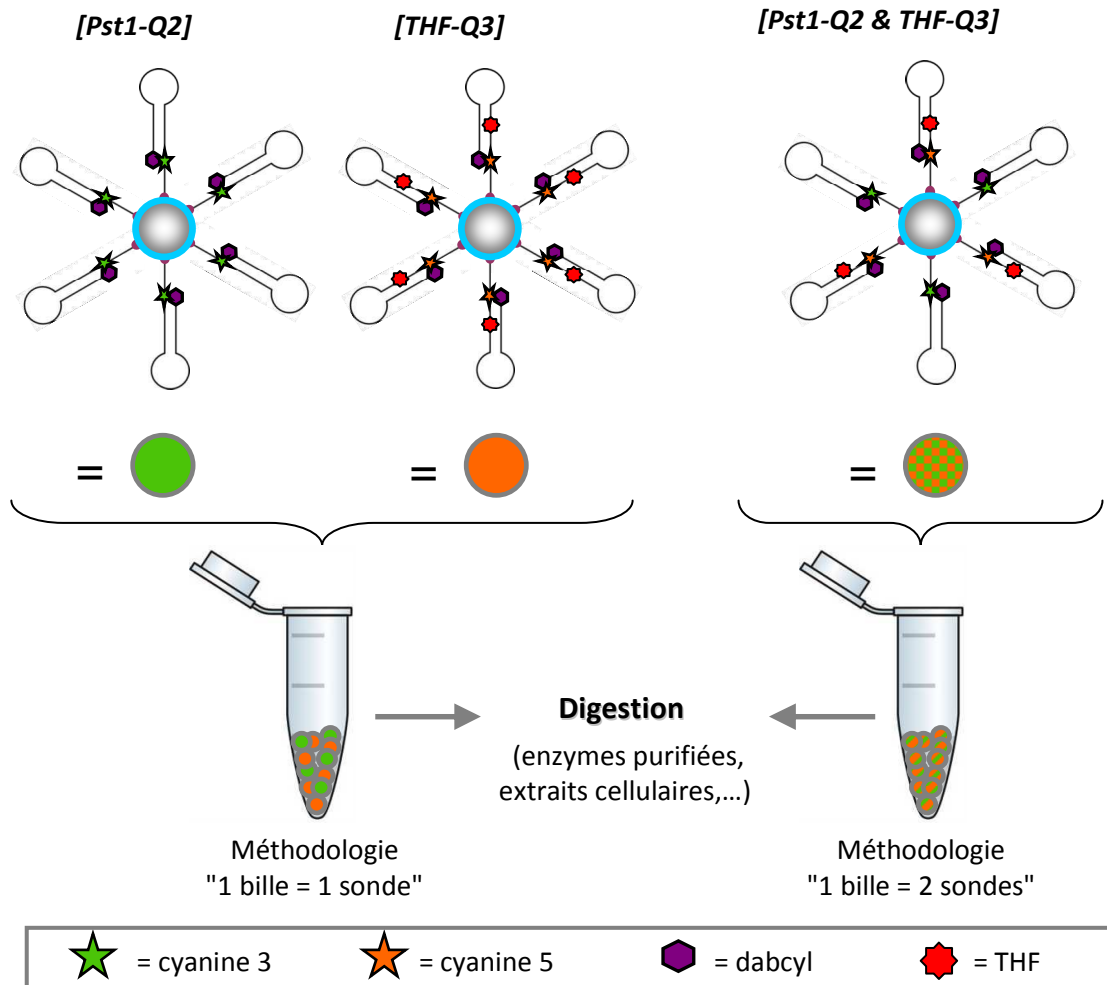


Figure 64: Principe de la détection multiplexée de différentes activités enzymatiques à partir de sondes nucléiques marquées par différents fluorophores (Q2 et Q3). Les sondes peuvent être immobilisées sur des billes différentes (gauche) ou, au contraire, une même bille peut être fonctionnalisée par les différentes sondes en concentration équimolaire (droite).

1.2. Détection d'activités à partir d'enzymes purifiées

Nous avons évalué la capacité discriminatoire des deux méthodologies pour la détection multiplexée des activités enzymatiques purifiées. Pour cela, le mélange de billes [Pst1-Q2] et [THF-Q3] ou l'unique lot de particules [Pst1-Q2 & THF-Q3] sont incubés avec l'enzyme Pst1 (10 u) ou APE1 (1 u). Les quantités utilisées ici ont été préalablement définies pour permettre la coupure maximale des sondes spécifiques, dans ces conditions. Les résultats présentés en Figure 65 démontrent la spécificité de la détection quelle que soit la méthodologie. Dans le cas de la stratégie « 1 billes = 1 sonde », on remarque que seule la fluorescence de la cyanine 5 (correspondant à la sonde lésée) augmente lors de la digestion par APE1. Comme attendue, la digestion par l'enzyme de restriction Pst1 induit une augmentation drastique de la fluorescence de la cyanine 3 correspondant à la sonde

contenant le site de restriction intact. Néanmoins, on remarque que dans ces conditions, la fluorescence de la cyanine 5 augmente également, dans une plus faible proportion. Ce résultat traduit la capacité de l'enzyme à cliver dans une moindre mesure la sonde dont le site de restriction est endommagé par un site abasique (analogue THF).

Suivant la méthodologie « 1 billes = 2 sondes », on constate des résultats similaires. Toutefois, on note un rapport signal sur bruit plus faible, du fait que les billes sont fonctionnalisées par seulement 50 % de chaque oligonucléotide.

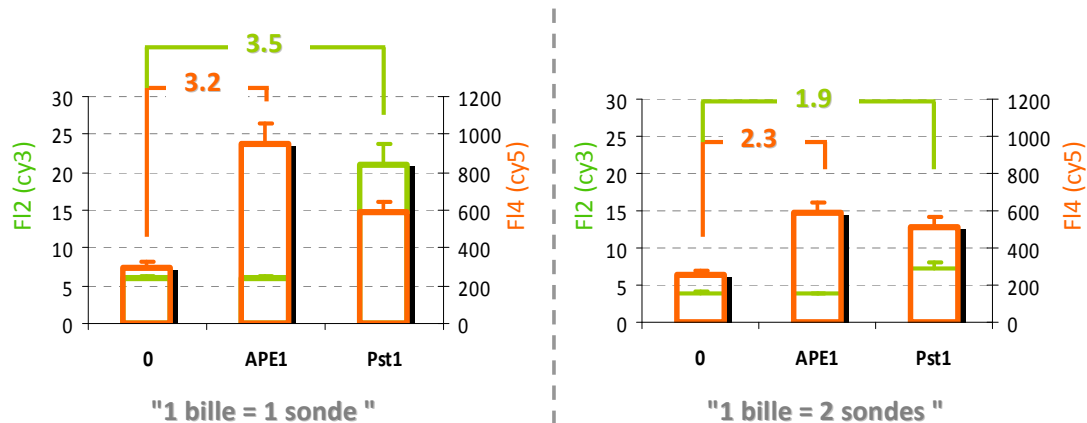


Figure 65: Détection multiplexée (« 1 sonde = 1 couleur ») d'enzymes purifiées. La preuve de concept est réalisée avec les sondes *Pst1-Q2* et *THF-Q3* immobilisées sur des particules différentes (gauche) ou sur les mêmes microbilles (droite) et incubées avec les enzymes APE1 ou Pst1 avant d'être analysées par cytométrie en flux.

Aussi, on remarque un inversement relatif des signaux ($FI4 > FI2$) pour la digestion avec l'enzyme Pst1. Nous avons émis l'hypothèse qu'un transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET), du cy3 vers le cy5 expliquerait ce phénomène. Pour observer un effet FRET, il faut que le spectre d'absorption du chromophore accepteur (cy5) recouvre partiellement le spectre d'émission du donneur (cy3) et que la distance (typiquement, quelques nanomètres) et l'orientation des deux chromophores soient cohérentes avec ce processus de transfert d'énergie. Aussi, il semble que ces deux conditions soient remplies dans le cas où les deux sondes sont immobilisées sur la même particule (Figure 66).

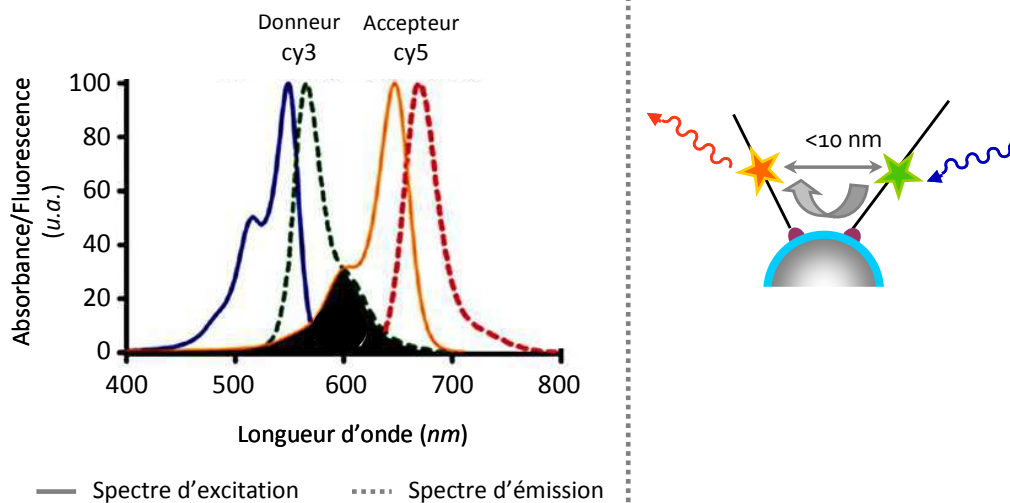


Figure 66: Conditions de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET): a) le spectre d'émission du donneur (cy3) doit recouvrir au moins partiellement le spectre d'excitation de l'accepteur (cy5) et b) la distance et l'orientation des deux chromophores doivent être compatibles avec ce processus de transfert d'énergie non radiatif.

Pour confirmer cette supposition, les billes **D** ont été saturées à 50 % soit par l'ODN *Pst1-Q2* soit par l'ODN *THF-Q3*. La moitié du stock est conservée comme telle tandis que l'autre moitié est saturée par la sonde complémentaire. De cette façon, nous pouvons évaluer l'influence de la présence d'une des sondes sur la fluorescence de la seconde. Les trois types de microbilles sont ainsi digérés par APE1 ou Pst1. Il est intéressant de constater que la présence de la sonde *Pst1-Q2* induit une augmentation du signal FI4 par rapport aux billes supportant uniquement la sonde *THF-Q3* (Figure 67). Réciproquement, le signal FI2 se voit diminué quand les microbilles *Pst1-Q2* sont saturées en sonde *THF-Q3*. Ce résultat tend à prouver l'existence d'un effet FRET entre les deux oligonucléotides, lorsque le quenching des fluorophores est annihilé par le clivage des sondes. Ainsi, les marqueurs choisis ne semblent pas appropriés à cette méthodologie « 1 bille = 2 sondes ». En outre, le multiplexage se trouve limité par l'ajout d'autres fluorophores spectralement résolus ainsi que par la diminution des signaux due à la fixation de différentes sondes sur le même support.

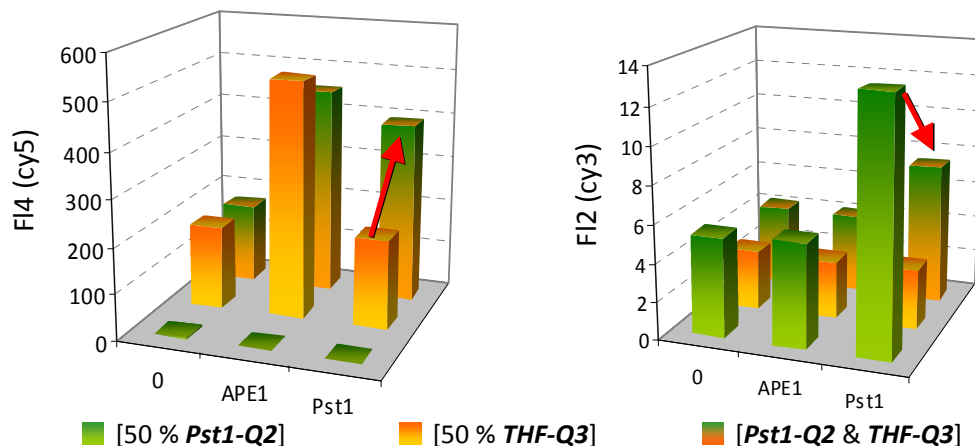


Figure 67: Mise en évidence d'un effet FRET entre la cy3 et la cy5 lorsque les billes sont co-fonctionnalisées par les ODN-Q2 et Q3.

1.3. Détection d'activités à partir d'extraits nucléaires

De ce constat, il apparaît que la fonctionnalisation des billes par un seul type de sonde est plus pertinente. Afin de valider cette approche, la détection de l'activité APE1 au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa a été investiguée. Les mesures de fluorescence par cytométrie en flux sont reportées en Figure 68. Dans le test multiplexe (avec les billes *THF-Q3* et les billes *Pst1-Q2* ; *diamants*), les paramètres de détection (limites de détection et signal maximal) sont similaires à ceux obtenus pour le test mono-paramétrique (avec les billes *THF-Q3* seules ; *carrés*).

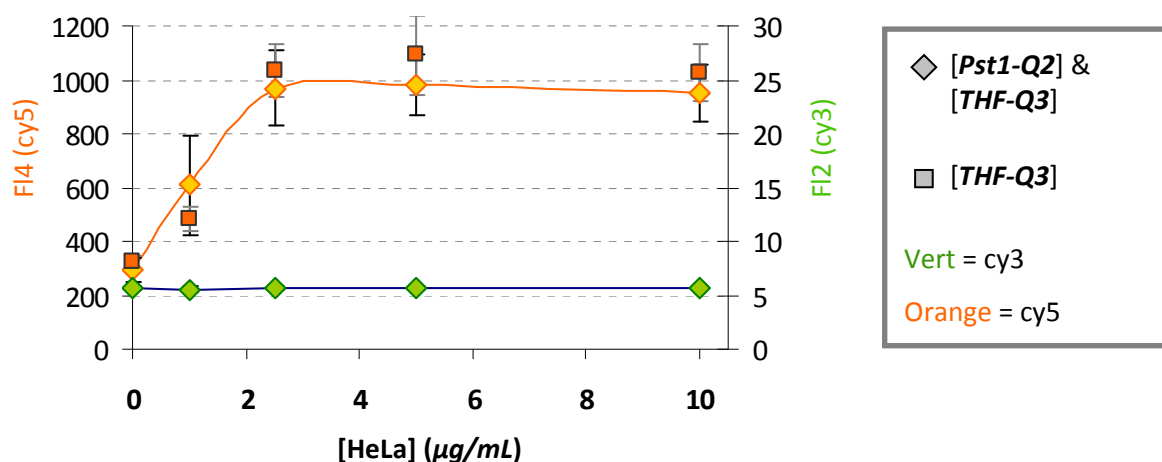


Figure 68: Détection de l'activité APE1 au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa : analyse par cytométrie en flux de la co-digestion des billes D fonctionnalisées par les sondes *Pst1-Q2* ou *THF-Q3* (diamants) ou de la digestion des billes *THF-Q3* seules (carrés).

Ce résultat valide cette approche de test multiplexé. Toutefois, le perfectionnement de cet outil n'a pas été approfondi pour plusieurs raisons :

- La complexification de ce système nécessite la synthèse de sondes marquées avec autant de fluorophores que de lésions. D'une part, le panel de fluorophores disponibles et compatibles avec le cytomètre utilisé est restreint ; d'autre part, la synthèse et la purification des sondes représentent un investissement en temps et en argent important.
- L'utilisation d'un fluorophore pour la détection de l'activité de chaque cible nécessite la calibration du cytomètre pour chaque longueur d'onde mesurée ainsi qu'une normalisation des résultats qui peut s'avérer fastidieuse voire impraticable.
- Dans l'étude présentée ci-dessus, nous utilisons deux fluorophores dont les spectres d'émission sont spectralement distincts, permettant une analyse aisée pour chaque

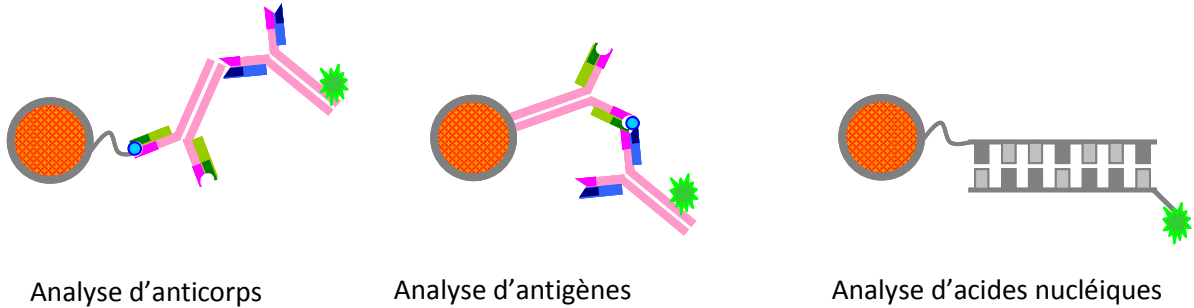
longueur d'onde. Le choix des fluorophores est particulièrement délicat dans le cas d'une analyse multiparamétrique de trois, quatre chromophores ou plus. En effet, seule la gamme visible est exploitée (voire proche UV ou infrarouge), obligeant à choisir des fluorochromes dont les spectres d'émissions se recouvrent partiellement. Il est primordial dans ces conditions d'introduire des paramètres de compensations³² qu'il est complexe d'appliquer dans ce type d'expériences.

2. Encodage des billes magnétiques

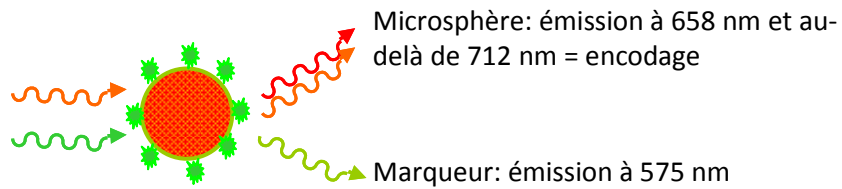
L'encodage de microbilles est une technologie émergente depuis une vingtaine d'années, permettant aujourd'hui la détection simultanée d'une quasi infinité de cibles (protéines, acides nucléiques, activités enzymatiques). Le principe, illustré en Figure 69, est le suivant : différents lots de billes sont marqués par un ou plusieurs fluorophores de façon à les discriminer en fonction de l'intensité et de la longueur d'onde de fluorescence. Chacune des populations de billes obtenues est fonctionnalisée par un élément sonde (oligonucléotide, anticorps,...), dirigé contre des cibles différentes. L'ensemble des particules est rassemblé et exposé au même échantillon (sérum, extrait protéique, ...). Les cibles sont marquées par un autre fluorophore rapporteur, conjugué à un anticorps ou oligonucléotide permettant la détection de la cible. Finalement, les particules sont analysées par cytométrie en flux et le traitement des données permet de séparer à nouveau les différentes populations de billes et d'accéder aux paramètres mesurés pour chaque sonde. Avant d'exposer la stratégie que nous avons utilisée, nous revenons sur le développement de ce procédé.

³² Les compensations résultent de deux insuffisances. D'un côté, les fluorochromes utilisés n'ont pas une raie d'émission fine, mais un spectre large responsable de leurs recouvrements ; d'autre part les trajets optiques des rayons lumineux ne permettent de sélectionner que des plages de longueurs d'onde. Il en résulte que certains fluorophores vont émettre de la lumière dans des longueurs d'ondes captées par un détecteur qui ne leur est pas destiné. Un traitement mathématique des données est indispensable de façon à rectifier le biais introduit par ce phénomène.

Immunoessai ou test d'hybridation



Détection



Acquisition et exploitation des résultats

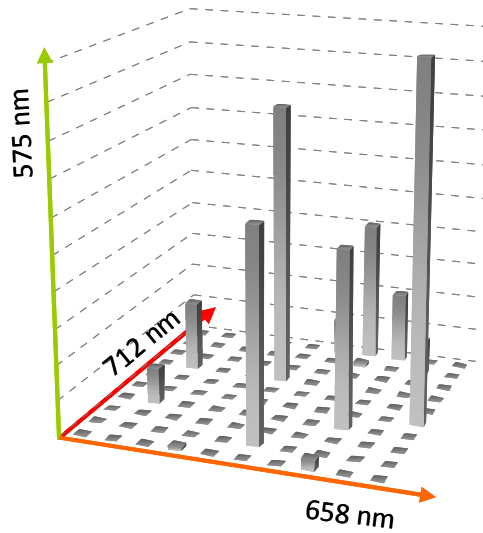


Figure 69: Illustration du système Luminex permettant l'analyse simultanée de 100 molécules. Ce système, utilisant 2 sources d'excitation laser (532 et 633 nm), fait appel à des billes encodées par deux fluorochromes orange et rouge, couplées soit à des antigènes, des anticorps ou des oligonucléotides. Ceci conduit à détecter respectivement des anticorps, des antigènes ou des acides nucléiques (ou nucléotides) (inspiré de [819]).

2.1. Etat de l'art

“ *Barcoding technologies have become the basis for a new generation of molecular diagnostic platforms for measuring biomarkers in a high-throughput, rapid, and sensitive manner.* ”

Gao, Y. et al. 2011

Une des principales applications d'un test multiplexé utilisant des billes discriminées est l'immunologie. La technique de référence pour la détection d'analytes par des anticorps spécifiques est le test ELISA (« *enzyme-linked immunosorbent assay* »). Bien que très fiable et spécifique, ce test ne permet de mesurer qu'un seul analyte à la fois. La fixation de ces anticorps à des microbilles encodées, couplées à une détection par cytométrie en flux apparaît aujourd'hui comme une alternative, palliant ainsi aux limites de multiplexage de la méthode immuno-enzymatique. McHugh et al. puis Collins et al. ont utilisé des billes de différentes tailles pour la détection simultanée d'anticorps sérologiques ou de clusters de différenciation lymphocytaires (CD), respectivement [820, 821]. Dans ces études, les billes sont distinguées par une diffusion des rayons lumineux différente (FSC) et la mesure des analytes est quantifiée par leur reconnaissance avec un anticorps de détection fluorescent.

Parallèlement, la discrimination des billes par fluorescence s'est rapidement imposée comme une technique d'encodage simple et versatile. La littérature du début du XXI^{ème} siècle est particulièrement riche d'exemples : en 2000, Park, M.K. et ses collaborateurs ont développé un test basé sur l'encodage de microbilles de 5 tailles différentes par 3 intensités de fluorescence. Les billes de latex utilisées dans ce travail sont incubées avec des quantités différentes (nulle, faible ou grande) de « DiD oil » (analogue de cyanines). Ce test a donc rendu possible l'identification de 15 sérotypes de *Streptococcus Pneumonia*. La commercialisation à la même époque de microbilles encodées par fluorescence par plusieurs compagnies a considérablement accéléré les recherches dans les domaines de l'immunologie et du génotypage. Citons parmi d'autres la technologie CBA™ (« *cytometric bead array* ») [822], développée par Becton Dickinson ou FlowMetrix™ [823] déployée par la société Luminex (Figure 70). Cette dernière dispose d'un panel de 100 microbilles encodées par divers ratios de deux fluorophores rouge et orange. Ce système est largement utilisé pour la détection de cytokines [824-826], de toxines [827], de SNP³³ [828-831], ou encore d'acides nucléiques de virus [832] ou de poisson [833].

³³ Pour « Single Nucleotide Polymorphism », traduit par polymorphisme nucléotidique.

De nouveaux concepts émergents tendent à renforcer les avantages déjà certains de l'encodage optique de microbilles pour le multiplexage. Gao, X., Nie, S. et leurs collaborateurs ont publié une nouvelle stratégie d'encodage de billes mésoporeuses avec des quantum dot, permettant d'augmenter l'uniformité et l'intensité du signal des billes [834, 835]. L'équipe revendique que l'emploi de 6 marqueurs avec 10 intensités de codage différentes permettrait d'obtenir théoriquement 1 million de populations de billes [836]. Mais les avantages des quantum dots résident surtout dans leur grande stabilité (pas de photoblanchiment, pas de fuite du marquage) et par le fait qu'une seule longueur d'onde suffit à l'excitation de plusieurs semiconducteurs [837].

2.2. Stratégie

Inspiré des techniques de marquages optiques décrites ci-dessus, nous avons imaginé une nouvelle stratégie d'encodage des billes magnétiques par fluorescence, illustrée en Figure 70: les billes **K** portant des groupements biotine sont fonctionnalisées par divers ratios de streptavidine non marquée/streptavidine fluorescente (conjuguée à l'Alexa 488). De cette façon, les billes sont recouvertes par la même quantité de streptavidine, mais se distinguent par leur intensité de fluorescence dans le vert (canal F11 du cytomètre). Cette unique étape permet à la fois l'encodage des billes et l'introduction de la streptavidine pour l'immobilisation des sondes nucléiques biotinylées. Chaque population de billes ainsi obtenue est subséquentement fonctionnalisée avec une des sondes (non lésée, *THF*, *Ura*,...), toutes marquées par le même couple de chromophores. Les études menées antérieurement nous ont amenés à choisir la cyanine 5 comme fluorophore du fait de sa brillance et le BHQ2 comme quencher. A chaque lésion est donc associée une intensité de fluorescence de la bille.

L'analyse par cytométrie en flux, mesurant les paramètres de fluorescence pour chaque objet, donne accès à la fois à la fluorescence de la bille (Alexa488 dans le canal F11) et à la fluorescence des sondes en surface (cy5 dans le canal F14), proportionnelle au taux de clivage. Le traitement informatique des données générées permet d'obtenir le taux de coupure pour chaque sonde (cf. § V2.5).

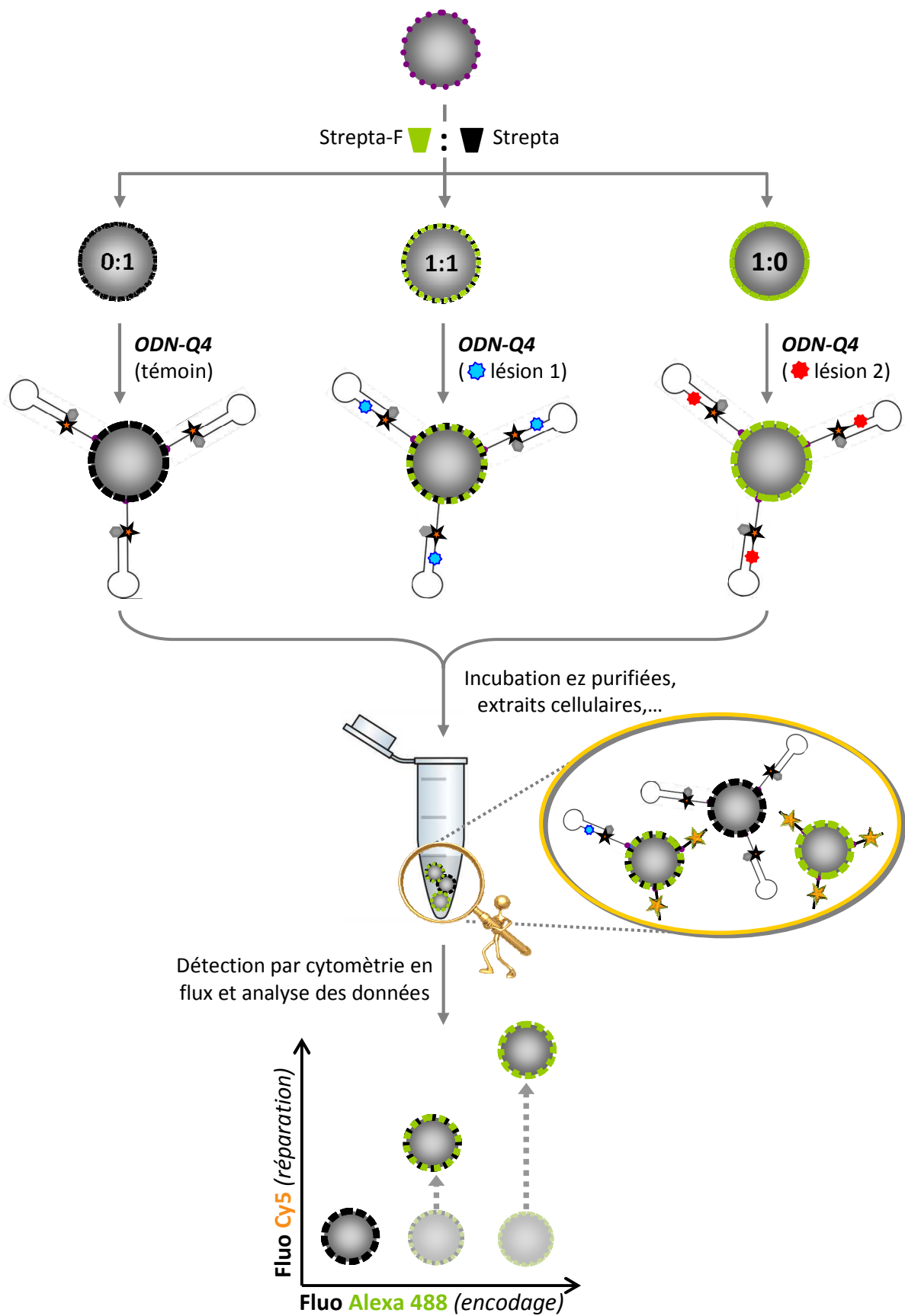


Figure 70: Illustration du principe de détection multiplexée d'activités du BER par encodage des microbilles avec différents ratios de streptavidine fluorescente (strepta-F).

2.3. Encodage

En premier lieu, nous avons défini la quantité optimale de streptavidine nécessaire pour la saturation des billes **K** biotinylées. Ces dernières (2 μ L, 20 μ g) sont incubées avec 20 μ L d'une solution de streptavidine conjuguée à l'Alexa 488 (Strepta-F) à différentes concentrations. Au bout de 60 minutes, les billes sont lavées jusqu'à l'obtention d'un signal de fluorescence nul dans le surnageant, preuve que toutes les protéines fixées non spécifiquement ont été éliminées. D'après la Figure 71a, deux lavages sont nécessaires pour cette étape. Finalement les billes sont analysées par cytométrie en flux et la fluorescence est enregistrée dans le canal 1 (F11). Les histogrammes obtenus pour chaque concentration sont représentés en Figure 71b. La saturation des billes se traduit par l'atteinte d'un signal de fluorescence maximum, couplé à la diminution du coefficient de variation. Plus ce dernier paramètre est faible, plus la fluorescence des billes est homogène, corrélant ainsi avec le fait que celles-ci soit saturées en streptavidine. Ainsi, nous avons estimé que la fonctionnalisation totale de 20 μ g de billes nécessite entre 0.2 et 1 μ g de protéines. Dans ces conditions, la fluorescence des billes est supérieure à 1000 u.a. et le coefficient de variation est inférieur à 10 %. Pour la suite des expériences, nous avons utilisé un excès de streptavidine fixé à 1 μ g pour la fonctionnalisation de 20 μ g de billes **K**. Ceci permet de limiter l'aggrégation des billes induites par le pontage de deux particules par une seule streptavidine.

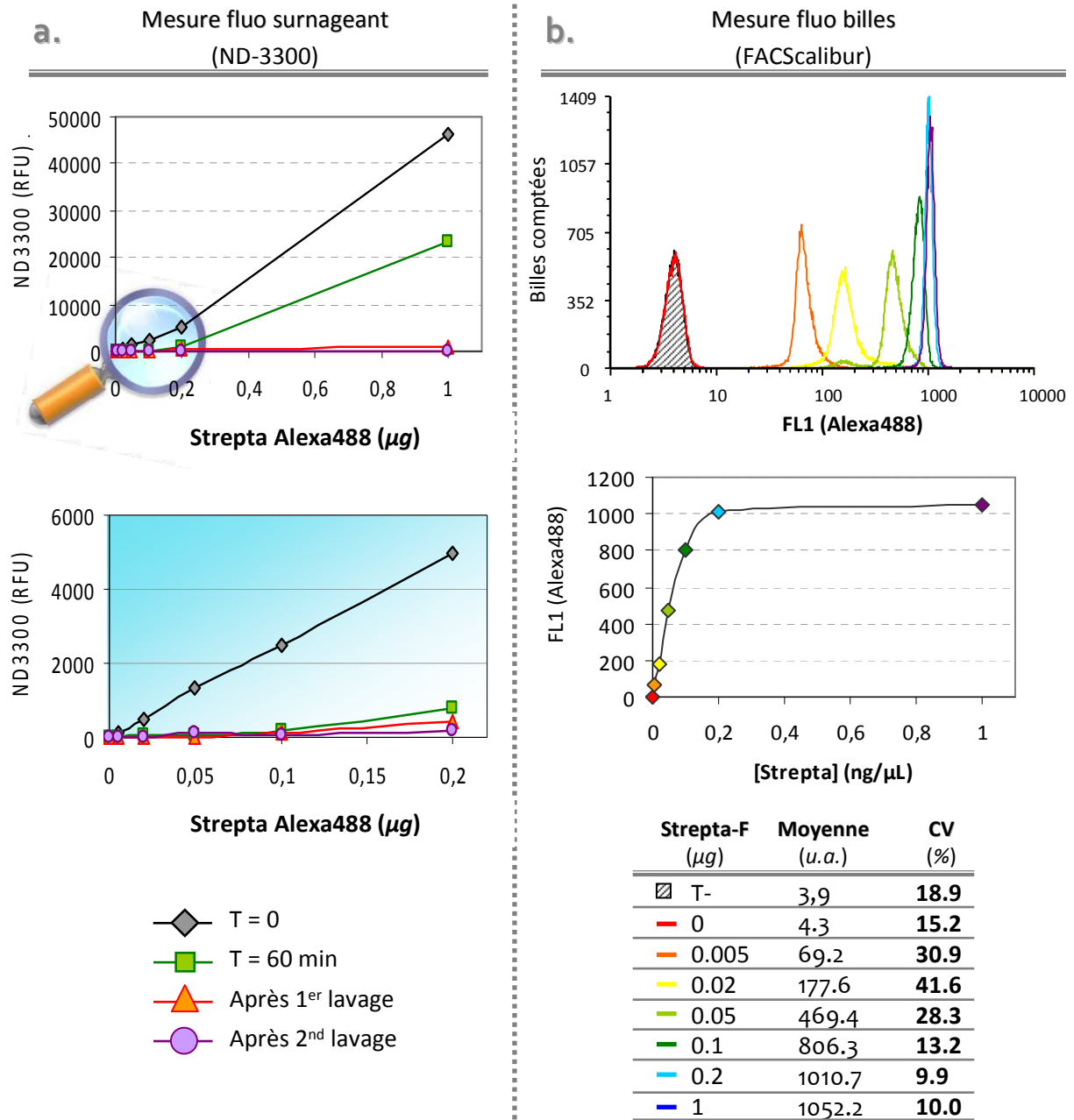


Figure 71: Estimation du taux de greffage de streptavidine sur les billes biotinylées K. Ces dernières sont fonctionnalisées par une concentration croissante de streptavidine fluorescente : a) la fluorescence du surnageant est analysée par spectrofluorimétrie ; b) la fluorescence et l'homogénéité des billes après les lavages sont analysées par cytométrie en flux.

Par la suite, différents ratios de streptavidine/streptavidine Alexa 488 ont été optimisés pour obtenir des populations de billes, distinctes et distinguables en fluorescence (FL1), couvrant l'ensemble de l'échelle logarithmique. Cette stratégie simple et rapide permet d'obtenir en moins d'une heure, jusqu'à 8 populations de billes encodées, parfaitement résolues en fluorescence (Figure

72a). Le graphique en Figure 72b, reportant l'intensité de fluorescence des billes en fonction du ratio de concentration $[\text{Strepta-F}]/[\text{Strepta}]_{\text{totale}}$, démontre la proportionnalité de ces deux paramètres.

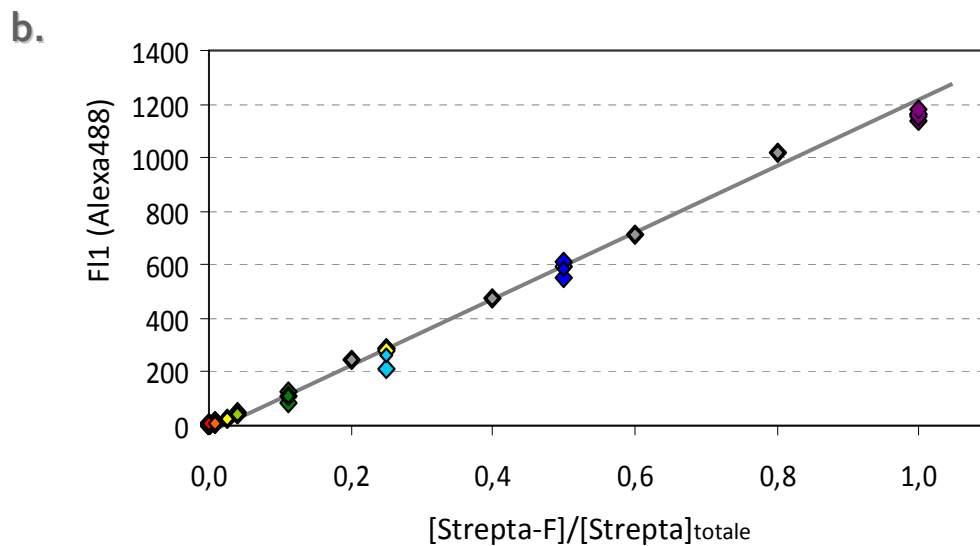
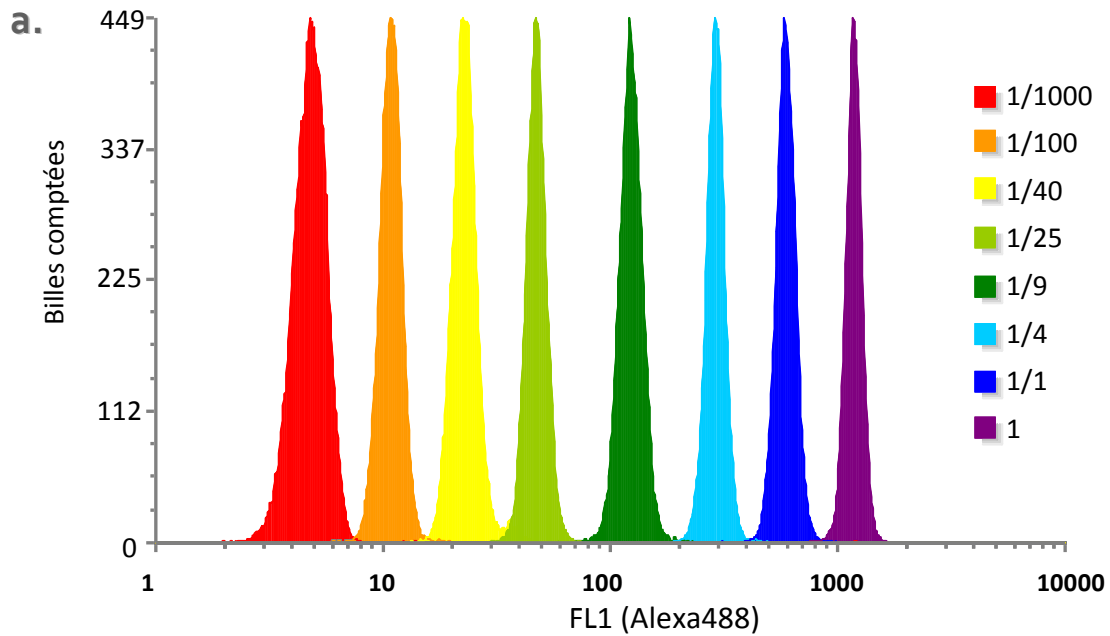


Figure 72: Mise au point de l'encodage des billes par différents ratios de streptavidine/streptavidine fluorescente: a) discrimination des populations de billes en fonction de leur intensité de fluorescence par cytométrie en flux ; b) moyenne de fluorescence des billes en fonction du ratio de concentrations entre la streptavidine fluorescente et la streptavidine totale.

2.4. Fonctionnalisation par les ODN

Les microbilles étant encodées avec de l'alexa488, elles sont conçues pour supporter les sondes marquées à la cyanine 5 afin d'éviter tout phénomène de transfert de fluorescence. Cela permet également de s'affranchir du réglage des compensations, qui, dans ce cas, sont négligeables.

Néanmoins, la détermination de la quantité de sonde nécessaire à la fonctionnalisation des billes est menée avec l'oligonucléotide *THF-F*. Ainsi, 20 µg de billes encodées non fluorescentes sont incubées avec une quantité croissante de sonde comprise entre 0 et 2 pmol (20 µL final). Une fois lavées, les particules sont analysées par cytométrie (FL2). La Figure 73 représente les histogrammes obtenus pour chaque quantité de sonde. Comme pour l'étape d'encodage, la saturation des sites streptavidine vacants et accessibles se traduit par l'atteinte d'un signal maximum et par une diminution du coefficient de variation. Ainsi, ce signal caractéristique est observé pour 2 pmol. Dans un souci de pallier aux éventuelles erreurs (pipetage, dilution,...) nous avons fixé la quantité optimale de sonde à 2.1 pmol pour la fonctionnalisation de 20 µg de billes **K** encodées.

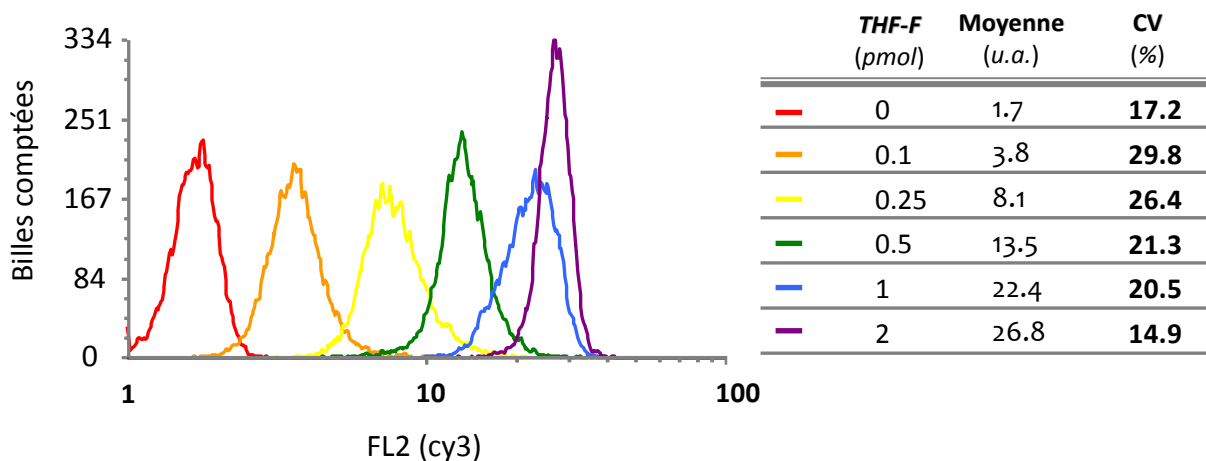


Figure 73: Estimation de la quantité d'oligonucléotides nécessaire pour la saturation des billes encodées : analyse par cytométrie en flux des billes recouvertes de streptavidine non fluorescente fonctionnalisées par une quantité croissante de sonde *THF-F*.

Aussi, nous avons constaté que la fonctionnalisation des billes par un oligonucléotide de type *hairpin*, quelle que soit sa nature, induit une atténuation de la fluorescence de la bille de l'ordre de 50 % (Figure 74). Des expériences complémentaires ont permis de conclure que ce phénomène n'est pas attribué à un transfert de fluorescence de l'alexa488 vers le fluorophore (cy5) et que l'immobilisation des sondes sur les billes n'est pas affectée par l'encodage de ces dernières. Il était indispensable de vérifier cette absence de corrélation entre la fluorescence de la bille et la fluorescence de la sonde. Dans le cas contraire, les expériences de détection d'activités enzymatiques auraient été biaisées.

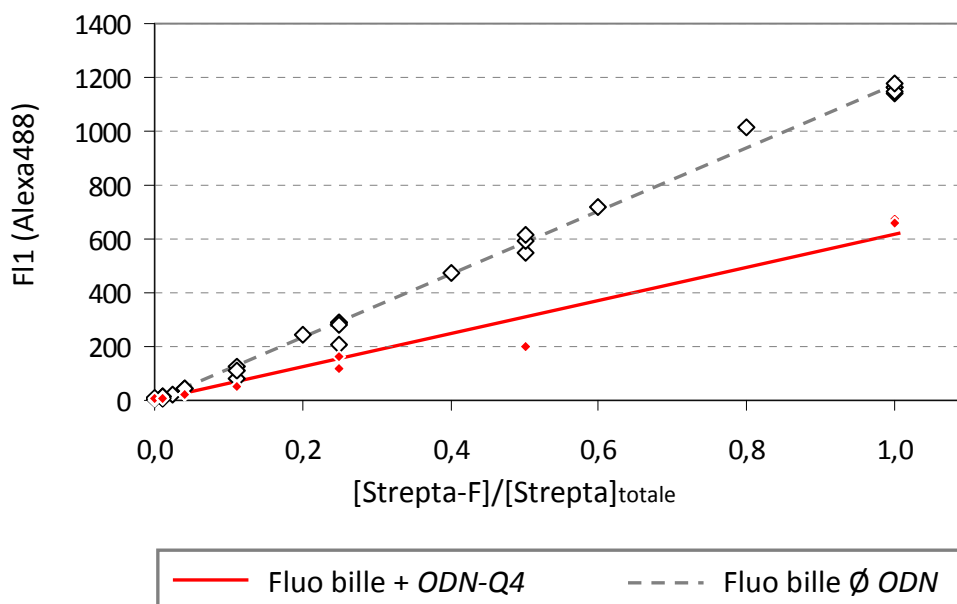


Figure 74: Effet de la fonctionnalisation par les sondes sur la fluorescence des billes encodées : analyse de la fluorescence en Alexa488 par cytométrie en flux des différentes populations de microparticules fonctionnalisées (rouge) ou non (gris) par les sondes Q4.

2.5. Traitement des données

Dans ce paragraphe, nous donnons les clés pour comprendre comment sont traitées les données générées par le cytomètre en flux. Premièrement, il est important de rappeler que l'appareil enregistre une importante quantité de valeurs. Ainsi, pour chaque événement (ou objet passant devant le laser), le cytomètre va analyser sa taille, sa granulométrie et l'intensité de fluorescence mesurée dans chaque canal (bien que tous ces paramètres ne soient pas systématiquement exploités). Ainsi, à chacune des quelque 50 000 microbilles analysées sera attribuée une valeur de fluorescence dans le vert (correspondant à l'alexa488) et dans l'orange (correspondant à la cy5). En reportant tout les points sur un diagramme à deux dimensions (alexa488/cy5), nous sommes capables de visualiser chaque population de microbilles (correspondant à l'intensité de l'encodage) ainsi que le signal du cy5 associé, reflétant le taux de coupure des sondes en surface de la bille analysée.

A titre d'exemple, nous avons fonctionnalisé les billes [1/25], [1/4] et [1/1]³⁴ avec l'oligonucléotide THF-Q4. Indépendamment, ces trois lots de billes sont digérés par APE1. Pour chaque concentration d'enzyme, les billes sont regroupées en un échantillon, analysé par cytométrie. Les résultats obtenus pour l'échantillon témoin (sans enzyme) sont présentés en Figure 75. Comme

³⁴ Cette notation fait référence au ratio de streptavidine Alexa488 utilisée pour l'encodage. [1/4] signifie donc que les billes sont fonctionnalisées avec 1/4 de streptavidine fluorescence et 3/4 de streptavidine non fluorescente.

exposé précédemment, le diagramme taille/granulométrie montre plusieurs populations de billes. Les singulets, qui nous intéressent, et les multiplets de billes agrégées qu'il faut éliminer. Dans ce but, sur ce diagramme est définie une première « porte » (traduit de l'anglais « *gate* »), nommée « K », qui correspond aux billes individualisées. Les autres diagrammes sont réalisés à partir des événements inclus à l'intérieur de cette porte. Pour avoir accès aux paramètres reliés à une certaine population de billes, on trace le diagramme à deux dimensions FL4 en fonction de FL1. Ainsi, en abscisses, on observe 3 nuages de signaux qui correspondent aux trois populations de billes encodées (de gauche à droite, [1/25], [1/4] et [1/1]). On spécifie 3 nouvelles portes ([1/25], [1/4], [1/1]), définissant donc l'encodage de chaque bille. Le cytomètre est configuré de telle sorte qu'il enregistre en moyenne 10 000 événements pour chaque population de billes. L'analyse statistique du logiciel donne, entre autres, les paramètres inscrits dans le Tableau 7 pour l'échantillon témoin.

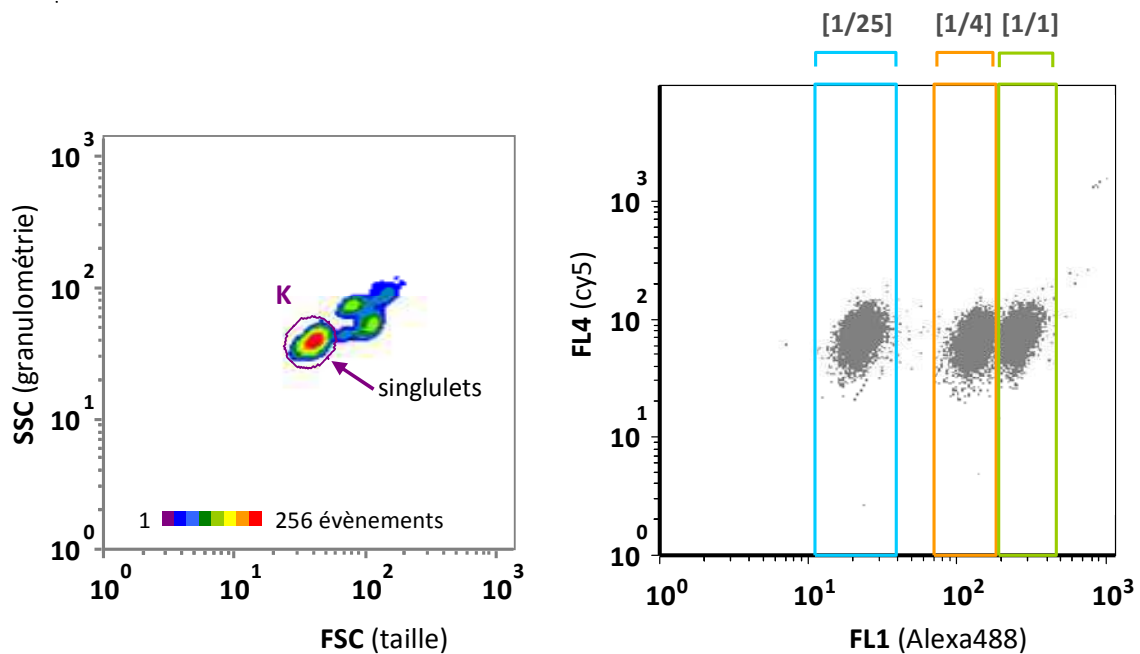


Figure 75: Analyse des données par cytométrie en flux pour un test triplex: a) diagramme SSC/FSC pour l'échantillon témoin: la population de singulets (billes individualisées) est définie par la "porte" K; b) Diagramme FL4/FL1 de l'échantillon témoin pour les événements inclus dans la porte K. 3 nouvelles portes sont définies, correspondant chacune à une population de billes encodées par un ratio de streptavidine fluorescente (de gauche à droite, 1/25, 1/4 et 1/1).

Ech.	Porte	# billes	Moy Géométrie FL1	Moy Géométrie FL4	Moy Arithmétique FL1	Moy Arithmétique FL4	% billes dans la porte
GG.001	K	30026	90.8	63.0	139.5	65.3	100
GG.001	1/25	9783	21.4	64.1	21.6	66.2	34.6
GG.001	1/4	9782	125.3	58.5	126.5	60.4	32.6
GG.001	1/1	10396	260.4	66.4	262.1	68.3	32.6

Tableau 7: Données ré-analysées (à partir du diagramme FL4/FL1 de la Figure 75) pour déterminer les paramètres propres à chaque population de billes de l'échantillon témoin tels que les moyennes d'intensité de fluorescence.

Les moyennes arithmétiques et géométriques³⁵ en abscisse et en ordonnée sont calculées pour chaque échantillon et pour chaque porte préalablement identifiée. Le nombre et le pourcentage d'évènements inclus dans chaque porte sont également reportés. Par conséquent, la fluorescence moyenne de la cyanine 5 est calculée pour chaque population, donnant accès au taux de réparation des sondes associées (cf. Figure 76). Pour chaque quantité d'enzyme, on observe que la fluorescence des 3 populations de billes est similaire. Ce résultat confirme l'absence de transfert de fluorescence de l'alex488 vers le cy5, mentionnée dans le paragraphe précédent.

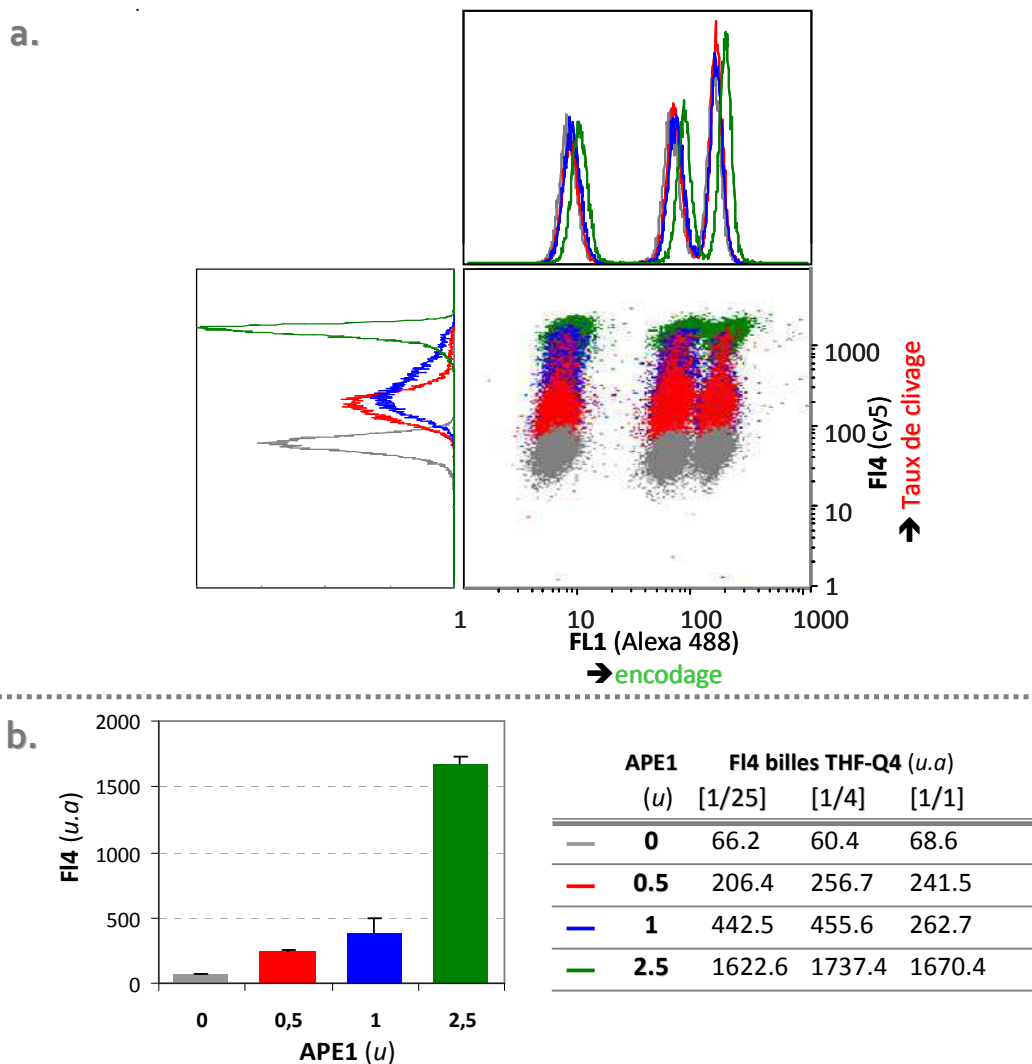


Figure 76: Effet de l'encodage sur la détection de l'activité APE1 purifiée : les 3 populations de billes encodées [1/25], [1/9] et [1/1], fonctionnalisées par la sonde *THF-Q4*, sont incubées avec une quantité croissante d'APE1 purifiée: a) Diagrammes 1D et 2D (FI4/FI1) superposés obtenus pour chaque quantité d'enzyme ; b) Analyse quantitative de la fluorescence en cyanine 5 pour chaque population de billes et chaque quantité d'enzyme.

³⁵ La moyenne arithmétique correspond simplement à la somme des signaux enregistrés pour chaque objet, divisée par le nombre d'objets. La moyenne géométrique tient compte de la dispersion des valeurs sur une échelle logarithmique. En ce sens, on utilise la moyenne arithmétique lorsque la distribution des valeurs est gaussienne en échelle linéaire et la moyenne géométrique lorsque cette distribution est gaussienne en échelle logarithmique. Pour les microbilles, la distribution des valeurs est gaussienne en mode linéaire ou logarithmique. Nous utilisons donc les moyennes arithmétiques, très proches des moyennes logarithmiques.

2.6. Applications

2.6.a. Détection multiplexée de l'activité enzymatique de protéines purifiées

Les performances du biocapteur mis au point ont été évaluées en premier lieu à partir d'enzymes purifiées. Trois populations de billes encodées ont été fonctionnalisées avec les sondes *Pst1*, *Ura* et *THF-Q4*. Cette étape achevée, les billes sont regroupées dans un unique stock, définissant un biocapteur 3-plexe. Cette suspension est incubée avec les différentes enzymes cibles purifiées, soit *Pst1*, *UDG* et/ou *APE1*. Egalement, un inhibiteur connu de l'*UDG*, l'*Ugi* (« *Uracil glycosylase inhibitor* ») a été testé sur notre outil de détection. Les billes sont analysées par cytométrie en flux et les résultats rapportés en Figure 77.

L'enzyme *Pst1* conduit à la coupure majoritaire de la sonde correspondante et, dans une moindre mesure, de l'oligonucléotide *THF-Q4*. Cette activité, déjà observée précédemment, a été commentée dans le paragraphe 1.2 de ce chapitre. En revanche, la présence de l'uracile dans le site de restriction inhibe totalement l'enzyme. L'activité enzymatique de *APE1* conduit exclusivement au clivage contenant l'analogue de site abasique. La co-digestion des sondes supportées avec l'*AP*-endonucléase et la glycosylase *UDG* induit l'augmentation de la fluorescence des billes *THF-Q4* et *Ura-Q4*. L'ajout de l'inhibiteur *Ugi*, en plus de ses deux enzymes, inhibe uniquement la réparation de la sonde contenant l'uracile, confirmant la sélectivité de l'inhibiteur pour l'uracile *N*-glycosylase.

Notons ici que les signaux maximum observés pour chacune des sondes possèdent des intensités très similaires, traduisant la bonne fonctionnalité à la fois des sondes mais également des billes encodées.

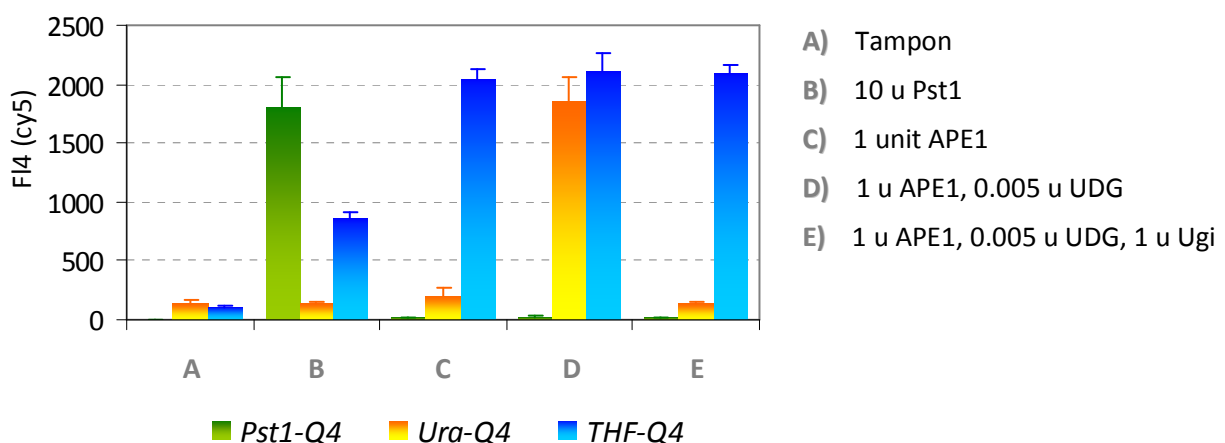


Figure 77: Test triplexe de détection d'activités enzymatiques purifiées et mise en évidence de la spécificité de l'inhibiteur *Ugi* pour la glycosylase *UNG*. Les 3 populations de billes encodées fonctionnalisées par les sondes *Q4* sont incubées ensemble dans différentes conditions (A-E). Les données enregistrées par le cytomètre en flux sont traitées pour déterminer la fluorescence en cyanine 5 correspondant au taux de coupure pour chaque sonde.

Par ces résultats, nous démontrons ici la spécificité du test pour l'activité enzymatique ciblée. Egalement, on note l'excellente reproductibilité de l'expérience, réalisée à plusieurs jours et semaines d'intervalle, avec des lots de billes indépendants pour chaque test. Dans ce test qualitatif, les données expérimentales s'accordent parfaitement avec les résultats attendus. En outre, ce dernier est capable de mettre en évidence la différence de sélectivité de l'enzyme Pst1, applicable aux enzymes de la réparation. Ainsi, l'enzyme de restriction possède une activité accrue sur son site natif (*Pst1-Q4*), faible sur la sonde endommagée par le site abasique (*THF-Q4*) et nulle lorsque la cytosine centrale du site de restriction est désaminée (*Ura-Q4*).

2.6.b. Détection multiplexée d'activités enzymatiques au sein d'extraits de cellules HeLa

Dans la continuité des expériences exposées précédemment, les activités APE1 et UNG ont été prospectées au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Plus particulièrement, il est intéressant de comparer les mesures mono ou multiparamétriques réalisées avec le test multiplexe. La détection monoparamétrique comprend l'incubation d'une unique population de billes (*Pst1*, *Ura* OU *THF-Q4*) avec l'échantillon d'extrait nucléaire. Les billes encodées fonctionnalisées sont rassemblées post-incubation et analysées collectivement par cytométrie en flux. La détection multiparamétrique consiste à incuber les trois lots de billes supportant les trois sondes différentes (*Pst1*, *Ura* ET *THF-Q4*), au sein du même échantillon. Nous pouvons ainsi évaluer l'influence de la présence des autres billes sur le clivage de la sonde étudiée.

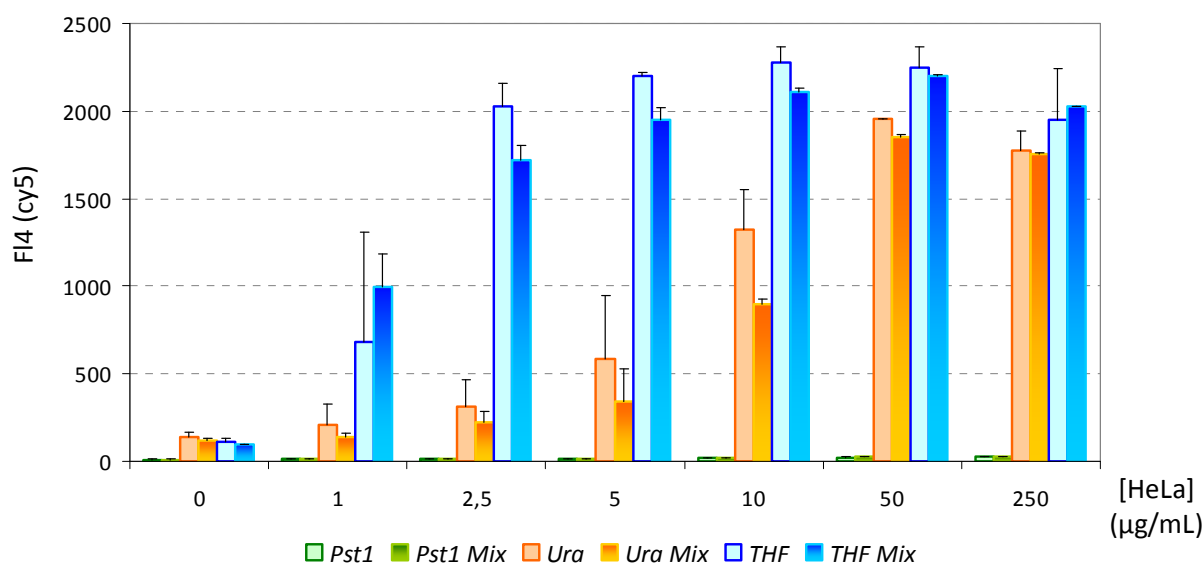


Figure 78: Test triplex de détection des activités APE1 et UNG au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Les 3 populations de billes encodées fonctionnalisées par les sondes Q4 sont digérées séparément ou ensemble (MIX) par une gamme d'extrait. Les données enregistrées par le cytomètre en flux sont traitées pour déterminer la fluorescence en cyanine 5 correspondant au taux de coupure pour chaque sonde.

Les résultats exposés en Figure 78 établissent la relation dose dépendante entre la réparation des lésions THF et uracile et la concentration protéique de l'échantillon. En accord avec les conclusions précédemment exposées, le clivage de la sonde *THF-Q4* est observé dès 1 µg/mL d'extrait. Des concentrations 2 fois supérieures sont requises pour détecter les activités de réparation spécifiques de l'uracile. La spécificité du clivage est corroborée par le signal invariant des billes témoins *Pst1-Q4*.

Aussi, une analyse statistique simple a permis de mettre en évidence que le taux de clivage de la sonde *Ura-Q4* est réduit lorsque les billes sont incubées en mélange (assignées du suffixe « MIX » dans la Figure 78). La coupure de la sonde faisant également intervenir l'enzyme APE1, il est possible que cette diminution d'activité provienne du détournement partiel de l'enzyme, occupée à cliver les sites THF. Ce phénomène de compétitivité peut être mis à profit pour l'étude intégrative de la réparation, ou la recherche d'analogues nucléosidiques inhibiteurs, pertinente pour des applications thérapeutiques. La versatilité et la facilité de mise œuvre de ce biocapteur, résidant dans la fonctionnalisation sélective et indépendante des billes par divers types de sondes, est un atout majeur par rapport à d'autres tests fonctionnels de la réparation de l'ADN.

Par la suite, l'activité de l'inhibiteur Ugi dans ce même extrait a été examinée grâce au test triplexe. Nous nous sommes placés à une concentration en extrait de 50 µg/mL, pour laquelle la coupure des sondes *Ura* et *THF-Q4* est maximale. L'extrait est préincubé avec une dose croissante d'inhibiteur avant d'être exposé au biocapteur. Après une heure d'incubation à 37°C, les billes sont analysées par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés en Figure 79. En corrélation avec les résultats obtenus pour le test à partir des enzymes purifiées (V.2.6.a et Figure 80), on observe une inhibition spécifique et exclusive de la sonde contenant l'uracile. Il est intéressant de remarquer que cette inhibition n'est pas proportionnelle à la concentration en Ugi. En effet, la réponse du biocapteur à 10^{-4} u/µL d'Ugi est quasi bimodale, se traduisant par un écartype élevé, alors que l'inhibition d'UNG est inexistante à $5 \cdot 10^{-5}$ u et maximale à $2.5 \cdot 10^{-4}$ u. Le même effet de seuil est observé lorsque que l'inhibiteur est incubé avec l'enzyme purifiée UDG. Pour interpréter ce résultat, il est nécessaire de comprendre le mécanisme d'inhibitor: l'Ugi est une petite protéine monomérique d'une dizaine de kDa produite par les bactériophages *Bacillus subtilis* PBS1 et PBS2 [838]. Ugi inactive l'uracile N-glycosylase de différents organismes en formant un complexe 1 : 1 avec l'enzyme [839, 840]. La formation de ce complexe est accomplie en deux temps : une phase d'ajustement (« docking ») caractérisée par un assemblage réversible des deux partenaires ; s'en suit une phase de verrouillage (« locking ») menant à la fixation irréversible³⁶ de l'Ugi dans le site de

³⁶ Dans les conditions physiologiques. Cette interaction est de nature non covalente et peut être rompue en conditions dénaturantes (e.g. 5-8 M urée)

fixation à l'ADN de la glycosylase. Le mécanisme d'inhibition de l'Ugi est donc comparable à un inhibiteur suicide conduisant à la désactivation permanente de l'enzyme. L'efficacité d'inhibition est dépendante du temps et il n'est donc pas possible de calculer la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) dans ce cas. Ceci explique par ailleurs que l'on raisonne en quantités d'inhibiteur effective et non en concentrations. Or, dans les expériences classiquement menées sur cet inhibiteur, ce dernier est préincubé avec l'enzyme (10 minutes dans notre cas). La constante de vitesse de formation du complexe a été estimée à 195 s^{-1} [841]. Ainsi, après 10 minutes d'incubation, on peut s'attendre à ce que l'interaction soit complète. Par conséquent, lors de l'ajout du substrat, la quantité d'enzyme complexée inactivée est définie et le clivage des sondes n'est médié que par les glycosylases libres. Ceci explique que l'inhibition ne soit pas directement corrélée à la quantité d'inhibiteur comme c'est le cas pour la méthoxyamine, mais que la gamme dynamique soit restreinte entre $5 \cdot 10^{-5} \text{ u}$ et $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ u}$ d'Ugi soit un rapport 1/5 entre ces deux valeurs, comparable à la gamme dynamique obtenue pour l'inhibition de l'UDG purifiée comprise entre $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ u}$ et $1 \cdot 10^{-4} \text{ u}$ (soit un rapport 1/4).

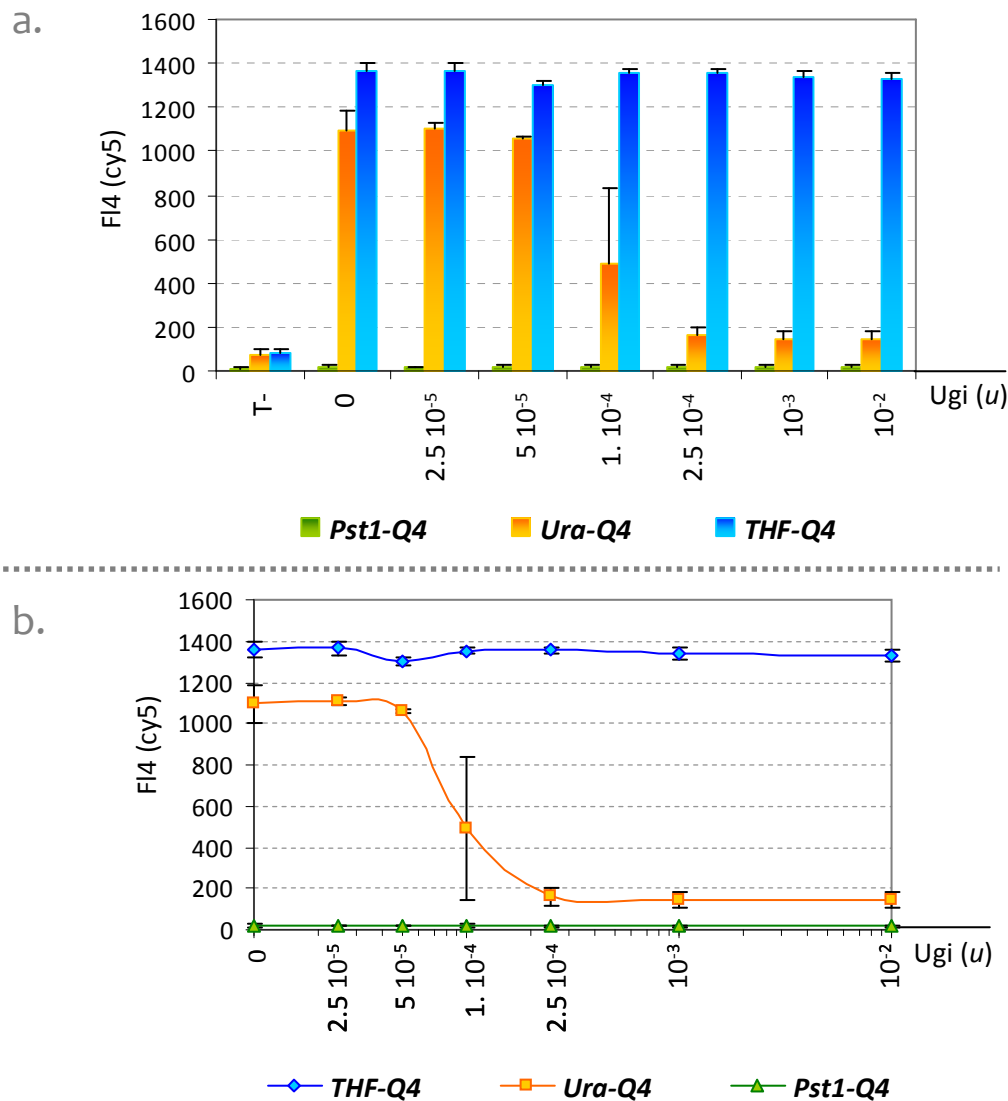


Figure 79: Mise en évidence de l'inhibiteur d'UNG par l'Ugi, dans un extrait nucléaire de cellules HeLa.

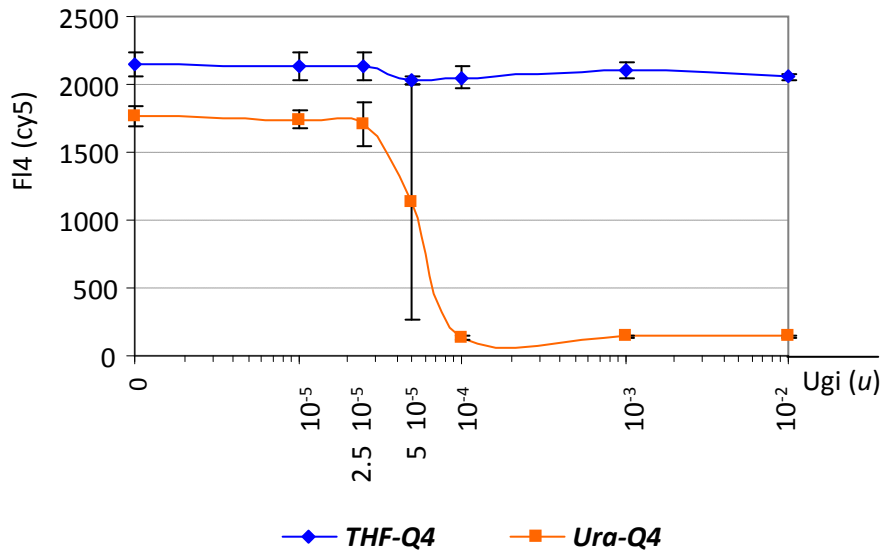


Figure 80: Inhibition d'UDG (0.001 u) purifiée par Ugi. Les échantillons sont complétés par 1 u d'APE1 pour révéler les sites abasiques générés par la glycosylase.

3. Conclusion et Perspectives

La détection multiplexée d'activités enzymatiques entend la mesure de la fonctionnalité des protéines ciblées, au sein d'un même échantillon. Ainsi, les principaux avantages sont :

- ⇒ Un besoin d'échantillon réduit (enzymes purifiées, extraits cellulaires,...)
- ⇒ Une incubation de toutes les sondes substrats dans exactement les mêmes conditions
- ⇒ Un temps d'analyse considérablement diminué

Dans un premier temps, les sondes disponibles marquées par différents fluorophores ont permis de démontrer la faisabilité de la détection multiplexée en plusieurs couleurs. Cependant la nécessité de synthétiser de nouvelles sondes pour augmenter la capacité de multiplexage, et les contraintes associées à la détection en fluorescence à plusieurs longueurs d'onde nous ont conduits à développer une nouvelle approche. Ainsi, le test de mesure multiplexé basé sur l'encodage des billes magnétiques par un second fluorophore s'est rapidement imposé comme une stratégie de choix. Les billes d'intensités de fluorescence croissantes sont obtenues très simplement, en moins d'une heure, grâce à l'utilisation de streptavidine marquée à l'alexa488. Certes, la capacité de multiplexage est pour l'instant limitée à 8 activités enzymatiques, et est donc bien en deçà d'autres outils d'analyse parallélisés disponibles commercialement (FlowMetrix, Cytometric Bead Array, ...). Néanmoins, la qualité des billes encodées par la méthode décrite dans ce chapitre, associée au faible coût et à la simplicité d'obtention, nous ont confortés dans le développement et l'utilisation de ce

système « maison ». Dans la perspective d'optimisation de l'encodage, il est envisageable d'employer deux fluorophores différents (conjugués à la streptavidine). Ceci permettrait de décupler les capacités de multiplexage grâce à une détection de l'encodage en deux couleurs. Egalement, ce dispositif peut s'étendre à d'autres applications telles que la mesure d'analytes en solution, ou encore la détection d'acides nucléiques basée sur l'utilisation de « *molecular beacons* » supportés.

La partie applicative relate la détection simultanée des activités APE1 et UDG à partir d'enzymes purifiées ou d'un extrait nucléaire de cellules HeLa. Egalement, le test multiplexe trouve une application prometteuse dans la recherche d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN. A ces fins, nous avons (re)démontré l'inhibition spécifique d'UNG par Ugi. Une collaboration a été initiée récemment avec l'équipe de Nathalie Berthet à l'UJF, pour le développement d'inhibiteurs peptidiques de la protéine bactérienne formamidopyrimidine glycosylase (Fpg).

VI DETECTION DES ACTIVITES DE REPARATION PAR EXCISION DE BASE IN CELLULO

1. Définition du protocole & choix du modèle cellulaire	206
1.1. Démarche expérimentale	206
1.2. Choix du modèle cellulaire	208
2. Conditions de transfection	208
2.1. Choix de l'agent de transfection.....	209
2.2. Cinétique de transfection	211
3. Détection de l'activité APE1 in cellulo	212
3.1. Transfection des sondes témoins et lésées	212
3.2. Normalisation des résultats entre lignées.....	215
3.3. Détermination de la capacité de réparation des lignées KD-CTRL et KD-APE1...	221
4. Conclusion	223

Le phénotypage cellulaire des activités de réparation de l'ADN est classiquement réalisé à partir d'extraits cellulaires faciles à obtenir et à manipuler. Les techniques d'extraction ont été optimisées au mieux pour préserver les échantillons et augmenter la standardisation. Toutefois, il n'existe pas de protocole d'extraction idéal permettant d'être sûr que les activités enzymatiques soient conservées. Egalement, dans un test multiplexe sur extrait cellulaire, le choix du tampon est primordial afin de s'assurer de la fonctionnalité des protéines ciblées. Enfin, la perte d'interactions protéiques ainsi que de la régulation et compartimentalisation de certaines activités sont autant de facteurs pouvant influencer sur les résultats du test qui ne sont, dès lors, que le reflet déformé de ce qu'il se passe réellement dans les cellules. Sur la base de ce constat, il semble intéressant de disposer d'une méthode de détection des activités de réparation directement au sein de cellules vivantes.

Inspiré des développements du test *in vitro* de détection de la réparation de l'ADN par cytométrie en flux, nous avons adapté celui-ci à la détection *in cellulo* par cytométrie en flux. D'une part le caractère profluorescent des sondes dont nous disposons est complètement compatible à la détection *in cellulo* ; d'autre part, l'analyse par cytométrie en flux est directement transposable des microbilles aux cellules. Ce chapitre relate les derniers travaux menés au cours de la thèse et les développements associés concernant la mesure d'activités BER *in cellulo*.

1. Définition du protocole & choix du modèle cellulaire

Le principe de la détection *in cellulo* est basé sur la transfection³⁷ de cellules en culture par les sondes pro-fluorescentes substrats. Comme sur microbilles, l'activité de réparation induit le clivage de la sonde et la déshybridation de l'édifice. Le quencher se retrouve alors éloigné du fluorophore, permettant à ce dernier de fluorescer à nouveau. Les cellules sont *in fine* analysées par cytométrie en flux, l'intensité de fluorescence reflétant la capacité de réparation de celles-ci.

1.1. Démarche expérimentale

La démarche expérimentale adoptée pour définir la preuve de concept est schématisée en Figure 81. Les cellules sont premièrement mises en culture puis, après au moins deux passages, sont ensemencées en microplaques. Après une nuit de croissance, permettant aux cellules d'atteindre environ 70 % de confluence, les sondes sont transfectées chimiquement. Au bout d'un certain temps de mise en contact, les cellules sont rincées, récoltées pour finalement être resuspendues dans du

³⁷ La transfection caractérise le transfert d'un acide nucléique exogène à l'intérieur de cellules eucaryotes non médié par un virus, par opposition à la transduction. Ce phénomène est analogue à la transformation qui ne concerne que les cellules procaryotes.

PBS avant d'être analysées par cytométrie en flux. Certaines expériences de microscopie ont également été menées. Dans ce cas, les cellules adhérentes sont simplement rincées, puis fixées par une solution aqueuse à 4 % de paraformaldéhyde avant d'être imagées.

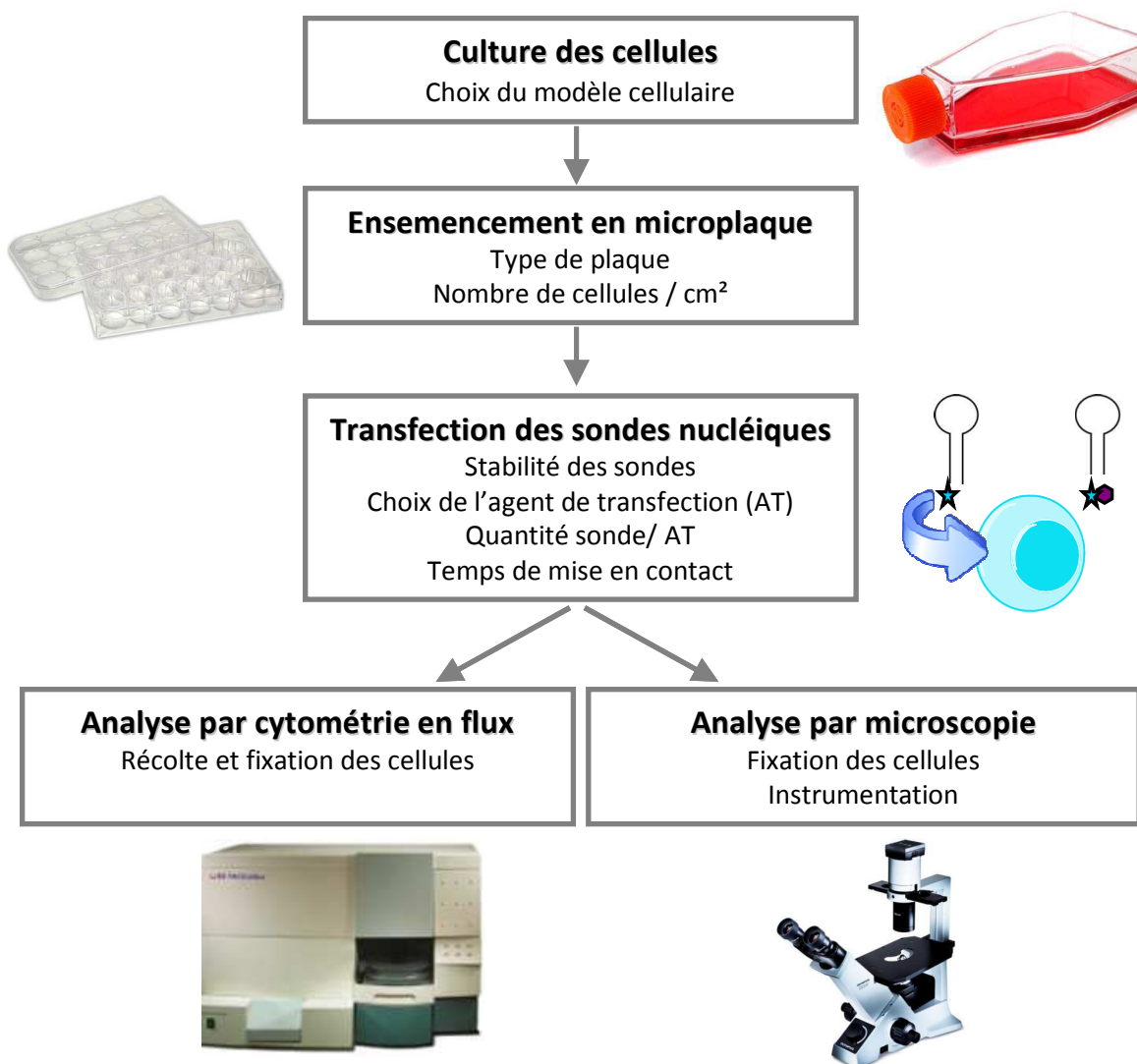


Figure 81: Plan d'expérience pour la détection d'activités de réparation par excision de base *in cellulo*.

1.2. *Choix du modèle cellulaire*

Afin de mettre au point le test, il était judicieux d'utiliser des cellules déficientes ou proficientes en une certaine activité de réparation. Cohérents avec ces critères, nous avons choisi d'employer deux sous lignées issues de la lignée de glioblastome humain LN428. L'une, KD-CTRL, est la lignée de référence « wild type », l'autre, KD-APE1, sous produit la protéine APE1 par l'expression d'un shARN dirigé contre la protéine (cf. IV.6.2).

La transfection des sondes pro-fluorescentes substrats dans les cellules en culture permettrait de détecter l'activité APE1 par cytométrie en flux, se manifestant par une augmentation de la fluorescence des cellules suite au clivage des oligonucléotides.

2. Conditions de transfection

L'internalisation spontanée de sondes nucléiques est improbable en raison de la charge de l'ADN qui n'est pas compatible avec la barrière membranaire des cellules. Ainsi, plusieurs méthodes de transfection ont été développées [842]. Sommairement, les techniques de transfection sont classées en méthodes biologiques, chimiques ou physiques. Les méthodes biologiques comprennent la transfection médiée par un virus, autrement nommée transduction. Cette technique est largement utilisée dans la recherche clinique car elle permet l'expression stable d'un vecteur *in vitro*, comme *in vivo*. Les méthodes chimiques sont les plus largement employées pour l'introduction de sondes ou de gènes dans tout type de cellules eucaryotes. Elles reposent sur la complexation de l'ADN par un composé positivement chargé qui permet le passage de la membrane plasmide selon un mécanisme probablement endocytaire ou par phagocytose. Ces composés très divers incluent le phosphate de calcium [843, 844], des polymères [845], des dendrimères [846], des cyclodextrines [847] ou des lipides cationiques [848]. Les méthodes physiques sont parmi les plus récentes: la microinjection, l'électroporation [849], les méthodes biolistiques [850, 851], l'optoporation (transfection médiée par un laser) [852], la magnétofection [853] ou encore la sonoporation (transfection médiée par ultrasons) [854], sont autant de technologies développées dans le but de distribuer des acides nucléiques intra-cellulairement. L'électroporation est probablement la méthode physique la plus utilisée car elle permet la transfection quasi instantanée d'un grand nombre de cellules. Toutefois, comme toutes les méthodes physiques, l'application d'un choc électrique peut stresser ou tuer les cellules.

Le laboratoire de Biologie à Grande Echelle du CEA Grenoble possède une solide expertise dans le domaine de la transfection. Une collaboration a été initiée avec ce laboratoire dans le cadre

de ce projet. Nous avons dans un premier temps défini un protocole adéquat pour la transfection des cellules LN428. Une méthode simple et répandue est la lipofection [848]. Cette technique utilise des lipides cationiques qui vont former des agrégats avec les acides nucléiques chargés négativement. Une charge globale positive améliore l'efficacité de la transfection en favorisant l'interaction des complexes avec la glycocalix [855]. La formation de liposomes va faciliter la fusion de ces structures avec les membranes plasmiques et donc promouvoir l'internalisation de l'ADN qui est libéré à l'intérieur des cellules. Les principaux avantages de la lipofection sont la très bonne efficacité de transfection générale, sa capacité à transférer toutes sortes d'acides nucléiques, sa facilité d'utilisation et sa faible toxicité.

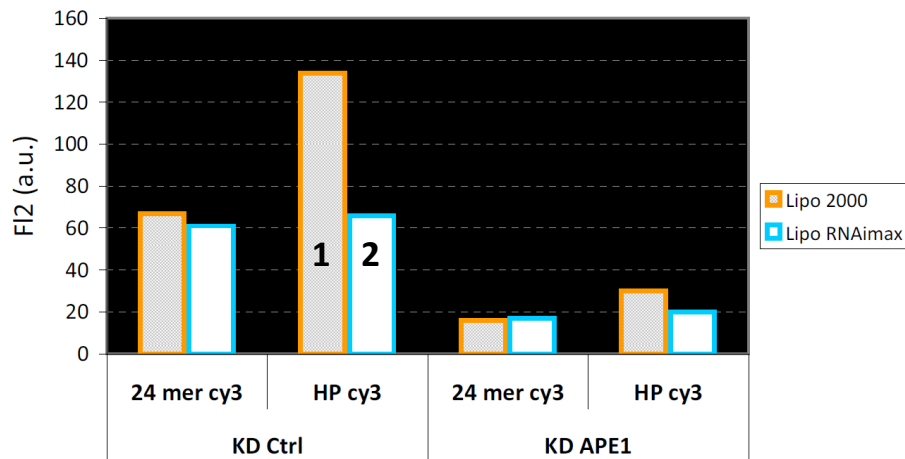
2.1. Choix de l'agent de transfection

De nombreux agents de transfection de ce type sont désormais disponibles sur le marché. L'efficacité de transfection par cette technique dépend à la fois du type cellulaire et du type d'acide nucléique (plasmide, oligonucléotide, série ARN, ADN, PNA, ...). Une première étude a été menée pour définir un bon agent de transfection pour nos sondes. Deux composés spécialement développés pour la transfection d'oligonucléotides ont été testés : la lipofectamine 2000 et la lipofectamine RNAimax (*Life Technologies*). Pour cette expérience, un oligonucléotide simple brin (20-mer) et une structure tige-boucle, tout deux marqués par une cyanine 3, sont transfectés dans les lignées cellulaires KD-CTRL et KD-APE1. Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules sont analysées par cytométrie en flux et imagées par microscopie à épifluorescence. Le traitement des données enregistrées par cytométrie en flux donne deux informations importantes (Figure 82a) : le pourcentage de cellules transfectées qui correspond au nombre de cellules positives en cy3 par rapport aux cellules non traitées, et la moyenne de fluorescence en F12 (cy3) exprimée en unités arbitraires. Ensemble, ces deux valeurs traduisent l'efficacité de la transfection. Cette expérience a permis de tirer plusieurs conclusions. On remarque une différence non négligeable de transfection entre les deux lignées cellulaires. En effet le taux de transfection de la lignée KD-CTRL est quasi quantitatif quel que soient les conditions tandis que celui de la lignée KD-APE1 atteint au maximum 62 % lorsque les cellules sont transfectées avec la sonde double brin et la lipofectamine 2000. Ce résultat est corrélé à un plus faible signal de fluorescence de la lignée KD-APE1 transfectée. Globalement, on remarque que la sonde double brin est mieux transfectée que l'oligonucléotide simple brin, d'autant plus lorsque la lipofectamine 2000 est utilisée (Figure 82b). L'imagerie par microscopie confirme que la sonde de type *hairpin* est internalisée plus efficacement avec la lipofectamine 2000 qu'avec la lipofectamine RNAimax (Figure 82c). Ensemble, ces observations ont guidé notre choix de la lipofectamine 2000 pour les expériences ultérieures.

a.

KD CTRL	KD APE1	Lipofectamine 2000		Lipofectamine RNAimax	
		% transfection	FI2 (u.a.)	% transfection	FI2 (u.a.)
24 mer cy3	98	67	96	61	
	27	16	53	17	
HP cy3	99	134	99	66	
	62	30	6	20	

b.



c.

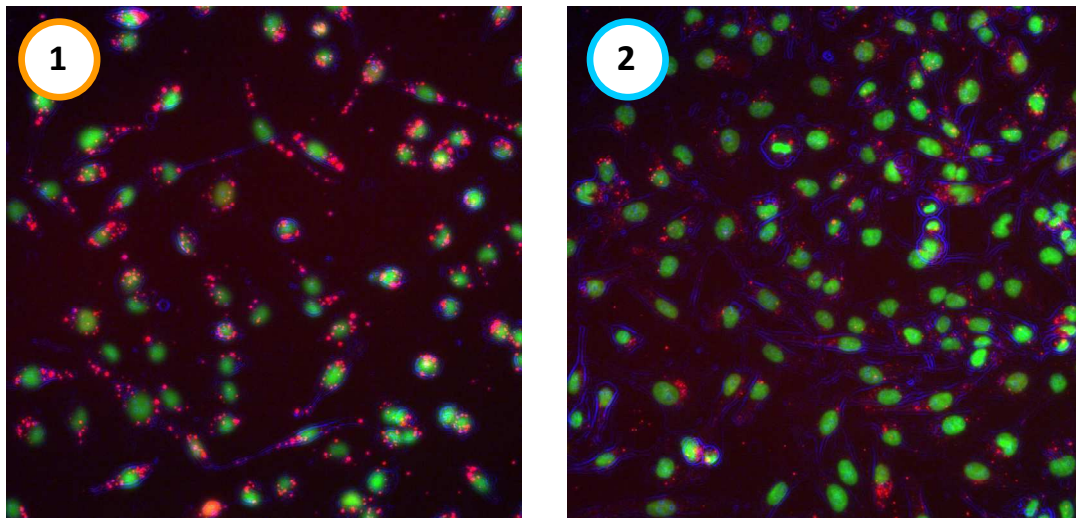


Figure 82: Evaluation de l'efficacité de transfection des lignées KD-CTRL et KD-APE1. Les oligonucléotides (24-mer linéaire et 44-mer "hairpin") marqués par la cyanine 3 sont transfectés dans les deux lignées cellulaires par lipofection (Lipofectamine 2000 ou RNAimax, 24h, 37°C, 5 % CO₂): a) taux de transfection et moyenne de fluorescence cellulaire (cy3) pour chaque conditions (lignées, ODN, agent de transfection), analysés par cytométrie en flux; b) Représentation graphique des moyennes de fluorescence cellulaire ; c) visualisation par microscopie à épifluorescence des cellules KD-CTRL transfectées par l'hairpin cy3 avec la lipofectamine 2000 ① ou RNAimax ② (bleu = segmentation des cellules, vert = marquage de noyau au Hoechst 532, rouge = HPcy3).

2.2. Cinétique de transfection

De nombreux travaux utilisent la transfection d'oligonucléotides pour inhiber la production d'une protéine par la stratégie triple-hélice, antisens ou d'interférence par ARN. Ces applications justifient des temps de transfection longs (typiquement 24 heures), en raison de la lenteur des mécanismes de transcription dans une cellule humaine, suite à l'induction du gène ciblé. En comparaison, nous cherchons à détecter une activité enzymatique déjà présente au sein des cellules lors de la transfection. Dans le but de mieux appréhender l'effet cinétique de la transfection sur la détection de l'activité de réparation, la sonde de type *hairpin* (cy3) a été transfectée dans les deux lignées cellulaires étudiées avec des temps de mise en contact de 2, 4 ou 8 heures. Suite aux lavages des cellules, celles-ci sont fixées puis analysées par cytométrie en flux. Les résultats présentés en Figure 83 confirment la plus faible efficacité de transfection des cellules KD-APE1 par rapport aux cellules KD-CTRL. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette observation. L'effet le plus plausible provient de la taille des cellules, significativement plus petites dans la lignée KD-APE1. Ainsi, la surface de contact entre les cellules et le milieu se trouve plus faible dans ce cas, limitant statistiquement et physiquement l'interaction des lipoplexes avec les membranes. Aussi, les cellules sont ensemencées 14 heures avant la transfection. Cet intervalle de temps est nécessaire pour permettre aux lignées d'adhérer au fond des puits et de se multiplier. Or, il se trouve que les cellules KD-APE1 se divisent plus rapidement que les cellules KD-CTRL. *In fine* la densité de cellules KD-APE1 est supérieure aux cellules KD-CTRL au moment de la transfection. Le nombre théorique de sondes par cellule se retrouve donc une fois de plus diminué pour la lignée KD-APE1. Enfin, ces cellules sont constitutivement modifiées pour ne plus produire la protéine APE1. Ce bouleversement métabolique peut influencer sur plusieurs autres voies cellulaires et induire, par exemple, une diminution de la perméabilité membranaire expliquant une possible résistance à la transfection.

Aussi on remarque que le taux de transfection est pratiquement à son apogée entre 4 et 8h, bien que le signal moyen de fluorescence (« Mean Fluorescence Signal », MFI) continue d'augmenter. Dans un souci de pouvoir détecter une différence d'activités entre les deux lignées, nous avons choisi un temps de mise en contact des cellules avec les sondes complexées de 5 heures, en adéquation avec d'autres travaux reportés dans la littérature [714, 715].

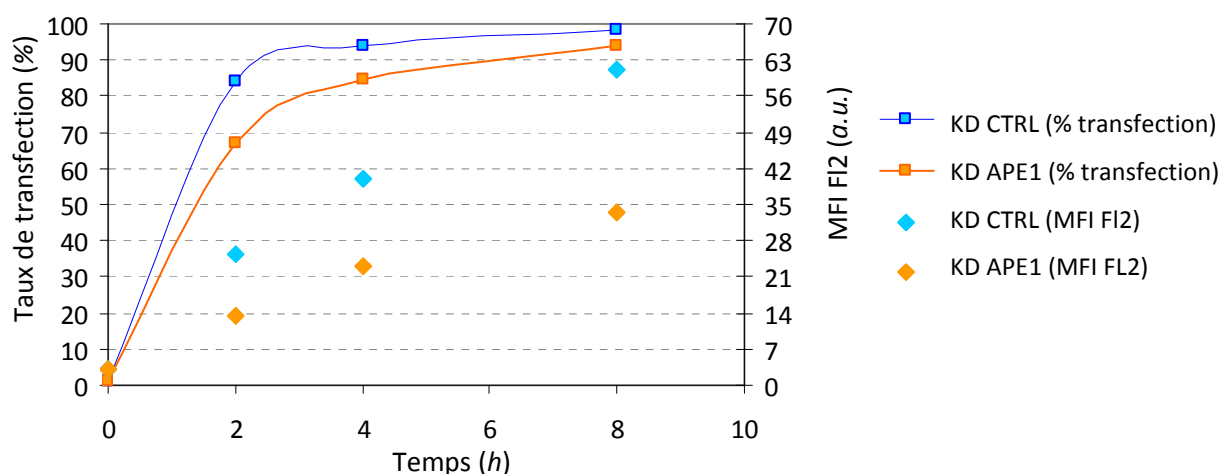


Figure 83: Cinétique de transfection des cellules LN428 par une sonde fluorescente (HP cy3).

3. Détection de l'activité APE1 in cellulo

3.1. *Transfection des sondes témoins et lésées*

Les expériences présentées dans ce paragraphe ont eu pour but de cibler les éventuels problèmes de stabilité des sondes ainsi que de déterminer la capacité de cette méthode à détecter l'activité APE1 au sein de cellules vivantes. En effet, dans ce cas, les oligonucléotides ne sont pas protégés par la conjugaison de l'extrémité 3' à un support. Nous pouvons donc nous attendre à une dégradation au moins partielle des sondes au sein des cellules, médiée par les DNAses. A ces fins, une première expérience exploratoire a consisté à transfecter, dans les deux lignées dont nous disposons, les sondes *Pst1-F3*, *Pst1-Q3*, *Pst1-Q4* et *THF-Q4*. La transfection de la sonde *Pst1-F3* servira de contrôle positif de transfection. Par différentiel, ce contrôle permettra d'évaluer la dégradation des témoins négatifs *Pst1-Q3* et *Q4*. En comparaison avec les témoins négatifs et positifs, l'activité spécifique d'APE1 vis-à-vis de la sonde *THF-Q4* pourra être évaluée. Les cellules sont récoltées à 2, 4 ou 6 heures après la mise en contact avec les lipoplexes. Les moyennes géométriques de fluorescence (cy5) pour chaque échantillon sont compilées en Figure 84a.

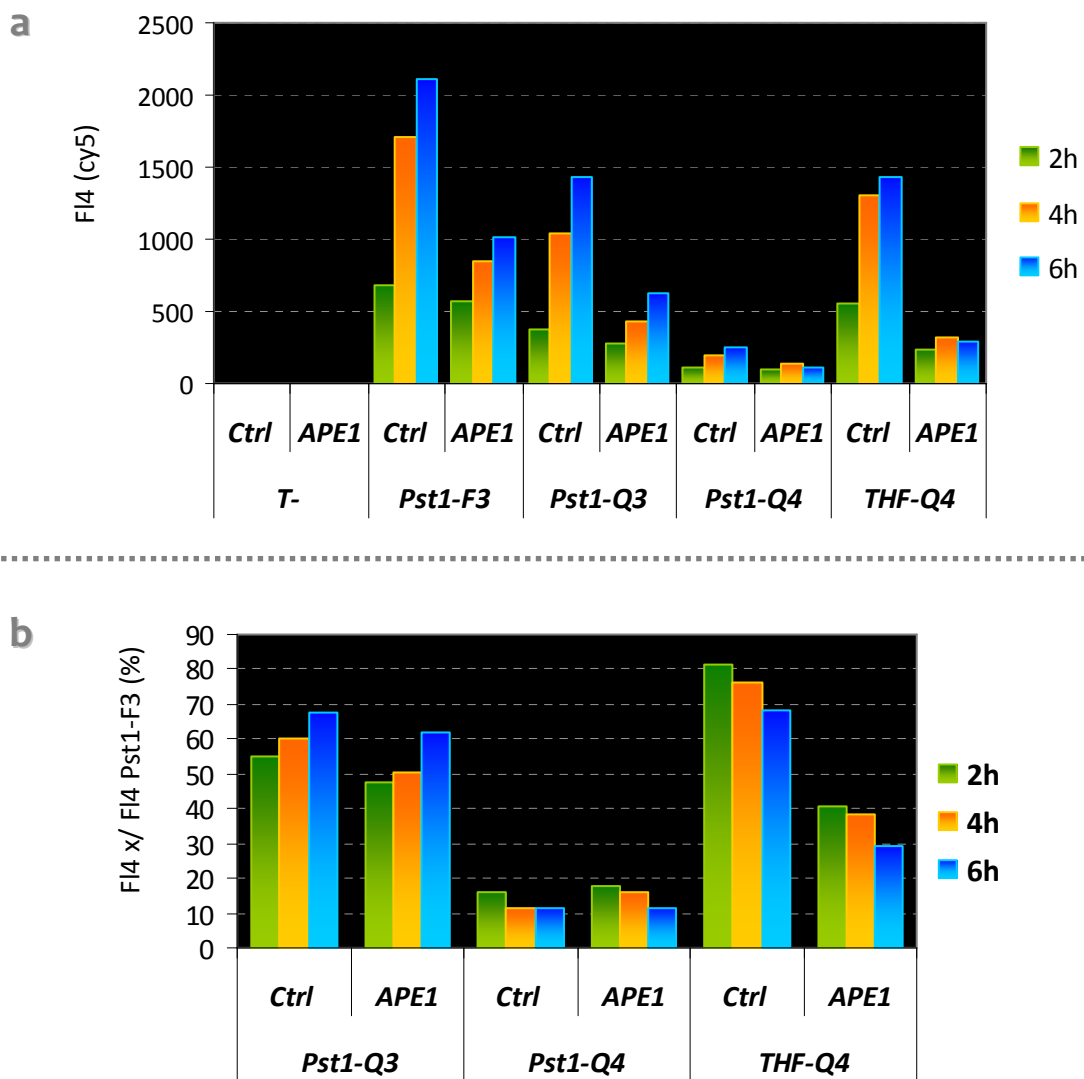


Figure 84: Cinétique de transfection des lignées KD-CTRL et KD-APE1 avec les sondes fluorescentes et quenchées (*F3*, *Q3* et *Q4*) et évaluation de la stabilité des sondes quenchées *in cellulo*. Les cellules, transfectées par la lipofectamine 2000, sont récoltées à un temps donné et analysées par cytométrie en flux (FI4) : a) La fluorescence moyenne mesurée pour chaque échantillon est b) normalisée par rapport au témoin de transfection positif (*Pst1-F3*).

Ce graphique donne accès à plusieurs informations détaillées et commentées ci-après.

- 1) La transfection de la sonde *Pst1-F3* démontre la bonne efficacité de transfection des oligonucléotides, en admettant que le quencher des sondes *Q3* et *Q4* n'influe pas sur ce paramètre. Le temps de transfection optimal semble se situer entre 4 et 6 heures, temps pour lesquels le signal de fluorescence moyen est maximal. Aussi, on retrouve des valeurs moyennes de fluorescence plus faibles d'environ 50 % dans la lignée KD-APE1 par rapport à la lignée contrôle.

- 2) La sonde *Pst1-Q3* est rapidement dégradée *in cellulo*. Ce résultat se manifeste par une augmentation de la fluorescence des cellules transfectées par cette sonde non lésée au cours du temps. Or, cette sonde a montré une bonne stabilité au sein de différents extraits cellulaires dans le test *in vitro* (cf. § IV.6.2). Ceci confirme l'importance de la protection des extrémités conférée par la présence de la microbille. La dégradation de la sonde *Pst1-Q* est observée à la fois *in vitro* (cf. § IV.4.2) et *in cellulo* (données non montrées). La digestion en solution de cet oligonucléotide par un extrait de cellules HeLa avait montré l'apparition d'un produit de dégradation fluorescente résultant de l'excision unique du dabcyI. Il semble donc que le quencher joue dans ce cas un rôle non négligeable dans la stabilité de l'oligonucléotide vis-à-vis des nucléases cellulaires.
- 3) En revanche, la transfection de *Pst1-Q4* démontre la résistance de la sonde à la dégradation non spécifique. En effet, la fluorescence des cellules transfectées reste faible même après 8 heures de contact avec la solution de transfection. Le simple remplacement du dabcyI par le BHQ2 stabilise donc les sondes nucléiques qui ne nécessitent pas, dès lors, une consolidation supplémentaire, par exemple par l'introduction de liens phosphorothioates ou de nucléosides modifiés.
- 4) Enfin, on mesure un différentiel significatif de fluorescence des cellules transfectées par la sonde *Pst1-Q4* ou *THF-Q4*. Cette différence de signal peut vraisemblablement être attribuée à la coupure spécifique du site abasique par APE1.

Ainsi, nous démontrons ici la viabilité de la méthode concernant la détection *in cellulo* de l'activité APE1 par cytométrie en flux. En raison d'une efficacité de transfection réduite de la lignée « knock down », il n'est pas possible de conclure directement à une activité APE1 plus faible dans cette lignée par rapport à la lignée contrôle. Néanmoins, une normalisation simpliste des moyennes de fluorescence par rapport à la fluorescence maximale observée pour chaque lignée transfectée avec la sonde fluorescente *Pst1-F3* confirme cette tendance (Figure 84b). Les travaux qui suivent ont été conduits afin de pallier à cette limitation biologique causant la différence de transfection des deux lignées cellulaires.

3.2. Normalisation des résultats entre lignées

Comme nous venons de l'énoncer, l'efficacité de transfection entre les lignées KD-CTRL et KD-APE1 est différente. La comparaison directe de l'activité APE1 entre les deux lignées n'est donc pas pertinente. Afin de conclure sur la capacité de discrimination de la méthode de détection, il est indispensable de normaliser les résultats obtenus. Pour cela, la co-transfection des sondes avec un second marqueur fluorescent permettrait d'exprimer le taux de fluorescence de la cyanine 5 correspondant donc au clivage des sondes par rapport à un 100 % défini par le second marqueur.

Deux approches ont été employées (Figure 85):

- 1) Les sondes marquées par la cyanine 5 sont co-transfectées avec une seconde sonde *hairpin* fluorescente marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), en concentration équimolaire.
- 2) Les sondes marquées par la cyanine 5 sont immobilisées sur de la streptavidine marquée à l'alexa488 (2 sondes par protéine) et le complexe est transfecté.

Dans la première approche les deux marqueurs (cy5 et FITC) sont spatialement séparés et donc indépendants. Afin de normaliser les résultats, les études utilisant cette approche considère que la transfection des deux marqueurs est identique. Dans le second cas, la sonde est physiquement liée à la streptavidine. Les deux marqueurs sont donc liés et l'internalisation de l'un dépend de la transfection du second.

La cyanine 5 est détectée dans le canal 4 et excitée par la diode laser à 635 nm et le FITC ou l'alexa488 sont détectés dans le canal 1 et excités par le laser argon à 488 nm. Ainsi, toute interférence entre les fluorophores est évitée, permettant de s'affranchir des compensations.

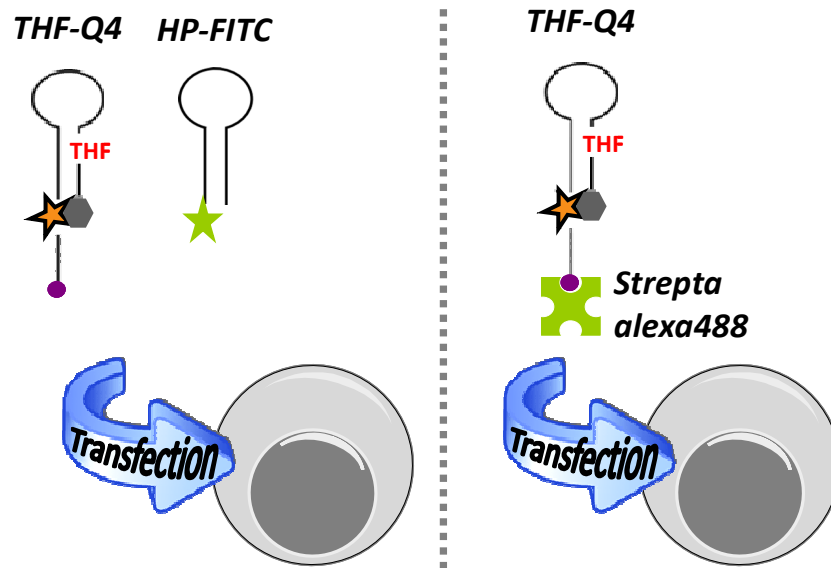
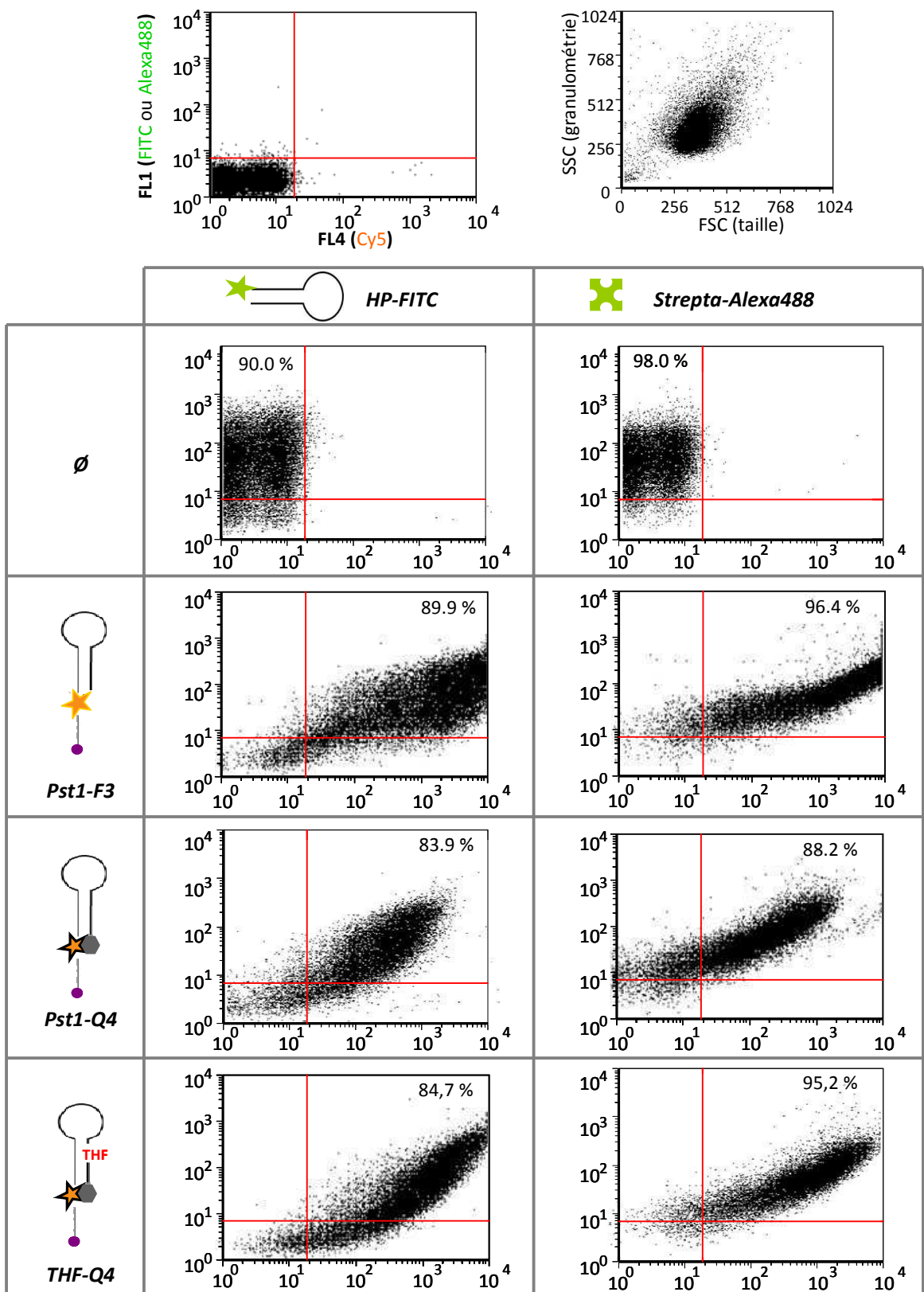


Figure 85: Stratégies de co-transfection des sondes *Q4* avec un contrôle interne indépendant (HP FITC) ou lié (strepta-Alexa488) pour la normalisation des résultats entre lignées.

Afin de comparer les deux contrôles internes de transfection, les sondes *Pst1-F3*, *Pst1-Q4* et *THF-Q4* sont co-transfectées avec l'un ou l'autre des marqueurs. Après 5h de mise en contact, les cellules sont récoltées, fixées et analysées par cytométrie en flux. La fluorescence mesurée dans le canal F11 correspondant au contrôle FITC ou Alexa488 et le signal du canal F14 (cy5) sont enregistrées. Les données brutes pour chaque échantillon sont représentées sous forme de diagrammes à deux dimensions en Figure 86a pour les cellules KD-CTRL et en Figure 86b pour les cellules KD-APE1. En premier lieu, on remarque un taux d'évènements positifs (en F11 et F14) plus important lorsque la co-transfection est réalisée avec la streptavidine, quelles que soient la lignée et la sonde transfectées. Egalement on note une distribution des cellules plus homogène qu'avec l'oligonucléotide FITC comme contrôle interne. En effet, la transfection d'autant de sondes cy5 que du marqueur vert (FITC ou Alexa488) doit se traduire par une distribution linéaire des cellules sur le diagramme 2D « F11 = f(F14) ». Pour chaque échantillon, on remarque que cette condition est remplie lorsque la streptavidine est utilisée comme co-transfectant. En revanche, la distribution est plus hétérogène avec l'oligonucléotide FITC.

a. Cellules KD CTRL



b. Cellules KD APE1

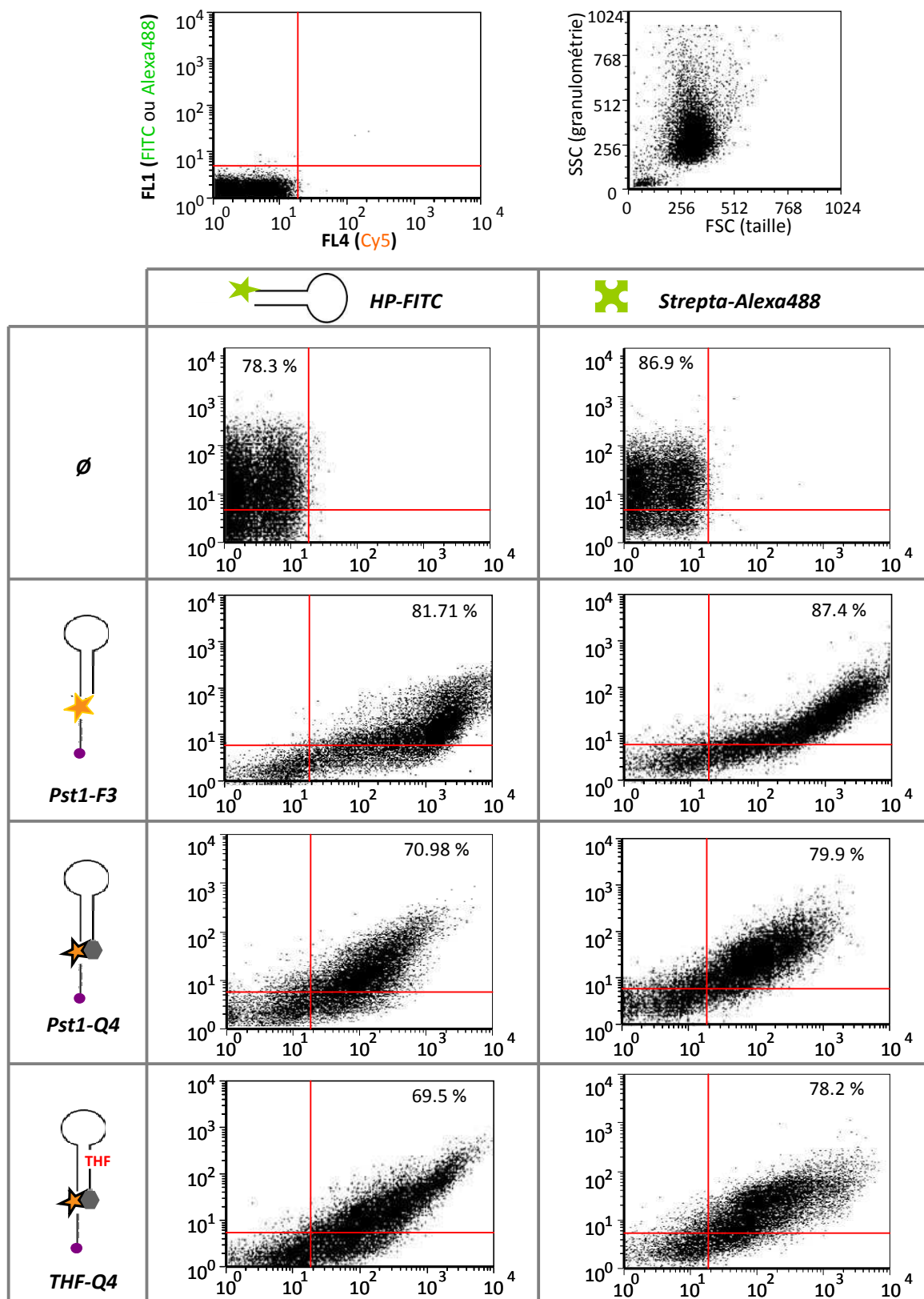


Figure 86: Définition d'un contrôle interne pour la normalisation des résultats de cytométrie en flux : résultats bruts de co-transfection avec les sondes marquées cy5 et une "hairpin" FITC ou la streptavidine marquée à l'alexa488 des cellules a) KD-CTRL ou b) KD-APE1.

Les intensités de fluorescence brutes de la cyanine 5 sont données en Figure 87a. Il est important d'utiliser les moyennes géométriques calculées par le logiciel FCS express, en raison de la distribution normale des valeurs pour chaque cellule selon une échelle logarithmique. Il est intéressant de remarquer que la co-transfection potentialise l'internalisation des sondes quenchées, d'autant plus avec l'acide nucléique FITC.

Ces données ont été normalisées selon deux méthodes utilisant soit le contrôle interne de transfection, soit un contrôle externe défini comme l'intensité de fluorescence des cellules transfectées par l'oligonucléotide non quenchées *Pst1-F3*.

Normalisation par rapport au contrôle externe défini par la sonde *Pst1-F3* (Figure 87b):

$$I_{\text{cy5 relative}} = [I_{\text{FL4 (sonde Q4)}}] / [I_{\text{FL4 (Pst1-F3)}}]$$

Dans ce cas, le résultat est exprimé en pourcentage de clivage des sondes, en admettant que la transfection guide l'internalisation d'autant de sondes fluorescentes que quenchées dans des puits différents. Cette approximation est tolérée du fait que tous les puits subissent le même traitement (ensemencement, transfection, récolte, fixation).

Normalisation par rapport au contrôle interne (Figure 87c):

$$I_{\text{cy5 relative}} = I_{\text{fluo FL4}} / I_{\text{fluo FL1}}$$

Ce calcul simple revient à ramener le contrôle interne à 100 % pour chaque échantillon et à exprimer l'intensité de fluorescence de la cyanine 5 en fonction de ce 100 %.

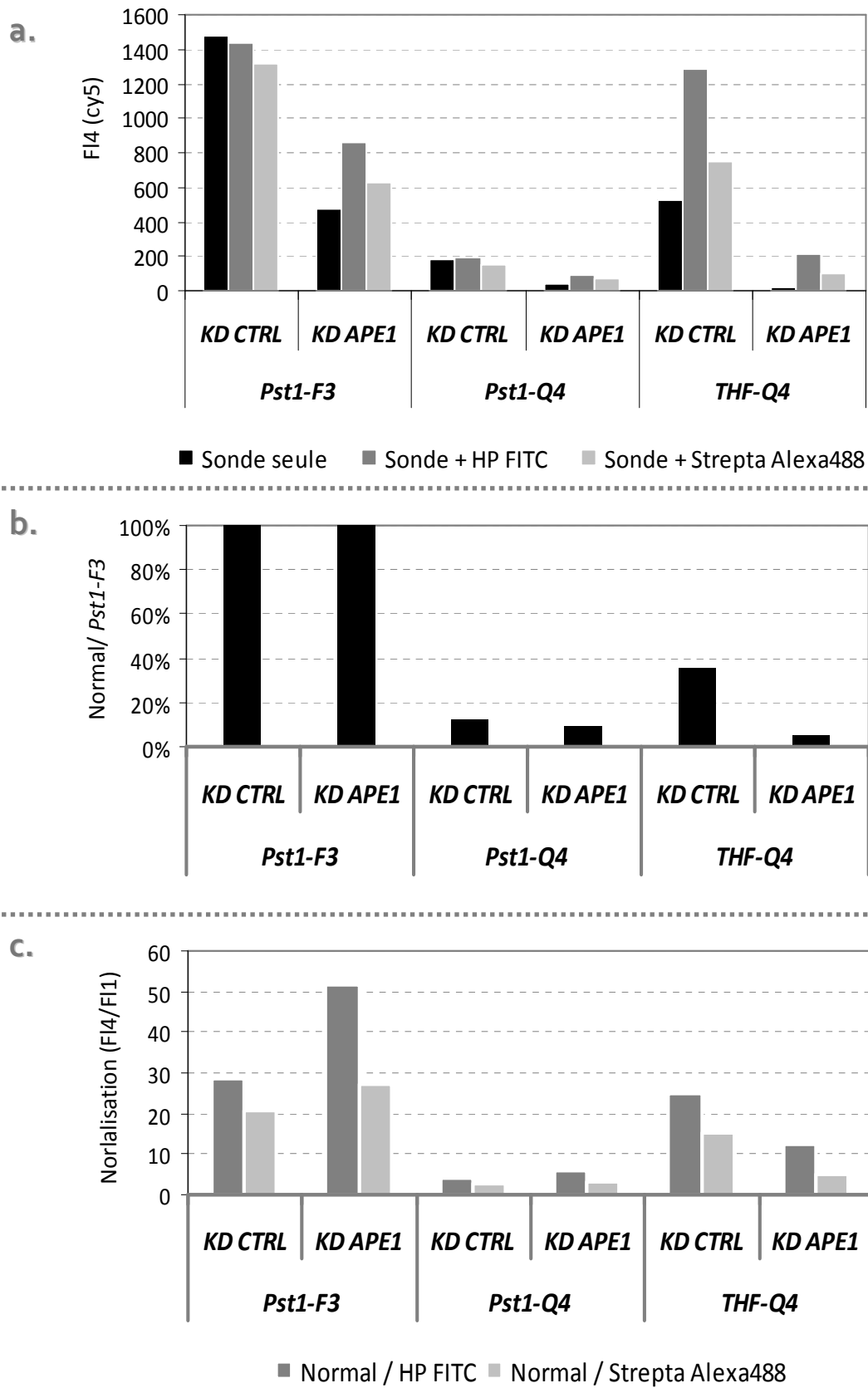


Figure 87: Définition d'un contrôle interne pour la normalisation des résultats de cytométrie en flux : a) les moyennes de fluorescence pour chaque échantillon (Figure 86) sont b) normalisées par rapport à la sonde fluorescente *Pst1-F3* ou c) par rapport au contrôle de transfection interne.

En tout premier lieu on constate que les intensités de fluorescence relatives pour la sonde *Pst1-F3*, normalisées par rapport à la fluorescence de l'ODN FITC sont très différentes. Ce résultat démontre que la transfection de la sonde cy5 n'est pas équivalente à celle de l'oligonucléotide FITC, et infirme donc le postulat selon lequel la co-transfection de ces deux éléments indépendants mène à l'internalisation de la même quantité de ces deux sondes. Par conséquent, cette méthode de normalisation *via* la co-transfection d'une sonde fluorescente est invalidée. En revanche, la normalisation pour la même sonde avec la streptavidine fluorescente donne des résultats similaires pour les deux lignées. Ceci n'a rien d'anormal étant donné que la sonde est liée physiquement à la protéine. Dans ce cas le contrôle interne lié est une méthode de normalisation appropriée, permettant d'exprimer les données, indépendamment de l'efficacité de transfection. En effet, sans aucune surprise le nombre d'acides nucléiques internalisés est corrélé au nombre de protéines transfectées. Ainsi, dans le cadre de la mesure de l'apparition de fluorescence à partir de sondes quenchées, il est permis d'exprimer le signal issu du « déquenching » de la sonde par rapport à un contrôle fluorescent stable. En revanche, la quantification de l'efficacité de transfection d'une molécule fluorescente, ou d'un plasmide exprimant une molécule fluorescente, *via* la normalisation avec un contrôle interne physiquement lié ne présente aucun intérêt, étant donné que les deux signaux mesurés (correspondant aux deux molécules transfectées) dépendent l'un de l'autre. Dans notre cas, la transfection des deux molécules marquées est effectivement interdépendante, mais la fluorescence de la sonde quenchée relève d'un événement indépendant, à savoir, l'activité enzymatique de l'AP-endonucléase.

3.3. Détermination de la capacité de réparation des lignées KD-CTRL et KD-APE1

Pour finir, l'expérience de co-transfection des sondes cy5 avec la streptavidine Alexa488 à été tripliquée et doublée. 10^5 cellules sont ensemencées en plaque 12 puits, 14 heures avant la transfection. Pour chaque puits, 172 ng de streptavidine conjuguée (5 nM finale) et 1 μ L de Lipofectamine 2000 sont utilisés. La concentration finale en oligonucléotide est fixée à 10 nM. Après 5 heures de mise en contact, les cellules sont récoltées, fixées, et finalement analysées par cytométrie en flux. Plus de détails sur les protocoles de culture cellulaire et de transfection sont reportés dans le paragraphe VII.6. En Figure 88a sont présentés les histogrammes de fluorescence mesurée par le détecteur FL4 pour une expérience. Sans tenir compte de la normalisation des moyennes de fluorescence associées, on remarque d'ores et déjà que la fluorescence des cellules transfectées par la sonde *THF-Q4* présente un profil similaire aux cellules transfectées par la sonde témoin fluorescente (*Pst1-F3*) pour la lignée KD-CTRL, et aux cellules transfectées par la sonde témoin quenchée (*Pst1-Q4*) pour la lignée KD-APE1. Cette observation tend à démontrer la plus faible capacité d'incision de la lignée KD-APE1, attribuée à la sous production de l'enzyme APE1.

Aussi, la normalisation des moyennes de fluorescence par rapport au contrôle interne alexa488, confirme cette introspection (Figure 88b).

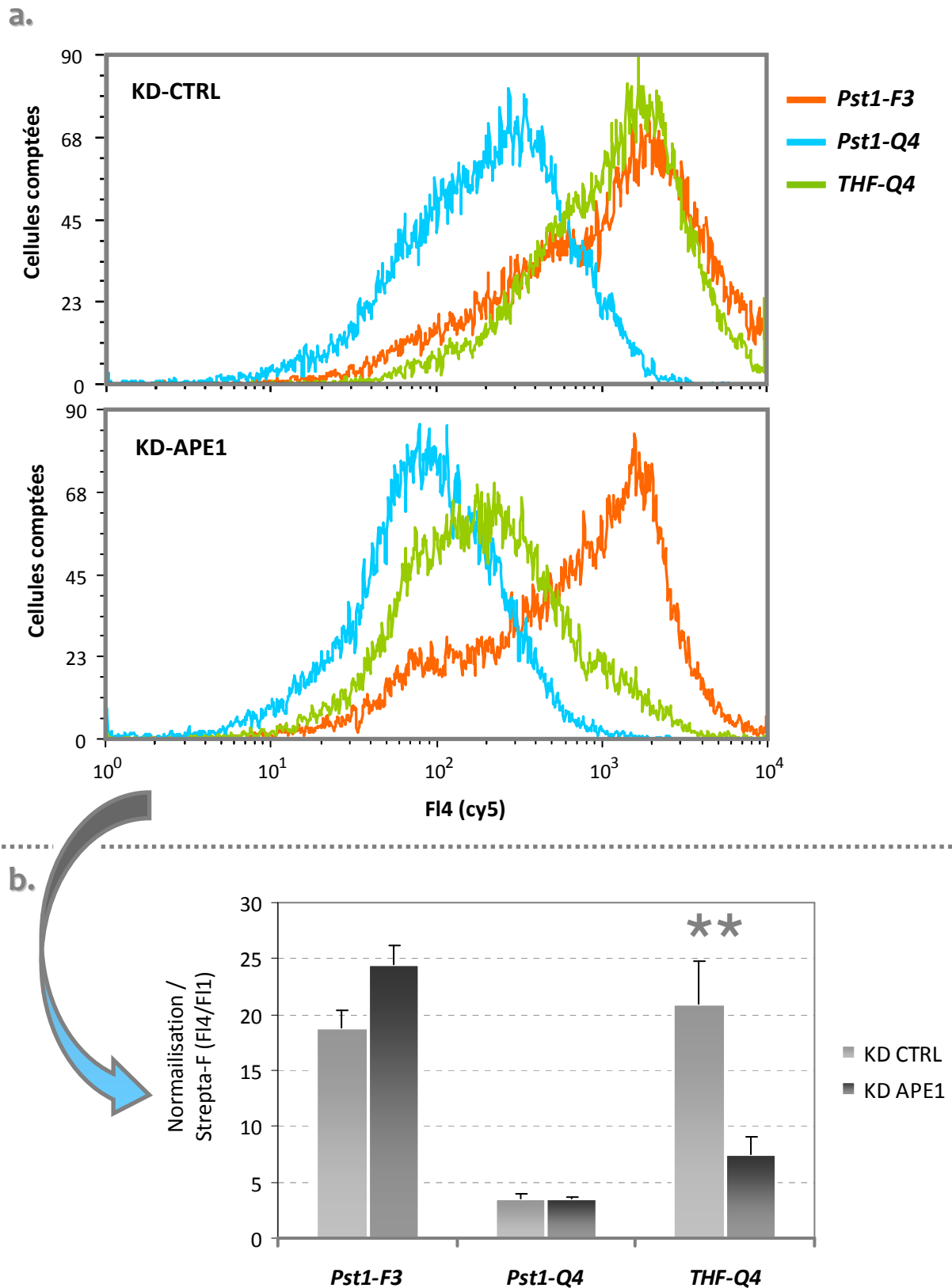


Figure 88: Détection de l'activité APE1 dans les lignées KD-CTRL et KD-APE1 par transfection de sondes nucléiques pro-fluorescentes (mise en contact 5h, 37°C) : a) histogramme de fluorescence des cellules KD-CTRL et KD-APE1 transfectées avec les sondes *Pst1-F3*, *Pst1-Q4* et *THF-Q4* ; b) normalisation des moyennes de fluorescence (cy5) par rapport à l'intensité de fluorescence du contrôle interne Strepta-alexa488 (** = $p < 0.01$, test de Student) .

4. Conclusion

Ces travaux préliminaires ont apporté des réponses positives pour la détection d'activités de réparation *in cellulo*. Après une mise au point des conditions de transfection, nous avons montré une internalisation efficace des sondes, détectée par fluorescence en cytométrie en flux, et par microscopie. Aussi, la principale limitation de la transfection d'acides nucléiques est leur rapide dégradation par les nucléases cellulaires. Alors que cette dégradation est observée pour les sondes quenchées par le dabcyI, nous avons été surpris de constater la très bonne stabilité des sondes marquées par le BHQ2. Cette observation rend exploitable la transfection des sondes Q4 en vue de détecter des activités spécifiques de coupure de l'ADN.

Toutefois, l'efficacité de transfection entre les lignées KD-APE1 et KD-CTRL est différente, empêchant la comparaison directe de l'activité APE1 de ces deux lignées. Cette limitation a été adressée par la co-transfection des sondes avec un contrôle interne (streptavidine fluorescente) permettant de normaliser les résultats des deux sous-types cellulaires. Ainsi, il a pu être mis en évidence une activité APE1 réduite dans les cellules knock-down par rapport aux cellules témoins, directement mesurée au sein des cellules. Cette observation est conforme aux résultats obtenus lors de l'étude *in vitro* (cf. § IV.6.2).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Suite aux agressions de la biomolécule d'ADN, une pléthore de lésions est générée au sein de la double hélice. Des procaryotes aux eucaryotes, différents systèmes enzymatiques plus ou moins complexes reconnaissent et prennent en charge spécifiquement chaque type de dommages. De nombreuses problématiques gravitent autour de ces voies métaboliques, autant en recherche fondamentale que clinique ou médicale. Certaines zones d'ombre subsistent sur les mécanismes de régulation de ces systèmes multi-protéiques ou encore sur l'interaction de ces voies de réparation avec les autres processus enzymatiques. Egalement, certains dysfonctionnements de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ont été associés à diverses pathologies, incluant certaines maladies génétiques, dégénératives. Il est aujourd'hui reconnu que des défaillances de la réparation de l'ADN sont par ailleurs impliquées dans les processus de vieillissement cellulaire ou de mutagénèse, associés à la cancérogénèse. Paradoxalement, les enzymes retirant les dommages de l'ADN peuvent être à l'origine de résistances aux traitements anticancéreux. Actuellement, une piste thérapeutique émergente dans le traitement de patients atteints de cancers consiste à inhiber ces systèmes de réparation afin de potentialiser, voire remplacer les médications existantes.

Parmi les grandes voies de la réparation de l'ADN, la réparation par excision de base (BER) joue un rôle crucial dans l'élimination des bases modifiées, formées par milliers, chaque jour, au sein de chaque cellule. Ces lésions incluent les produits d'alkylation, d'oxydation ou de désamination des bases nucléiques, mais également les sites abasiques et certaines cassures de brin. Les méthodes traditionnelles de détection des activités ADN *N*-glycosylases et AP-endonucléases, impliquées dans les étapes précoces de reconnaissance, d'excision et d'incision de l'ADN, font appel au marquage de substrats plasmidiques ou oligonucléotidiques par radioactivité ou par fluorescence, suivi d'analyses par des techniques séparatives, classiquement par électrophorèse. Au laboratoire ont été développées des sondes profluorescentes, permettant la détection en temps réel et en solution des activités de coupure de l'ADN. Les principales limitations de ce test concernent la dégradation des sondes dans des extraits cellulaires contenant des nucléases non spécifiques. Par la suite une biopuce, basée sur le greffage de sondes fluorescentes en des sites définis d'une lame de verre, a été mise au point pour pallier à ces limitations et augmenter les capacités de parallélisation des analyses.

Afin d'étendre le panel d'outils disponibles pour la mesure des activités enzymatiques du BER, nous avons développé dans le cadre du présent travail de thèse de nouveaux tests *in vitro*, basés sur l'immobilisation de sondes substrats fluorescentes ou profluorescentes sur des microbilles paramagnétiques. Parallèlement, des travaux ont été initiés pour adapter ce dispositif à la détection de ces mêmes activités, *in cellulo*. Les conclusions de ces travaux, ainsi que les perspectives à explorer à plus ou moins long terme sont finalement exposées.

1. Conception des sondes nucléiques

Basés sur l'expertise du laboratoire dans l'ingénierie des acides nucléiques, nous avons conçu une première génération de sondes mono-moléculaires fluorescentes (*ODN-F*). Ces sondes adoptent une structure en épingle à cheveux « hairpin », grâce à la complémentarité des bases situées aux extrémités des oligonucléotides. Une boucle simple brin de nature nucléique lie les deux fragments complémentaires. La synthèse itérative par la chimie des phosphoramidites autorise l'introduction sélective d'une lésion de choix, afin de cibler une activité enzymatique spécifique. Un synthétiseur automatisé permet d'obtenir rapidement et en une seule étape finale de clivage et de déprotection des bases et des phosphates, la séquence désirée, contenant la lésion (ciblage), le fluorophore (détection) et la biotine (immobilisation sur billes *coatées* streptavidine). Par la même chimie, une seconde génération de sondes, qualifiées de quenchées, a été synthétisée. Dans ce cas, une quatrième modification est introduite : un quencher non fluorescent (« dark quencher »). L'intégrité des sondes est primordiale, quelle que soit la méthode de détection employée. Ainsi, plusieurs caractérisations complémentaires par chromatographie liquide, électrophorèse sur gel de polyacrylamide, spectrométrie de masse ou encore par fluorescence garantissent la pureté et l'intégrité des oligonucléotides. Le quenching effectif des sondes indique que ces dernières sont dans une conformation fermée (hybridée) à 37°C, point essentiel, tant pour la reconnaissance des lésions par les enzymes que pour la détection en temps réel par apparition de fluorescence.

Bien que simple en théorie, ce type de sondes reste relativement complexe à obtenir. Il est important de signaler que les sondes ont une longueur supérieure à 40 monomères et qu'un seul couplage médiocre conduit à une chute importante du rendement final. Ainsi, après l'incorporation des trois ou quatre modifications, l'obtention de la sonde nécessite une série de purification par HPLC, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par chromatographie d'exclusion. Ces étapes de purification successives peuvent faire varier la qualité des sondes, et notamment conduire à une altération partielle du fluorophore. Ainsi, il serait intéressant de développer une nouvelle génération de sondes à forte valeur ajoutée, par une démarche expérimentale optimisée pour limiter la

manipulation des sondes avant leur utilisation. Parmi les stratégies envisagées, il serait possible d'introduire le fluorophore et le quencher, souvent moins réactifs, après la synthèse des sondes. Cette technique de post-marquage nécessite l'incorporation de nucléotides précurseurs autorisant le couplage des chromophores *à posteriori*. Une seconde méthode, plus originale, consiste à synthétiser séparément les deux moitiés de sondes complémentaires. Suite à la purification plus aisée de ces deux entités séparément, celles-ci pourraient être liguées chimiquement grâce à la fonctionnalisation adéquate des extrémités. L'avantage supplémentaire de cette stratégie est que la ligation peut être réalisée entre différents brins : l'un contenant le quencher, et l'autre contenant le fluorophore et dérivé par l'introduction des diverses lésions. Cette méthodologie de synthèse permettrait d'obtenir rapidement et de façon plus économique tout type de sondes lésées, avec des rendements optimisés et une qualité homogène.

D'autre part, l'immobilisation des sondes par un lien biotine/streptavidine permet la fonctionnalisation aisée et rapide des billes. La densité de surface, fixée par le nombre de sites streptavidine vacants, est compatible avec l'accessibilité des protéines ciblées à leur substrat. Néanmoins, il peut être envisagé de greffer les sondes sur support par un lien covalent, pour possiblement augmenter la sensibilité du test. Des travaux ont été initiés dans ce sens : des sondes fluorescentes possédant une fonction propargyle terminale ont été greffées sur des particules aminées dérivées en fonctions azotures. A ce jour, ces travaux préliminaires n'ont pas permis la fonctionnalisation effective des billes par une approche de chimie click (cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre, *CuAAC*) [808, 809].

2. Détection des activités de réparation des lésions de l'ADN *in vitro*

Une première approche consiste à détecter le produit d'incision de la sonde fluorescente en solution, par spectrofluorimétrie. Après avoir étalonné le spectrofluorimètre avec des solutions de sonde fluorescente à différentes concentrations, nous avons pu mettre au point rapidement les conditions de fonctionnalisation des microbilles (quantité de sonde, temps et tampon d'incubation). Par la suite, la preuve de concept a été validée pour la détection d'enzymes de restriction, d'ADN *N*-glycosylases (AAG) et d'AP-endonucléases (APE1), à partir de protéines purifiées. Dans ces conditions, le test montre une très bonne reproductibilité et les résultats corréleront avec ceux obtenus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, utilisée comme technique de référence. Le support n'affecte ni la fonctionnalité ni l'accessibilité des sondes, ce qui a permis de mettre en évidence différents phénomènes biologiques tels que l'inhibition de l'AAG par son produit de réaction ou l'augmentation du turnover de cette même enzyme en présence de l'AP-endonucléase.

Le phénotypage des activités de réparation d'un individu est aujourd'hui un enjeu majeur pour mieux comprendre l'implication de ces systèmes enzymatiques dans l'étiologie de certaines pathologies. L'obtention d'extraits cellulaires est effectuée en routine dans de nombreux laboratoires et permet d'avoir une « photographie » des différents composants présents dans les cellules. Dans la suite logique de ces premiers développements, nous avons donc mis à profit notre outil pour la détection des activités AAG et APE1 dans des extraits nucléaires de cellules HeLa. Après avoir déterminé un tampon commun de digestion, favorisant les activités ciblées tout en limitant la dégradation des sondes, nous avons évalué la stabilité des sondes supportées. La principale limitation de l'utilisation de sondes en solution est justement leur dégradation possible par les exonucléases cellulaires. Sur ce point, le bénéfice apporté par le support de type microbille est indéniable : alors que le clivage non spécifique des mêmes sondes en solution est prépondérant, leur immobilisation bloque totalement cette dégradation. La robustesse de cet outil a rendu possible la détection spécifique des activités glycosylases et AP-endonucléases au sein d'un extrait nucléaire. Notons qu'à de fortes concentrations en protéines, la détection en microgoutte peut être biaisée par l'apparition d'un signal non linéaire, détecté avec la sonde non lésée. Comme explicité dans le chapitre III, la fluorescence est, dans certaines conditions, sensible à son environnement et peut potentiellement être exacerbée ou au contraire atténuée par la présence de grandes concentrations en protéines. La détection en microvolume peut également influencer sur la fluorescence du milieu. En effet, la viscosité de l'échantillon est modifiée par la concentration en extrait utilisée et contraint donc la goutte à prendre une forme particulière lors de l'analyse, dépendante de la viscosité et de la tension superficielle sur piédestal du spectrofluorimètre. Bien qu'hypothétique, ce facteur peut éventuellement modifier le signal mesuré par le Nanodrop. Néanmoins, ce format d'analyse miniaturisé reste adapté à une analyse rapide d'activités de coupure de l'ADN et a permis la mise en évidence de l'inhibition spécifique d'APE1 par la méthoxyamine, au sein d'un extrait nucléaire de cellule HeLa.

Des travaux ont été initiés pour étendre ce test à la détection d'autres activités de réparation. Une sonde a été synthétisée comportant la lésion O^6 MeGua à la place d'une guanine dans le site de restriction de l'enzyme Pst1. Il a été montré que cette lésion alkylée empêche la coupure du double brin par l'enzyme de restriction [856]. Cette propriété pourrait permettre de quantifier l'activité de l'enzyme qui répare la lésion O^6 -méthylguanine par réversion directe (RR), la Méthyle Guanine Méthyle Transférase (MGMT). Une pré-incubation de la sonde lésée avec cette protéine permettrait la restauration du site de restriction. Une seconde digestion avec l'enzyme Pst1 conduirait à la coupure des sondes réparées uniquement, générant un signal de fluorescence dépendant de la quantité de MGMT fonctionnelle. Dans cette optique, les sondes sur billes

magnétiques présentent un intérêt certain : ces dernières permettent le changement aisé et rapide de tampons enzymatiques entre les deux incubations successives par simple culottage des billes.

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'automatisation du test n'était pas envisagée. Néanmoins, étant donné que le principe de détection repose sur une simple lecture de fluorescence en solution, il serait possible l'adapter aisément en format microplaque, permettant l'automatisation et la parallélisation des analyses. Le caractère magnétique des microbilles permet leur manipulation aisée par un système automatisé. Une des applications les plus prometteuses serait la mise au point d'un criblage haut débit pour la recherche d'inhibiteurs d'activités de la réparation par excision de base, qui plus est à moindre coût. En effet, 1 mL de billes magnétiques, disponible commercialement, et 1.2 nmol de sonde permettent de réaliser plus de 1000 analyses pour une activité donnée.

La principale limitation du test décrit ici est le multiplexage. Du fait que la détection est effectuée en solution avec des sondes marquées par un fluorophore unique, il est inconcevable de pouvoir détecter dans le même échantillon deux activités enzymatiques différentes. Pour pallier à ce problème, il pourrait être envisagé de marquer chaque sonde spécifique d'une activité de la BER par des fluorophores différents. La mesure de la fluorescence à différentes longueurs d'onde (suite à la digestion des billes fonctionnalisées par chaque substrat), permettrait de quantifier les différentes activités enzymatiques ciblées simultanément.

Dans le but de s'affranchir de l'échantillon protéique avant la détection, la mesure de la fluorescence des billes plutôt que dans le surnageant a été considérée. De fait, le caractère micrométrique des billes est parfaitement compatible avec une détection par cytométrie en flux. Cette technique possède deux avantages majeurs : toutes les billes sont analysées dans le même tampon après l'élimination de l'échantillon à analyser ; la fluorescence est mesurée bille à bille et le signal mesuré ne dépend pas de la concentration en particules, contrairement à la mesure spectrofluorimétrique.

Ainsi, deux approches ont été évaluées : la première, « signal off », consiste à mesurer la disparition de fluorescence causée par le clivage des sondes fluorescentes. A l'inverse, la stratégie « signal on » emploie des sondes quenchées pour lesquelles est mesurée l'apparition de fluorescence suite à l'action des enzymes ciblées. Ces deux systèmes ont montré une bonne reproductibilité pour la détection des activités d'enzymes de restriction, de glycosylases et d'AP-endonucléases. Dans les deux cas, le rapport signal sur bruit est équivalent. Toutefois, le caractère pro-fluorescent des oligonucléotides quenchés rend possible la détection en temps réel d'activités enzymatiques, ce qui nous a guidés vers l'optimisation de ce type de sondes. Au cours de ces améliorations, nous sommes parvenus à plusieurs conclusions essentielles. Ainsi, l'immobilisation des sondes par l'extrémité 3' (3'-

biotine) stabilise la structure lors de l'analyse à partir d'extraits nucléaires. En effet, l'orientation inverse des sondes conduit à leur dégradation médiée par les 3'-exonucléases. Aussi, le choix des chromophores est important. La cyanine 5 a montré une excellente compatibilité avec la source d'excitation laser à 635 nm du cytomètre, conduisant à une augmentation du signal d'un facteur 500. Le choix du quencher est tout aussi important. Ainsi, le BHQ2 s'avère être un puissant quencher du cy5. L'efficacité de quenching de ce chromophore est supérieure à 95 %, et permet de conserver un signal résiduel minimal dans la conformation initiale des sondes. Aussi, l'augmentation du diamètre des billes (de 2.8 μm pour les billes **D** et, 4 μm pour les billes **K**) permet d'immobiliser une quantité supérieure de sondes sur la même particule, augmentant significativement la sensibilité du test. Il pourrait être envisagé d'utiliser des microbilles d'une surface encore plus importante (e.g. 10 μm) pour évaluer le gain supplémentaire de sensibilité. Dans le même but, il serait intéressant d'évaluer l'influence de la quantité de billes sur ce paramètre. En effet, une analyse statistique pertinente nécessite au minimum l'analyse de 10 000 billes. Afin d'augmenter le débit d'analyse et d'être cohérent avec les expériences de spectrofluorimétrie, nous utilisons environ 600 000 billes, correspondant approximativement à 1 pmol de sonde. Une expérience préliminaire, consistant à utiliser un nombre restreint de billes pour la détection de l'activité AAG dans un extrait nucléaire de cellules HeLa, a montré une augmentation significative du signal, inversement corrélée au nombre de billes. Ce phénomène s'explique simplement par le fait que la quantité de substrat disponible pour l'enzyme est plus faible : cette dernière induit le clivage de plus de sondes à la surface d'une même bille, ce qui se traduit par une amplification du signal mesuré bille à bille.

Ce test *in vitro* fonctionnel a permis de discriminer deux sous-lignées cellulaires LN428 (KD-CTRL et KD-APE1) en fonction de l'activité APE1 intrinsèque.

Par la suite, nous avons jugé important de dériver cet outil dans un format multiplexé. La cytométrie en flux apparaît comme une technologie de choix dans ce but. Cette technique permet de mesurer la fluorescence de chaque particule à différentes longueurs d'onde d'émission, simultanément. Nous nous sommes rapidement orientés vers la mise au point d'une stratégie d'encodage des billes par fluorescence. Ainsi, l'intensité de fluorescence de chaque bille, définie par le code, est associée à une sonde donnée et donc à une activité ciblée. Une stratégie d'encodage simple et innovante a été développée : les billes biotinylées sont dans un premier temps fonctionnalisées par différents ratios de streptavidine fluorescente en mélange avec de la streptavidine non fluorescente. La proportion de streptavidine fluorescente confère à la bille une intensité de luminescence donnée qui définit un code. A notre connaissance, ce protocole original est exploité pour la première fois dans ce travail de thèse. Grâce à cette approche, 8 populations de billes résolues en fluorescence peuvent être discriminées en fonction de l'intensité du signal de

l'alexa488 (conjugué à la streptavidine). L'encodage est rapide (\approx 15 minutes), économique et permet d'obtenir de façon reproductible des populations de billes homogènes. De plus, ce dispositif est compatible avec l'ensemble des cytomètres utilisés en routine dans les laboratoires. Il est primordial que les spectres d'émission de la bille et des sondes ne se recouvrent pas afin d'éviter l'introduction de biais analytiques dus à l'étape d'encodage. C'est pour cette raison que notre choix s'est orienté vers l'alexa488. Ce fluorophore présente une longueur d'onde maximum d'absorption à 488 nm qui correspond à la longueur d'onde de la source d'excitation laser à argon. L'excitation de l'alexa488 est donc maximisée afin d'obtenir le maximum de populations de billes résolues en fluorescence dans le canal de détection 1 (F11). Dans de futures applications, il serait intéressant d'étendre cette capacité de multiplexage. A ces fins, l'utilisation de deux fluorophores (e.g. Alexa488 et Alexa555, conjugués à la streptavidine) permettrait de multiplier les populations de billes encodées disponibles. Les expériences applicatives de ce type de méthodologie d'encodage ne se limitent pas à la détection d'activités de coupure de l'ADN, mais peuvent s'étendre à la détection d'acides nucléiques (ADN viraux, ARNm,...) et d'analytes divers (antigènes, métaux,...), grâce à une fonctionnalisation adéquate des billes.

Dans notre étude, la fonctionnalisation des billes par les différentes sondes *Q4* permet la détection multiplexée d'enzymes de restriction, d'ADN *N*-glycosylases et d'AP-endonucléases aussi bien à partir d'enzymes purifiées que d'extraits cellulaires. Egalement, l'effet inhibiteur de l'Ugi, spécifique des uracile glycosylases, a été mis en évidence de manière univoque, prouvant ainsi l'adaptabilité de cet outil analytique à la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Dans ce but, un projet collaboratif avec l'Université Joseph Fourier, porté par N. Berthet, a été initié récemment. Ce travail concerne la conception et la caractérisation de mimes peptidiques de la protéine Fpg, comme inhibiteurs de cette enzyme. Le format multiplexé et parallélisé du biocapteur développé dans ce travail de thèse sera donc mis à profit pour cribler les molécules potentiellement actives.

3. Détection des activités de réparation des lésions de l'ADN in cellulo

Des travaux ont été initiés pour étendre le test *in vitro* à la détection d'activités de la réparation *in cellulo*, par cytométrie en flux. En premier lieu, la stabilité des sondes, dans ce cas non supportées, a été évaluée. Etonnamment, et contrairement aux sondes quenchées par le résidu dabcyI, les sondes *Q4* marquées par le BHQ2 s'avèrent extrêmement stables à l'intérieur des cellules et ne sont pas dégradées dans les temps de transfection étudiés. Par ailleurs, la sonde contenant l'analogie de site abasique conduit à une augmentation de fluorescence qui peut raisonnablement

être attribuée à l'activité spécifique d'APE1. Egalement, cette méthode de détection a permis de discriminer une lignée cellulaire LN428 « knock down » APE1 (KD-APE1) de la lignée sauvage (KD-CTRL), en accord avec les résultats du test *in vitro*. Toutefois, il est nécessaire de normaliser les résultats entre les lignées cellulaires du fait d'une efficacité de transfection moindre de la lignée KD-APE1. La normalisation a pu être contrôlée *via* la co-transfection de la sonde avec un contrôle interne, la streptavidine conjuguée à l'alexa488. Néanmoins, cette différence d'efficacité de transfection reste une limitation dans cette étude et nécessite d'être optimisée. L'utilisation d'une lignée modifiée par l'expression d'un shARN n'est pas le modèle le plus approprié pour cette étude. En effet, la modification constitutive du métabolisme cellulaire se traduit par un changement de phénotype par rapport à la lignée contrôle (taille des cellules, vitesse de division cellulaire, morphologie,...). Ainsi, l'extinction transitoire du gène *APEX* par un siARN plutôt que l'inhibition constitutive de la production de la protéine semble plus pertinente.

Il est également envisagé de recourir à la transfection par électroporation plutôt que par lipofection. Cette technique nécessite d'être perfectionnée pour chaque lignée afin de maximiser l'internalisation des sondes, tout en limitant le stress ou la mort cellulaire. Néanmoins, cette méthode est très répandue et a pu être améliorée en fonction du type cellulaire étudié. De plus, elle possède le double avantage d'une part de pouvoir contrôler et potentialiser l'efficacité de transfection pour les cellules moins perméables à la lipofection et, d'autre part, de permettre l'internalisation des sondes simultanément en quelques millisecondes. Ce dernier point permettrait de s'affranchir de la cinétique de transfection par voie chimique qui est en compétition avec la cinétique de réparation. Une perspective supplémentaire serait de réaliser des expériences de vidéomicroscopie afin de visualiser en temps réel les activités enzymatiques ainsi que leur localisation subcellulaire.

Les expériences à suivre concernent la détection d'activités glycosylases *in cellulo*. La question de l'adressage des sondes est un point essentiel à prendre à compte dans ces développements. En effet, dans les expériences réalisées à ce jour et présentées, les sondes restent essentiellement concentrées dans le cytoplasme. Cela n'empêche pas pour autant la détection de l'activité AP-endonucléase, du fait que la protéine APE1 est abondante et présente autant au niveau nucléaire que cytoplasmique de par ses rôles multiples exposés dans le paragraphe 1.5.5. En revanche, les ADN *N*-glycosylases sont prépondérantes dans le noyau en raison de leur fonction, bien que certaines isoformes puissent être dirigées vers les mitochondries. La vectorisation nucléaire des sondes peut être promue par leur conjugaison avec un peptide spécifique, reconnu par les protéines d'import nucléaire (e.g. peptide Tat ou NLS).

Par ailleurs le greffage des sondes nucléiques à des nanoparticules, fonctionnalisées ou non par un agent de localisation nucléaire, est une stratégie actuellement considérée. Plus précisément,

les nanoparticules d'or offrent plusieurs avantages, exploitables dans le cadre de cette thématique. Ces nanoparticules ne présentent pas de toxicité particulière pour les cellules [857]. De plus, les nanoparticules conjuguées pénètrent spontanément dans les cellules, par des mécanismes encore mal déterminés [858, 859]. Ceci permettrait de s'affranchir des méthodes de transfection chimiques. Une caractéristique intéressante de ce type de support est leur capacité à quencher la fluorescence par transfert d'énergie par résonance qui dissipe l'énergie du fluorophore dans son état excité [860, 861]. Cette propriété de « superquenching » est largement employée, entre autre pour la détection d'acides nucléiques [862-868], de métaux [869, 870], la régulation de gènes [859, 871-873], *etc.* De cette façon, la nanoparticule d'or sert à la fois de support, de vecteur d'internalisation et de quencher.

La détection simultanée de plusieurs activités enzymatiques dans un unique échantillon est une perspective intéressante. La stratégie d'encodage des cellules ne peut s'appliquer dans ce cas. L'approche la plus réaliste consiste à synthétiser des sondes marquées par différents fluorophores. Ainsi, à chaque longueur d'onde d'émission de fluorescence peut être attribuée une activité enzymatique. Par ailleurs, l'utilisation de quantum dots, en substituts des fluorophores organiques, est une piste à explorer. Ces cristaux nanométriques composés de matériaux semi-conducteurs ont démontré leur utilité pour l'imagerie par fluorescence dans de multiples domaines [874]. Ces fluorophores inorganiques possèdent de nombreux atouts : ils présentent une brillance exceptionnelle ainsi qu'une robustesse photochimique qui autorise des analyses sur des cinétiques longues. D'autre part, ils possèdent un pic d'émission étroit et un profil d'excitation large, compatibles avec une analyse multiparamétrique en cytométrie en flux. Aussi, la longueur d'onde d'émission est aisément modulable car elle dépend à la fois de la taille, de la composition du cœur du quantum dot mais également de la couche de passivation qui rend ces cristaux biocompatibles. Enfin, plusieurs études ont montré que ces cœurs fluorescents sont efficacement quenchés par des nanoparticules d'or [798, 875-880].

Pour conclure, ces travaux de thèse ont mené à la mise au point et l'exploitation de nouveaux biocapteurs pour la détection d'activités de réparation de l'ADN, *via* la fonctionnalisation de microbilles par des sondes nucléiques spécifiques. Les tests *in vitro* associés ont démontrés de bonnes performances, complémentaires des autres approches moléculaires existantes telles que les techniques séparatives, la détection en solution avec des sondes de type *molecular beacons* ou encore sur biopuce. Par ailleurs, l'emploi de ces mêmes sondes a été adapté au développement d'un test de détection *in cellulo* qui a fait l'objet d'expériences préliminaires positives.

VII MATRIELS & METHODES

1	Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques	234
	1.1. Synthèse des sondes nucléiques	234
	1.2. Purification	235
2	Caractérisation et fonctionnalité des sondes	236
	2.1. Absorbance UV-Visible	236
	2.2. Contrôle de la pureté	236
	2.3. Spectrométrie de masse	236
	2.4. Fonctionnalité des oligonucléotides en solution	236
3	Immobilisation des sondes sur Dynabeads M-280 Strepta	237
4	Encodage et immobilisation des sondes sur particules magnétiques biotinylées ..	237
	4.1. Encodage	237
	4.2. Immobilisation des sondes et conditionnement des billes	238
5	Digestions enzymatiques	238
	5.1. Par les enzymes purifiées	238
	5.2. Par des extraits nucléaires	239
	5.3. Suivi en temps réel du clivage enzymatique	240
6	Protocoles relatifs aux cellules	240
	6.1. Matériel et réactifs	240
	6.2. Culture des lignées LN428	240
	6.3. Passage des cellules	241
	6.4. Congélation des cellules	241
	6.5. Transfection	241
	6.6. Analyse par cytométrie en flux	242
	6.7. Analyse par microscopie de fluorescence	242
	6.8. Préparation des extraits nucléaires	243
	6.9. Dosage des protéines	243

1. Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques

1.1. Synthèse des sondes nucléiques

Les oligonucléotides ont été synthétisés chimiquement à l'échelle de 1 ou 0.5 μmol selon la voie phosphoramidite avec un synthétiseur d'ADN automatisé ABI 392 (*Applied Biosystem*, Foster city, CALIFORNIE, USA). La synthèse s'effectue classiquement de l'extrémité 3' vers 5' par la condensation séquentielle de synthons 3' phosphoramidite. Les supports 3'-biotine-TEG-CPG et 3'dT-CPG, les synthons dA, dT, dC, dG et les désoxy nucléotides modifiés (THF, dU, dI, dT-DabcyI) 3'-CE phosphoramidites ainsi que les synthons Cy3, Cy5 et 5'-BHQ-2 phosphoramidites sont fournis par la société *Glen Research* (Sterling, VIRGINIE, USA). Tous les monomères sont protégés par un groupement diméthoxytrityle (DMT) en position 5'. Avant leur utilisation, les synthons lyophilisés sont remis en solution dans de l'acétonitrile anhydre (0.1 M final).

Le cycle de condensation de la méthode au phosphoramidite se décompose en 5 étapes : la détritylation de la fonction alcool en 5', l'activation du monomère phosphoramidite associée au couplage, l'oxydation du phosphite en phosphate et le « capping » des fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi.

Le premier motif est détritylé par une solution d'acide trichloroacétique à 2 % dans du dichlorométhane (*Glen Research*) libérant ainsi l'alcool primaire (extrémité 5'). Le nucléotide suivant (CE-phosphoramidite), est activé par une solution de tétrazole 0.1, ce qui permet concomitamment l'étape de condensation. Le phosphore trivalent formé étant peu stable, celui-ci est oxydé par une solution d'iode à 0.1 M dans un mélange eau/pyridine/THF (*Sigma Aldrich*, Saint-Quentin-Fallavier, FRANCE). Le cycle est terminé par l'inactivation des fonctions hydroxyles qui n'auraient pas réagi par une solution d'anhydride phénoxyacétique 5 % dans du THF (Cap mixA, *Glen Research*) et de N-méthyle imidazole 16 % dans du THF (Cap B, *Sigma Aldrich*). Le cycle est ainsi répété autant de fois que nécessaire afin d'obtenir la séquence désirée. Le support est lavé et séché sous argon entre chaque cycle pour éliminer les excès de réactifs.

En fin de synthèse, la phase solide est transférée dans un tube à bouchon vissé de 1.5 mL. 1 mL de solution d'hydroxyde d'ammonium à 30 % est ajouté. La déprotection des bases phénoxyacétylées, des groupements phosphates et le clivage des oligonucléotides du support se poursuit pendant 8 à 16 h à température ambiante, à l'abri de la lumière. Le surnageant est prélevé et la silice rincée par deux fois avec 200 μL d'eau milliQ. L'ammoniaque est évaporé sous vide grâce au SpeedVac® SPD 111V. Les oligonucléotides sont repris dans une solution de TEAA 10 mM puis filtrés (filtres Millex® 0.45 μm , Millipore, Darmstadt, ALLEMAGNE) avant purification.

1.2. Purification

La purification des oligonucléotides est réalisée par HPLC sur une colonne C18 (250 x 4.60 mm, 5 μ m, *Phenomenex*[®], Le Pecq, FRANCE). Les fragments sont séparés par un gradient linéaire d'acétonitrile dans du TEAA 10 mM, optimisé pour la sonde à purifier. La chromatographie est couplée à une détection en absorbance à 260 nm (ADN), 453 nm (Dabcyl) ou 579 nm (BHQ-2). Une détection par fluorescence grâce à une barrette de diode permet la visualisation de la cyanine 3 (λ_{ex} =546 nm, λ_{em} =563 nm) ou de la cyanine 5 (λ_{ex} =649 nm, λ_{em} =670 nm). Une fois collectées, les fractions sont concentrées au SpeedVac puis lyophilisées. Les produits sont repris dans de l'eau milliQ avant d'être stockés à -20°C.

Dans le cas des sondes pro-fluorescentes, ces dernières sont préalablement purifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) 15 %, 7M d'urée. La solution d'acrylamide est préparée comme suit: 210 g d'urée sont dissous à chaud dans 187 mL d'acrylamide à 40 % et 50 mL de tampon Tris/Borate/EDTA (TBE 10X, *Invitrogen*[™]). La solution est complétée à 500 mL avec de l'eau milliQ avant d'être filtrée sur fritté et stockée à 4°C. Pour l'électrophorèse, les plaques de verre sont lavées avec du détergeant puis à l'eau et enfin à l'éthanol avant leur utilisation. Les faces intérieures sont traitées avec une solution de diméthylchlorosilane à 10 % dans du dichlorométhane. Les espaceurs et le peigne (1 mm d'épaisseur) sont également lavés à l'eau et à l'éthanol. La polymérisation du gel est initiée en ajoutant 700 μ l de solution de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % puis 70 μ l de TEMED pour 100 mL de la solution d'acrylamide à 20 %. Une fois polymérisé, le gel est placé en pré-migration à 1000 V en limitant la puissance à 3 W. Les échantillons, préalablement dénaturés par chauffage à 90°C pendant 2 minutes dans 3 μ l de « bleu formamide » (90 % formamide, 0,02 % xylène cyanole, 0,02 % bleu de bromophénol), sont ensuite déposés dans les puits. La migration des fragments d'ADN se fait à 25 W. Le tampon de migration utilisé est une solution de TBE 1X. La bande correspondante au produit attendu est visualisée à l'œil nu grâce aux chromophores, découpée au scalpel et broyée dans un tube de 15 mL. 10 mL d'eau sont ajoutés et l'extraction de l'oligonucléotide se poursuit la nuit à t.a. sous agitation lente. Le surnageant est concentré par évaporation au SpeedVac. Les traces d'acrylamide sont éliminées par chromatographie d'exclusion sur une colonne Sephadex G25 (illustra NAP, *GE Healthcare* Vélizy-Villacoublay, FRANCE).

L'oligonucléotide est purifié une seconde fois par HPLC. Une fois collectées, les fractions sont concentrées au SpeedVac, dessalées par chromatographie d'exclusion, puis lyophilisées. Les produits sont repris dans l'eau milliQ pour être stockés à -20°C.

2. Caractérisation et fonctionnalité des sondes

2.1. Absorbance UV-Visible

Les oligonucléotides sont quantifiés par une mesure d'absorbance à 260 nm avec un spectromètre en goutte ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*, Villebon sur Yvette, FRANCE). Un spectre UV-visible est réalisé avec le même appareil pour s'assurer de la présence des chromophores.

2.2. Contrôle de la pureté

La pureté des substrats obtenus est évaluée par HPLC en phase inverse et quantifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 20 % + urée 7M comme décrit précédemment. Dans ce cas, des espaceurs de 0.4 mm sont utilisés et la puissance lors de la migration est limitée à 10 W. Le gel est analysé par un scanner de fluorescence Amersham Typhoon 9400 (*GE Healthcare*).

2.3. Spectrométrie de masse

Le contrôle de la masse des oligonucléotides est réalisée par spectrométrie de masse MALDI-ToF (Désorption et Ionisation laser assistées par une matrice couplée à un analyseur à temps de vol) en mode linéaire négatif sur un appareil Microflex LRF (*Bruker*, Wissembourg, FRANCE). La matrice utilisée est constituée d'acide 3-hydroxypicolinique (35 mg) dissout dans 1 mL d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (100 μ M). L'obtention d'un spectre de masse nécessite le dessalage préalable des échantillons. Sauf indications contraire, ce dessalage est réalisé sur une résine échangeuse d'ions de type Dowex (50WX8 100-200 sous forme NH_4^+). Les billes protonées, une fois lavées avec de l'isopropanol, sont immergées dans une solution d'acétate d'ammonium 0.1 M et laissées sécher à l'air sur la nuit. L'échantillon (10 μ L, 2-5 μ M) est dessalé durant 10 minutes sur les billes ainsi préparées. 1 μ L de la solution est ensuite déposé sur la cible auquel est ajouté 1 μ L de solution de matrice. La cristallisation se poursuit à l'air libre avant l'analyse en mode linéaire négatif. L'appareil est également calibré avec des oligonucléotides de masse connue.

2.4. Fonctionnalité des oligonucléotides en solution

La fonctionnalité de chaque oligonucléotide est vérifiée par digestion avec les enzymes correspondantes (enzymes de restriction, ADN *N*-glycosylases, AP-endonucléases). La provenance des enzymes et les tampons utilisés sont compilés dans le Tableau 8. Les sondes de type *hairpin*

subissent préalablement un cycle d'hybridation dans le tampon correspondant à celui de la digestion (2 minutes à 90°C puis retour lent à t.a.). Les fragments obtenus sont analysés par PAGE ou par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

3. Immobilisation des sondes sur Dynabeads M-280 Strepta

Les billes magnétiques Dynabeads M-280 Strepta (billes **D**) sont fournies par la société *Life Technologies* (Saint Aubin, FRANCE). Ces billes ont un diamètre de 2,8 µm et sont recouvertes d'une monocouche de streptavidine. Le protocole suivant est donné pour la fonctionnalisation de 100 µg de billes. Le flacon de stockage (10 mg/mL) est vortexé vigoureusement pour homogénéiser la suspension de billes. 10 µL de billes sont prélevés et transvasés, dans un tube eppendorf de 1.5 mL. Ce dernier est placé sur un portoir magnétique (Dyna MPC®-E, *Life Technologies*). Le surnageant est retiré. Les billes sont équilibrées par trois rinçage avec 10 µL de solution tamponnée « Binding & Washing » (B&W) 1X (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl). Elles sont ensuite lavées avec 10 µL de solution « Binding » 2X (*Life technologies*). Les billes sont resuspendues dans 30 µL de solution « Binding » 1X.

En parallèle est préparée une solution l'oligonucléotide (0.4 µM, 30µL) dans le tampon « Binding » 1X. Les ODN subissent préalablement un cycle d'hybridation. Cette solution est ajoutée sur la suspension de billes. Le tube est placé 1 heure à 25°C sous agitation. Les billes sont culottées et le surnageant éliminé. Les particules fonctionnalisées sont lavées 3 fois avec 60 µL de tampon B&W 1X, 1 fois avec 60 µL eau milliQ puis sont conditionnées dans 60 µL du tampon désiré.

4. Encodage et immobilisation des sondes sur particules magnétiques biotinylées

4.1. Encodage

Les billes magnétiques biotinylées (4.0-4.5 µm) proviennent de la société *Kisker Biotech* (Steinfurt, ALLEMAGNE). Le protocole suivant est donné pour l'encodage de 10 µg de billes **K**. Le flacon de stockage est vortexé vigoureusement pour homogénéiser la suspension de billes. 10 µL de billes (1 % w/v) sont prélevés et transvasés, dans un tube eppendorf de 0.5 mL. Le surnageant est retiré. Les billes sont lavées trois fois avec 10 µL de solution tamponnée B&W 1X. Le surnageant est remplacée par 5 µL de tampon B&W 1X auxquels sont ajoutés 5 µL de streptavidine à 1 µg/µL dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, *Sigma Aldrich*). Cette solution est composée d'un mélange de streptavidine

et de streptavidine conjuguée à l'alexa 488 (*Sigma Aldrich*) dans les proportions désirées pour l'encodage. La suspension est placée à l'abri de la lumière sous agitation, 1 h à t.a. Les billes sont lavées cinq fois avec 10 μ L de tampon de lavage B&W 1X et sont stockées à 4°C dans le même volume du même tampon.

4.2. *Immobilisation des sondes et conditionnement des billes*

La fonctionnalisation de 10 μ g de billes encodées requiert un léger excès de sondes nucléiques biotinyllées, fixé à 12.5 pmol. Les sondes sont diluées à 1 μ M dans le tampon B&W 1X et subissent un cycle d'hybridation. Cette solution est ajoutée aux 10 μ L de la suspension de particules et l'incubation se poursuit 1h à t.a. sous agitation dans le noir. Les billes sont lavées trois fois avec le tampon B&W 1X et une fois avec le tampon de stockage avant d'être resuspendu dans 20 μ L du tampon désiré pour le stockage à 4°C.

5. Digestions enzymatiques

Sauf indications contraire, chaque digestion enzymatique est réalisée à partir d'1 pmol d'ODN en solution à 1 μ M (ayant subi un cycle d'hybridation dans le tampon adéquat), de 5 μ L de billes fonctionnalisées **D** ou de 1 μ L de billes fonctionnalisées **K**. Pour les digestions des ODN supportés, le surnageant des billes est préalablement éliminé.

5.1. *Par les enzymes purifiées*

Sont ajoutés dans l'ordre : le tampon enzymatique, l'eau milliQ et enfin la (les) enzyme(s) pour un volume final de 10 μ L. Les compositions des tampons enzymatiques utilisés sont reportées dans le Tableau 8. Les échantillons sont incubés 1h à 37°C (sous agitation pour les digestions des ODN sur billes). A l'issue de la réaction, le surnageant est prélevé pour une analyse par spectrofluotimétrie en goutte (Nanodrop ND3300, *Thermo Scientific*) et/ou PAGE en fonction du type de sonde. Les billes sont resuspendues dans 200 μ L de PBS 0.02 % Tween 20 pour l'analyse par cytométrie en flux sur un FACScalibur (*Becton Dickinson*). Un minimum de 10 000 évènements sont collectés pour chaque échantillon (ou population de billes dans le cas du test multiplexé). Les réglages du cytomètre sont identiques pour toutes les expériences et sont reportés dans le Tableau 9. Les données sont réanalysées avec le logiciel FCSEXpress. Des analyses complémentaires par spectrométrie de masse MALDI-ToF ont aussi été réalisées.

Enzyme	Concentration	Provenance	Tampon de digestion (1X)
EcoR1	10 u/μL	<i>Trevigen</i>	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl
Pst1	10 u/μL	<i>Trevigen</i>	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl
APE1	2.5 u/μL 10 u/μL	<i>Trevigen</i> <i>New England Biolabs</i>	10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl
hAAG (human)	10 u/μL	<i>New England Biolabs</i>	20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1 % Triton X-100
UDG	10 u/μL	<i>New England Biolabs</i>	20 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 1 mM EDTA
Fpg	7 μg/μL	<i>B. Castaing</i>	10 mM bis Tris Propane-HCl (pH 7.0), 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

Tableau 8: Enzymes utilisées, provenance et tampons correspondants.

5.2. Par des extraits nucléaires

Les extraits nucléaires sont préalablement décongelés à température ambiante et dilués dans le tampon C 1X (10 mM HEPES pH 7.8, 2 mM EGTA, 40 mM KCl, 0.1 mM ZnCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mg/mL BSA). Sont ajoutés dans l'ordre: le tampon C de digestion 4X, l'eau milliQ et la solution d'extraits nucléaires à tester pour un volume final de 10 μL. Les échantillons sont incubés 1 h à 37°C (sous agitation pour les digestions des ODN sur billes). Le surnageant est prélevé pour une analyse par spectrofluotimétrie en goutte (Nanodrop ND3300, *Thermo Scientific*) et/ou PAGE en fonction du type de sonde. Les billes sont resuspendues dans 200 μL de PBS 0.02 % Tween 20 pour l'analyse par cytométrie en flux. Des analyses complémentaires par spectrométrie de masse MALDI-ToF ont aussi été réalisées. A noter que dans ce cas, les échantillons sont purifiés et concentrés au préalable par chromatographie sur Zip-Tip (*Waters™*).

Détecteur	Paramètre	Voltage	Echelle
FSC	Taille	E00	Log
SSC	Granulométrie	226	Log
FI1	Alexa488/FITC	547	Log
FI2	Cy3	489	Log
FI4	Cy5	773	Log

Tableau 9: Réglages standards du cytomètre FACScalibur pour les analyses par cytométrie en flux.

5.3. *Suivi en temps réel du clivage enzymatique*

Les mesures d'apparition de fluorescence en temps réel à la surface des billes fonctionnalisées par les sondes quenchées sont réalisées sur un appareil à PCR quantitative Stratagene MX3005p. Dans cette configuration, ce thermocycleur est détournée de sa fonction principale pour être utilisé comme un simple lecteur de fluorescence où la température est fixée à 37°C. Les échantillons sont préparés dans des barettes de tubes à PCR coniques de 300 µL selon les protocoles développés dans les paragraphes précédents (§ VII5.1 et VII5.2)

6. *Protocoles relatifs aux cellules*

6.1. *Matériel et réactifs*

Les deux sous-lignées de LN428 KD-CTRL (contrôle) et KD-APE1 (« knock down » APE1) sont fournies par la société *Trevigen*[®] (Abingdon, ROYAUME-UNI). Le milieu de culture (Minimum Essential Medium Eagle alpha modification, α -MEM), le tampon phosphate salin avec MgCl₂ et CaCl₂ (PBS +/-), le bleu trypan, le DMSO et le paraformaldéhyde proviennent de la société *Sigma-Aldrich*. Le milieu de transfection (opti-MEM), le PBS sans CaCl₂ et MgCl₂ (PBS -/-), le sérum de veau fœtal (SVF), la trypsine-EDTA, la puromycine (puromycine hydrochloride), la L-glutamine, la solution antibiotique / antimycotique 100X la gentamycine et le marqueur nucléaire Hoescht 33342 proviennent de chez *Life technologies*. La lipofectamine 2000 et la lipofectamine RNAimax provenant de la société *Life technologies* nous ont été gracieusement offertes par le Dr. Eric Sulpice. Les consommables (flasques, microplaques, tubes, pipettes) sont fournis par les sociétés *Dutscher* (Brumath, FRANCE) et *Becton Dickinson* (Le Pont de Claix, FRANCE).

6.2. *Culture des lignées LN428*

Les lignées de LN428 transfectées de façon stable, KD-CTRL et KD-APE1, sontensemencées séparément dans des flasques de 75 ou 175 cm² suivants les besoins de l'expérience. L'étape initiale d'ensemencement nécessite des précautions particulières : le culot cellulaire, cryopréservé dans l'azote liquide, est incubé immédiatement dans un bain à 37°C. Après la décongélation complète de l'échantillon (1 mL), les cellules sont transvasées dans un tube conique de 15 mL. L'ampoule est rincée avec 1 mL de milieu complet à 37°C et 1 mL supplémentaire de ce milieu est ajouté dans le tube. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 200 g. Le surnageant est délicatement éliminé et le culot est resuspendu dans 10 mL de milieu complet. Les cellules sontensemencées à 10-20000 cellules/cm². Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂, dans le

milieu complet (α -MEM basal supplémenté avec 10 % v/v de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine et 0.8 % v/v de solution antibiotique/antimycotique 100 X), selon les recommandations du fournisseur. La puromycine aliquotée à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (stockée à - 20°C) est diluée 10 fois et rajoutée au dernier moment à la concentration finale de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le milieu est remplacé par du milieu frais (préchauffé à 37°C) le lendemain, puis tous les 2-3 jours. Les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent 90 % de confluence.

6.3. *Passage des cellules*

Pour cela, elles sont rincées avec 10 mL de PBS -/-, puis sont trypsinées par l'ajout de 2 mL (pour 75 cm^2) de trypsine/EDTA préchauffée (0.5 g/L trypsine, 0.2 g/L EDTA). Les flasques sont placées 3-5 min à 37°C, jusqu'à ce que les cellules soient complètement détachées du support. 7 mL de milieu basal sont ajoutés pour stopper l'action de la trypsine et la suspension est transférée dans un tube conique de 15 mL. Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminée en partie (200-500 μL sont laissés au fond du tube). Les cellules sont resuspendues avec une pipeteur P200. 9.5 mL de milieu complet sont ajoutés et la suspension cellulaire est homogénéisée. 10 μL sont prélevés pour le dénombrement des cellules. Dans une flasque neuve est introduit le milieu complet (0.2 mL/cm^2) et la puromycine. Finalement les cellules sont réensemencées à 3000 cellules/ cm^2 .

6.4. *Congélation des cellules*

La congélation des cellules est réalisée à partir des cellules en phase exponentielle de croissance. Pour cela les cellules sont détachées du support, comme explicité dans le paragraphe précédent. Suite à la centrifugation des cellules, le culot est repris dans 2 mL de milieu basal. Après dénombrement des cellules, la suspension est diluée à 10 millions de cellules/mL. Avec le milieu basal. Le même volume de solution de congélation 2 X (α -MEM basal supplémenté avec 40 % de SVF décomplémenté et 20 % de DMSO). Cette suspension est aliquotée dans des cryotubes de 1 mL. Les cellules sont congelées progressivement jusqu'à - 80°C en transférant les cryotubes dans un récipient dédié (bicell). Finalement les cryotubes sont stockées dans l'azote liquide.

6.5. *Transfection*

Les cellules sontensemencées dans des microplaques 12 puits (60 000 cellules/puits) pour une détection par cytométrie en flux et dans des microplaques 24 puits (30 000 cellules/puits) pour

l'analyse par microscopie. Dans cette seconde configuration, une lamelle de verre de 14 mm de diamètre est introduite au fond de chaque puits et sert de support d'adhésion aux cellules. Les cellules sont cultivées 14 heures avant l'étape de transfection, dans le milieu sans antibiotique (α -MEM basal supplémenté avec 10 % de SVF décomplémenté, et 2 mM de L-glutamine), à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Les sondes oligonucléotides à transférer sont préalablement diluées sous atmosphère stérile à une concentration de 100 nM dans le milieu optiMEM. Les duplexes subissent un cycle d'hybridation (2 min à 90°C puis retour lent à t.a.). Dans les expériences de co-transfection avec la streptavidine conjugué à l'alexa488, la protéine (0.1 mg/mL dans du PBS) est ajoutée sur les duplexes pour obtenir une concentration de 50 nM, soit deux sondes biotinylées pour une streptavidine. En parallèle sont préparées les dilutions d'agents de transfection (1 μ L pour 64 μ L d'optiMEM). La solution est équilibrée 10 minutes à t.a. Cette solution est additionnée sur la solution d'oligonucléotides dans un rapport 1 :1 (v/v). L'équilibration de ce mélange se poursuit durant 10-20 minutes. Durant ce temps, le milieu contenu dans chaque puits est remplacé par du milieu optiMEM 2 % SVF décomplémenté. La solution de lipoplexe est ajoutée dans chaque puits (50 μ L dans plaque 24 puits pour 500 μ L final, 65 μ L dans plaque 12 puits pour 650 μ L final). Ainsi, la concentration finale en ODN est de 10 nM. Les microplaques sont placées en chambre humide à 37°C, 5 % de CO₂. La suite du protocole dépend du type d'analyse à effectuer.

6.6. *Analyse par cytométrie en flux*

Après un temps mise en contact défini de la solution de transfection avec les cellules, ces dernières sont récoltées : chaque puits est lavé par deux fois avec 300 μ L de PBS -/-. Les cellules sont trypsinées avec 200 μ L de trypsine/EDTA durant 5 minutes, à 37°C. La trypsine est neutralisée avec 1.7 mL de milieu basal et les suspensions cellulaires sont transférées dans des microtubes de 2 mL. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 200 g Les surnageants sont éliminés en retournant les tubes (afin d'éviter la perte de matériel). Les culots sont resuspendus dans 200 μ L de PBS -/- complété par 2 % v/v SVF et les suspensions sont homogénéisées. Les cellules sont fixées par l'ajout de 200 μ L supplémentaires de paraformaldéhyde 4 % w/v dans du PBS -/- (2 % SVF), avant d'être finalement analysées par cytométrie en flux.

6.7. *Analyse par microscopie de fluorescence*

Après un temps de mise en contact défini de la solution de transfection avec les cellules, les lamelles sont transférées dans d'autres puits contenant 300 μ L de Hoescht 33342 (Life Technologies) dilué au 1:500^{ème} dans du PBS +/- . Après 15 minutes d'incubation à 37°C, les lamelles sont lavées 5

fois avec 300 μL de PBS +/- . Les cellules sont fixées avec 300 μL de PFA 4 % dans du PBS +/- . Après 30 minutes d'incubation à t.a. les lamelles sont lavées 2 fois avec du PBS +/- avant d'être montées sur lame de verre. La fixation du montage est réalisée en retournant la lamelle sur une goutte de Prolong® gold (*Life technologies*, Eugene, OREGON, USA). Les images de microscopie sont obtenues avec un microscope droit à épifluorescence Zeiss Axio Larger A1 équipé d'un système d'excitation à diodes laser Colibri et d'une caméra AxioCam MRm. Les images sont enregistrées *via* l'interface du logiciel AxioVision, puis traitées avec le logiciel ImageJ.

6.8. Préparation des extraits nucléaires

La lyse est réalisée à partir de culots cellulaires conservés dans l'azote liquide. Le protocole est optimisé pour un nombre de cellules supérieur à 2 millions. L'ensemble des étapes d'extraction 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 lavé avec 1 mL de PBS froid. Une fois culottées (5 min, 500 g), les cellules sont reprises dans 500 μL de tampon A froid (10 mM HEPES pH 7.8, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.02 % Triton X-100, 0.5 mM DTT, 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF) et incubées durant 20 minutes sur glace. La suspension cellulaire est alors vortexée 30 secondes pour achever la lyse de la membrane cytoplasmique. L'efficacité de cette étape est vérifiée au bleu trypan : la lyse est validée si plus de 90 % des cellules sont colorées en bleu. Dans le cas contraire, une seconde incubation de 20 minutes est nécessaire. Les noyaux intacts sont ensuite culottés par 5 minutes de centrifugation à 2300 g à 4°C. Le surnageant, contenant entre autre les protéines cytoplasmiques, est soigneusement retiré. Le culot de noyaux est repris dans 25 μL (12.5 μL pour 10^6 cellules) de tampon B froid (10 mM HEPS pH 7.8, 1.5 mM MgCl_2 , 400 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 25 % glycérol, 0.5 mM DTT, 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF, antiprotéase 0.7 X). La lyse nucléaire se poursuit 20 minutes à 4°C et est parachevée par deux cycles de congélation/décongélation à -80°C (azote liquide) et 4°C respectivement. Une centrifugation finale à 16000 g durant 10 minutes permet de séparer les débris membranaires des protéines nucléaires contenues dans le surnageant. Le lysat est alors aliquoté et stocké à -80°C.

6.9. Dosage des protéines

Avant la congélation des aliquots, 2 μL du lysat sont prélevés et dilués dans 318 μL d'eau milliQ pour effectuer le dosage des protéines. Ce dosage s'effectue grâce au test colorimétrique MicroBC assay, développé par la société *Interchim* (Montluçon, FRANCE). Le principe de ce test repose sur la réduction des ions cuivrique Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^+ par les protéines, en milieu alcalin. Les ions cuivreux sont chélatés par l'acide bicinchoninique et forment ainsi un complexe de couleur

pourpre présentant une forte absorbance à 562 nm. Cette absorbance étant proportionnelle à la concentration protéique, cette méthode permet un dosage colorimétrique rapide en microplaque. La concentration de l'extrait nucléaire est calculée grâce à une gamme étalon réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, 2 mg /mL).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. 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* 79:137-158; **1944**.
- [2] HERSHEY, A. D.; CHASE, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36:39-56; **1952**.
- [3] WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738; **1953**.
- [4] LEVENE, P. A.; LONDON, E. J. On the Structure of Thyminucleic Acid. *Science* 68:572-573; **1928**.
- [5] KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128:693-705; **2007**.
- [6] STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45; **2000**.
- [7] CRICK, F. H. C.; BARNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R. J. General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* 192:1227-1232; **1961**.
- [8] SINGER, M. F. 1968 Nobel Laureate in Medicine or Physiology. *Science* 162:433-436; **1968**.
- [9] LINDAHL, T.; NYBERG, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11:3610-3618; **1972**.
- [10] LINDAHL, T.; KARLSTROM, O. Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* 12:5151-5154; **1973**.
- [11] NAKAMURA, J.; WALKER, V. E.; UPTON, P. B.; CHIANG, S. Y.; KOW, Y. W.; SWENBERG, J. A. Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res* 58:222-225; **1998**.
- [12] NAKAMURA, J.; SWENBERG, J. A. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res* 59:2522-2526; **1999**.
- [13] LAWLEY, P. D.; BROOKES, P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem J* 89:127-138; **1963**.
- [14] LINDAHL, T.; ANDERSSON, A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11:3618-3623; **1972**.
- [15] WILDE, J. A.; BOLTON, P. H.; MAZUMDER, A.; MANOHARAN, M.; GERLT, J. A. Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 111:1894-1896; **1989**.
- [16] WILSON, D. M., 3RD; BARSKY, D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res* 485:283-307; **2001**.
- [17] KINGMA, P. S.; OSHEROFF, N. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1400:223-232; **1998**.
- [18] CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70:369-413; **2001**.
- [19] KINGMA, P. S.; CORBETT, A. H.; BURCHAM, P. C.; MARNETT, L. J.; OSHEROFF, N. Abasic sites stimulate double-stranded DNA cleavage mediated by topoisomerase II. DNA lesions as endogenous topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 270:21441-21444; **1995**.

- [20] KINGMA, P. S.; OSHEROFF, N. Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J Biol Chem* 272:1148-1155; **1997**.
- [21] KUNKEL, T. A.; SCHAAPER, R. M.; LOEB, L. A. Depurination-induced infidelity of DNA synthesis with purified DNA replication proteins in vitro. *Biochemistry* 22:2378-2384; **1983**.
- [22] SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Translesional Synthesis on DNA Templates Containing a Single Abasic Site. A MECHANISTIC STUDY OF THE "A RULE". *J. Biol. Chem.* 272:13916-13922; **1997**.
- [23] WILSON III, D. M.; BARSKY, D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research/DNA Repair* 485:283-307; **2001**.
- [24] KOKOSKA, R. J.; MCCULLOCH, S. D.; KUNKEL, T. A. The Efficiency and Specificity of Apurinic/Apyrimidinic Site Bypass by Human DNA Polymerase η and *Sulfolobus solfataricus* Dpo4. *Journal of Biological Chemistry* 278:50537-50545; **2003**.
- [25] LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715; 1993.
- [26] DIANOV, G.; LINDAHL, T. Preferential recognition of I.T base-pairs in the initiation of excision-repair by hypoxanthine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 19:3829-3833; **1991**.
- [27] FREDERICO, L. A.; KUNKEL, T. A.; SHAW, B. R. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29:2532-2537; **1990**.
- [28] SHEN, J. C.; RIDEOUT, W. M., 3RD; JONES, P. A. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 22:972-976; **1994**.
- [29] COLOT, V.; ROSSIGNOL, J. L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21:402-411; **1999**.
- [30] LUTSENKO, E.; BHAGWAT, A. S. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* 437:11-20; **1999**.
- [31] KAVLI, B.; OTTERLEI, M.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H. E. Uracil in DNA-General mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair* 6:505-516; **2007**.
- [32] DICKSON, K. S.; BURNS, C. M.; RICHARDSON, J. P. Determination of the free-energy change for repair of a DNA phosphodiester bond. *J Biol Chem* 275:15828-15831; **2000**.
- [33] SCHROEDER, G. K.; LAD, C.; WYMAN, P.; WILLIAMS, N. H.; WOLFENDEN, R. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4052-4055; **2006**.
- [34] EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567:1-61; **2004**.
- [35] STEENKEN, S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *Chemical Reviews* 89:503-520; **1989**.
- [36] DIZDAROGLU, M.; KIRKALI, G. L.; JARUGA, P. Formamidopyrimidines in DNA: Mechanisms of formation, repair, and biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* 45:1610-1621; 2008.
- [37] KUCHINO, Y.; MORI, F.; KASAI, H.; INOUE, H.; IWAI, S.; MIURA, K.; OHTSUKA, E.; NISHIMURA, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327:77-79; **1987**.
- [38] MORIYA, M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1122-1126; **1993**.

- [39] CHENG, K. C.; CAHILL, D. S.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; LOEB, L. A. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J Biol Chem* 267:166-172; **1992**.
- [40] WIEDERHOLT, C. J.; GREENBERG, M. M. Fapy.dG instructs Klenow exo(-) to misincorporate deoxyadenosine. *J Am Chem Soc* 124:7278-7279; **2002**.
- [41] O'CONNOR, T. R.; BOITEUX, S.; LAVAL, J. Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 16:5879-5894; **1988**.
- [42] VIEIRA, A. J. S. C.; STEENKEN, S. Pattern of hydroxy radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterization of two types of isomeric hydroxy adduct and their unimolecular transformation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 112:6986-6994; **1990**.
- [43] BURROWS, C. J.; MULLER, J. G.; KORNYSZYNA, O.; LUO, W.; DUARTE, V.; LEIPOLD, M. D.; DAVID, S. S. Structure and potential mutagenicity of new hydantoin products from guanosine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidation by transition metals. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5:713-717; **2002**.
- [44] LUO, W.; MULLER, J. G.; RACHLIN, E. M.; BURROWS, C. J. Characterization of hydantoin products from one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model. *Chem Res Toxicol* 14:927-938; **2001**.
- [45] DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; JAQUINOD, M.; RAVANAT, J.-L.; CADET, J. Repair and Mutagenic Potential of Oxaluric Acid, a Major Product of Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine. *Chemical Research in Toxicology* 14:46-53; **2000**.
- [46] BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev* 98:1109-1152; **1998**.
- [47] TREMBLAY, S. B.; WAGNER, J. R. Dehydration, deamination and enzymatic repair of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC). *Nucleic Acids Research* 36:284-293; **2008**.
- [48] WAGNER, J. R.; HU, C. C.; AMES, B. N. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3380-3384; **1992**.
- [49] VON SONNTAG, C. The chemistry of free-radical-mediated DNA damage. *Basic Life Sci* 58:287-317; discussion 317-221; **1991**.
- [50] RIVIÈRE, J.; KLARSKOV, K.; WAGNER, J. R. Oxidation of 5-Hydroxypyrimidine Nucleosides to 5-Hydroxyhydantoin and Its alpha-Hydroxy-ketone Isomer. *Chemical Research in Toxicology* 18:1332-1338; **2005**.
- [51] TEOULE, R.; CADET, J. Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances--final products. *Mol Biol Biochem Biophys* 27:171-203; **1978**.
- [52] WAGNER, J. R. Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionizing radiation. *EDP Sciences*; **1994**.
- [53] WALLACE, S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology and Medicine* 33:1-14; **2002**.
- [54] IDE, H.; KOW, Y. W.; WALLACE, S. S. Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. *Nucleic Acids Res* 13:8035-8052; **1985**.
- [55] KAO, J. Y.; GOLJER, I.; PHAN, T. A.; BOLTON, P. H. Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR. *J Biol Chem* 268:17787-17793; **1993**.
- [56] EVANS, J.; MACCABEE, M.; HATAHET, Z.; COURCELLE, J.; BOCKRATH, R.; IDE, H.; WALLACE, S. Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 299:147-156; **1993**.

- [57] IDE, H.; PETRULLO, L. A.; HATAHET, Z.; WALLACE, S. S. Processing of DNA base damage by DNA polymerases. Dihydrothymine and beta-ureidoisobutyric acid as models for instructive and noninstructive lesions. *Journal of Biological Chemistry* 266:1469-1477; **1991**.
- [58] PURMAL, A. A.; KOW, Y. W.; WALLACE, S. S. Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res* 22:72-78; **1994**.
- [59] CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531:5-23; **2003**.
- [60] XIANGLIN, S.; YAN, M.; AHMED, N.; HENGGUANG, J. HPLC investigation on Ni(II)-mediated DNA damage in the presence of t-butyl hydroperoxide and glutathione. *Journal of Inorganic Biochemistry* 57:91-102; **1995**.
- [61] EPE, B. DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochemical & Photobiological Sciences* 11:98-106; **2012**.
- [62] DIZDAROGLU, M.; SCHULTE-FROHLINDE, D.; VON SONNTAG, C. Isolation of 2-deoxy-D-erythro-pentonic acid from an alkali-labile site in gamma-irradiated DNA. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 32:481-483; **1977**.
- [63] BERGERON, F.; AUVRE, F.; RADICELLA, J. P.; RAVANAT, J. L. HO* radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5528-5533; **2010**.
- [64] BOX, H. C.; FREUND, H. G.; BUDZINSKI, E. E.; WALLACE, J. C.; MACCUBBIN, A. E. Free radical-induced double base lesions. *Radiat Res* 141:91-94; **1995**.
- [65] MARIAGGI, N.; CADET, J.; TEOULE, R. Cyclisation radicalaire de la désoxy-2' adénosine en solution aqueuse, sous l'effet du rayonnement gamma. *Tetrahedron* 32:2385-2387; **1976**.
- [66] HUANG, H.; DAS, R. S.; BASU, A. K.; STONE, M. P. Structures of (5S)-8,5-Cyclo-2'-deoxyguanosine Mismatched with dA or dT. *Chemical Research in Toxicology* 25:478-490; **2012**.
- [67] ROMIEU, A.; GASPARUTTO, D.; MOLKO, D.; CADET, J. Site-Specific Introduction of (5'S)-5',8-Cyclo-2'-deoxyadenosine into Oligodeoxyribonucleotides. *The Journal of Organic Chemistry* 63:5245-5249; **1998**.
- [68] BROOKS, P. J.; WISE, D. S.; BERRY, D. A.; KOSMOSKI, J. V.; SMERDON, M. J.; SOMERS, R. L.; MACKIE, H.; SPOONDE, A. Y.; ACKERMAN, E. J.; COLEMAN, K.; TARONE, R. E.; ROBBINS, J. H. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 275:22355-22362; **2000**.
- [69] OLINSKI, R.; NACKERDIEN, Z.; DIZDAROGLU, M. DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of gamma-irradiated or H2O2-treated cultured human cells. *Arch Biochem Biophys* 297:139-143; **1992**.
- [70] DOUKI, T.; RIVIERE, J.; CADET, J. 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* 15:445-454; **2002**.
- [71] HUANG, H.; IMOTO, S.; GREENBERG, M. M. The Mutagenicity of Thymidine Glycol in Escherichia coli Is Increased When It Is Part of a Tandem Lesion. *Biochemistry* 48:7833-7841; **2009**.
- [72] GATES, K. S. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol* 22:1747-1760; **2009**.
- [73] GASPARUTTO, D.; DHERIN, C.; BOITEUX, S.; CADET, J. Excision of 8-methylguanine site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by the AlkA protein of Escherichia coli. *DNA Repair (Amst)* 1:437-447; **2002**.

- [74] TUDEK, B.; GRAZIEWICZ, M.; KAZANOVA, O.; ZASTAWNY, T. H.; OBTULOWICZ, T.; LAVAL, J. Mutagenic specificity of imidazole ring-opened 7-methylpurines in M13mp18 phage DNA. *Acta Biochim Pol* 46:785-799; **1999**.
- [75] BOITEUX, S.; BELLENEY, J.; ROQUES, B. P.; LAVAL, J. Two rotameric forms of open ring 7-methylguanine are present in alkylated polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 12:5429-5439; **1984**.
- [76] PULLMAN, A.; PULLMAN, B. Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q Rev Biophys* 14:289-380; **1981**.
- [77] SHOOTER, K. V.; HOWSE, R.; SHAH, S. A.; LAWLEY, P. D. The molecular basis for biological inactivation of nucleic acids. The action of methylating agents on the ribonucleic acid-containing bacteriophage R17. *Biochem J* 137:303-312; **1974**.
- [78] FRONZA, G.; GOLD, B. The biological effects of N3-methyladenine. *J Cell Biochem* 91:250-257; **2004**.
- [79] ENGELWARD, B. P.; ALLAN, J. M.; DRESLIN, A. J.; KELLY, J. D.; WU, M. M.; GOLD, B.; SAMSON, L. D. A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome. *J Biol Chem* 273:5412-5418; **1998**.
- [80] LARSON, K.; SAHM, J.; SHENKAR, R.; STRAUSS, B. Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutat Res* 150:77-84; **1985**.
- [81] RYDBERG, B.; LINDAHL, T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J* 1:211-216; **1982**.
- [82] TAVERNA, P.; SEDGWICK, B. Generation of an endogenous DNA-methylating agent by nitrosation in Escherichia coli. *J Bacteriol* 178:5105-5111; **1996**.
- [83] ASHWORTH, D. J.; BAIRD, W. M.; CHANG, C. J.; CIUPEK, J. D.; BUSCH, K. L.; COOKS, R. G. Chemical modification of nucleic acids. Methylation of calf thymus DNA investigated by mass spectrometry and liquid chromatography. *Biomed Mass Spectrom* 12:309-318; **1985**.
- [84] KAWASAKI, H.; KASAI, H.; OKUYAMA, T. Protein analyses and reagents: microscale assay of calcium-binding activity of proteins and peptides using a nitrocellulose membrane. *Anal Biochem* 148:297-302; **1985**.
- [85] BODELL, W. J.; SINGER, B. Influence of hydrogen bonding in DNA and polynucleotides on reaction of nitrogens and oxygens toward ethylnitrosourea. *Biochemistry* 18:2860-2863; **1979**.
- [86] SEDGWICK, B. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:148-157; **2004**.
- [87] BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231:11-30; **1990**.
- [88] DOLAN, M. E.; PEGG, A. E. Extent of formation of O4-methylthymidine in calf thymus DNA methylated by N-methyl-N-nitrosourea and lack of repair of this product by rat liver O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Carcinogenesis* 6:1611-1614; **1985**.
- [89] SINGER, B. Mutagenic effects of nucleic acid modification and repair assessed by in vitro transcription. *Basic Life Sci* 23:1-34; **1983**.
- [90] VERBEEK, B.; SOUTHGATE, T. D.; GILHAM, D. E.; MARGISON, G. P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull* 85:17-33; **2008**.
- [91] HUMBERT, O.; FIUMICINO, S.; AQUILINA, G.; BRANCH, P.; ODA, S.; ZIINO, A.; KARRAN, P.; BIGNAMI, M. Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis* 20:205-214; **1999**.
- [92] PAULY, G. T.; MOSCHEL, R. C. Mutagenesis by O(6)-methyl-, O(6)-ethyl-, and O(6)-benzylguanine and O(4)-methylthymine in human cells: effects of O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase and mismatch repair. *Chem Res Toxicol* 14:894-900; **2001**.

- [93] MARGISON, G. P.; SANTIBANEZ KOREF, M. F.; POVEY, A. C. Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O6-methylguanine. *Mutagenesis* 17:483-487; **2002**.
- [94] AUGUSTO, O.; CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G.; RAMAKRISHNA, N. V.; KOLAR, C. Formation of 8-methylguanine as a result of DNA alkylation by methyl radicals generated during horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of methylhydrazine. *J Biol Chem* 265:22093-22096; **1990**.
- [95] HIX, S.; KADIISKA, M. B.; MASON, R. P.; AUGUSTO, O. In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol* 13:1056-1064; **2000**.
- [96] NETTO, L. E.; RAMAKRISHNA, N. V.; KOLAR, C.; CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G.; LAWSON, T. A.; AUGUSTO, O. Identification of C8-methylguanine in the hydrolysates of DNA from rats administered 1,2-dimethylhydrazine. Evidence for in vivo DNA alkylation by methyl radicals. *J Biol Chem* 267:21524-21527; **1992**.
- [97] KOHDA, K.; TSUNOMOTO, H.; MINOURA, Y.; TANABE, K.; SHIBUTANI, S. Synthesis, miscoding specificity, and thermodynamic stability of oligodeoxynucleotide containing 8-methyl-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 9:1278-1284; **1996**.
- [98] MULLER, N.; CONRAD, J.; EISENBRAND, G. Alkylation of 2'-deoxythymidylyl(3'----5')-2'-deoxythymidine with 2-hydroxyethylnitrosourea and stability of the resulting phosphotriester. *IARC Sci Publ*:194-196; **1987**.
- [99] GRIMMER, G.; BRUNE, H.; DETTBARN, G.; JACOB, J.; MISFELD, J.; MOHR, U.; NAUJACK, K. W.; TIMM, J.; WENZEL-HARTUNG, R. Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 339:792-795; **1991**.
- [100] DIPPLE, A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci Publ*:107-129; **1994**.
- [101] XUE, W.; WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206:73-93; **2005**.
- [102] WEINSTEIN, I. B.; JEFFREY, A. M.; JENNETTE, K. W.; BLOBSTEIN, S. H.; HARVEY, R. G.; HARRIS, C.; AUTRUP, H.; KASAI, H.; NAKANISHI, K. Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science* 193:592-595; **1976**.
- [103] CHUNG, F.-L.; CHEN, H. J. C.; NATH, R. G. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis* 17:2105-2111; **1996**.
- [104] LOUREIRO, A. P.; DI MASCIIO, P.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H. trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem Res Toxicol* 13:601-609; **2000**.
- [105] MOLLER, P.; WALLIN, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 410:271-290; **1998**.
- [106] BARBIN, A. Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 462:55-69; **2000**.
- [107] BARBIN, A. Role of etheno DNA adducts in carcinogenesis induced by vinyl chloride in rats. *IARC Sci Publ*:303-313; **1999**.
- [108] GUICHARD, Y.; EL GHISSASSI, F.; NAIR, J.; BARTSCH, H.; BARBIN, A. Formation and accumulation of DNA ethenobases in adult Sprague-Dawley rats exposed to vinyl chloride. *Carcinogenesis* 17:1553-1559; **1996**.
- [109] BARTSCH, H.; NAIR, J.; VELIC, I. Etheno-DNA base adducts as tools in human cancer aetiology and chemoprevention. *Eur J Cancer Prev* 6:529-534; **1997**.
- [110] NAIR, J.; GAL, A.; TAMIR, S.; TANNENBAUM, S. R.; WOGAN, G. N.; BARTSCH, H. Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide. *Carcinogenesis* 19:2081-2084; **1998**.

- [111] MARION, M. J.; FROMENT, O.; TREPO, C. Activation of Ki-ras gene by point mutation in human liver angiosarcoma associated with vinyl chloride exposure. *Mol Carcinog* 4:450-454; **1991**.
- [112] HOLLSTEIN, M.; MARION, M. J.; LEHMAN, T.; WELSH, J.; HARRIS, C. C.; MARTEL-PLANCHE, G.; KUSTERS, I.; MONTESANO, R. p53 mutations at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers. *Carcinogenesis* 15:1-3; **1994**.
- [113] LAWLEY, P. D.; LETHBRIDGE, J. H.; EDWARDS, P. A.; SHOOTER, K. V. Inactivation of bacteriophage T7 by mono- and difunctional sulphur mustards in relation to cross-linking and depurination of bacteriophage DNA. *J Mol Biol* 39:181-198; **1969**.
- [114] BALALI-MOOD, M.; HEFAZI, M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundam Clin Pharmacol* 19:297-315; **2005**.
- [115] BALL, C. R.; ROBERTS, J. J. Estimation of interstrand DNA cross-linking resulting from mustard gas alkylation of HeLa cells. *Chem Biol Interact* 4:297-303; **1972**.
- [116] WALKER, I. G. Intrastrand bifunctional alkylation of DNA in mammalian cells treated with mustard gas. *Can J Biochem* 49:332-336; **1971**.
- [117] LAWLEY, P. D.; BROOKES, P. Molecular mechanism of the cytotoxic action of difunctional alkylating agents and of resistance to this action. *Nature* 206:480-483; **1965**.
- [118] LIN, P.; VAUGHAN, F. L.; BERNSTEIN, I. A. Formation of interstrand DNA cross-links by bis-(2-chloroethyl)sulfide (BCES): a possible cytotoxic mechanism in rat keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 218:556-561; **1996**.
- [119] NIEDERNHOFER, L. J.; ODIJK, H.; BUDZOWSKA, M.; VAN DRUNEN, E.; MAAS, A.; THEIL, A. F.; DE WIT, J.; JASPERS, N. G.; BEVERLOO, H. B.; HOEIJMAKERS, J. H.; KANAAR, R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24:5776-5787; **2004**.
- [120] HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2:188-200; **2002**.
- [121] BEI, R.; MARZOCHELLA, L.; TURRIZIANI, M. The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 5:172-187; **2010**.
- [122] STEVENS, M. F. G.; HICKMAN, J. A.; LANGDON, S. P.; CHUBB, D.; VICKERS, L.; STONE, R.; BAIG, G.; GODDARD, C.; GIBSON, N. W.; SLACK, J. A.; NEWTON, C.; LUNT, E.; FIZAMES, C.; LAVELLE, F. O. Antitumor Activity and Pharmacokinetics in Mice of 8-Carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a Novel Drug with Potential as an Alternative to Dacarbazine. *Cancer Research* 47:5846-5852; **1987**.
- [123] MIDDLETON, M. R.; MARGISON, G. P. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *The Lancet Oncology* 4:37-44; **2003**.
- [124] ADAIR, F. E.; BAGG, H. J. Experimental and Clinical Studies on the Treatment of Cancer by Dichlorethylsulphide (Mustard Gas. *Ann Surg* 93:190-199; **1931**.
- [125] GARCIA-ESCOBAR, I.; SEPULVEDA, J.; CASTELLANO, D.; CORTÈS-FUNES, H. Therapeutic management of chronic lymphocytic leukaemia: State of the art and future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 80:100-113; **2011**.
- [126] HEMMINKI, K. DNA adducts of nitrogen mustards and ethylene imines. *IARC Sci Publ*:313-321; **1994**.
- [127] POVIRK, L. F.; SHUKER, D. E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res* 318:205-226; **1994**.
- [128] KOHN, K. W.; SPEARS, C. L.; DOTY, P. Inter-strand crosslinking of DNA by nitrogen mustard. *J Mol Biol* 19:266-288; **1966**.

- [129] HANSSON, J.; LEWENSOHN, R.; RINGBORG, U.; NILSSON, B. Formation and removal of DNA cross-links induced by melphalan and nitrogen mustard in relation to drug-induced cytotoxicity in human melanoma cells. *Cancer Res* 47:2631-2637; **1987**.
- [130] EWEND, M. G.; BREM, S.; GILBERT, M.; GOODKIN, R.; PENAR, P. L.; VARIA, M.; CUSH, S.; CAREY, L. A. Treatment of Single Brain Metastasis with Resection, Intracavity Carmustine Polymer Wafers, and Radiation Therapy Is Safe and Provides Excellent Local Control. *Clinical Cancer Research* 13:3637-3641; **2007**.
- [131] SCHABEL, F. M., JR.; JOHNSTON, T. P.; MC, C. G.; MONTGOMERY, J. A.; LASTER, W. R.; SKIPPER, H. E. Experimental evaluation of potential anticancer agents VIII. Effects of certain nitrosoureas on intracerebral L1210 leukemia. *Cancer Res* 23:725-733; **1963**.
- [132] TONG, W. P.; KIRK, M. C.; LUDLUM, D. B. Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* 42:3102-3105; **1982**.
- [133] ANG, W. H.; KHALAILA, I.; ALLARDYCE, C. S.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; DYSON, P. J. Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. *J Am Chem Soc* 127:1382-1383; **2005**.
- [134] ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205:698-699; **1965**.
- [135] EASTMAN, A. Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). *Biochemistry* 22:3927-3933; **1983**.
- [136] FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M.; VAN DER VEER, J. L.; DEN HARTOG, J. H.; LOHMAN, P. H.; REEDIJK, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24:707-713; **1985**.
- [137] HEIGER-BERNAYS, W. J.; ESSIGMANN, J. M.; LIPPARD, S. J. Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication. *Biochemistry* 29:8461-8466; **1990**.
- [138] ZWELLING, L. A.; ANDERSON, T.; KOHN, K. W. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis- and trans-platinum(II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer Res* 39:365-369; **1979**.
- [139] IWAMOTO, T.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S.; MIZUTANI, H.; KOJIMA, M.; KAWANISHI, S. DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Science* 95:454-458; **2004**.
- [140] TONG, W. P.; LUDLUM, D. B. Crosslinking of DNA by busulfan. Formation of diguanyl derivatives. *Biochim Biophys Acta* 608:174-181; **1980**.
- [141] BIZANEK, R.; CHOWDARY, D.; ARAI, H.; KASAI, M.; HUGHES, C. S.; SARTORELLI, A. C.; ROCKWELL, S.; TOMASZ, M. Adducts of mitomycin C and DNA in EMT6 mouse mammary tumor cells: effects of hypoxia and dicumarol on adduct patterns. *Cancer Res* 53:5127-5134; **1993**.
- [142] BIZANEK, R.; MCGUINNESS, B. F.; NAKANISHI, K.; TOMASZ, M. Isolation and structure of an intrastrand cross-link adduct of mitomycin C and DNA. *Biochemistry* 31:3084-3091; **1992**.
- [143] TOMASZ, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology* 2:575-579; **1995**.
- [144] VERWEIJ, J.; PINEDO, H. M. Mitomycin C. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 11:67-73; **1990**.
- [145] TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1:280-291; **2009**.

- [146] JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 107:1387-1407; **2007**.
- [147] SCZEPANSKI, J. T.; JACOBS, A. C.; VAN HOUTEN, B.; GREENBERG, M. M. Double-Strand Break Formation during Nucleotide Excision Repair of a DNA Interstrand Cross-Link. *Biochemistry* 48:7565-7567; **2009**.
- [148] DE GRUIJL, F. R.; VAN DER LEUN, J. C. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Phys* 67:319-325; **1994**.
- [149] CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571:3-17; **2005**.
- [150] RAVANAT, J.-L.; DOUKI, T.; CADET, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63:88-102; **2001**.
- [151] PARK, H.; ZHANG, K.; REN, Y.; NADJI, S.; SINHA, N.; TAYLOR, J.-S.; KANG, C. Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:15965-15970; **2002**.
- [152] HORSFALL, M. J.; LAWRENCE, C. W. Accuracy of replication past the T-C (6-4) adduct. *J Mol Biol* 235:465-471; **1994**.
- [153] BANERJEE, S. K.; CHRISTENSEN, R. B.; LAWRENCE, C. W.; LECLERC, J. E. Frequency and spectrum of mutations produced by a single cis-syn thymine-thymine cyclobutane dimer in a single-stranded vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8141-8145; **1988**.
- [154] YOON, J. H.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Highly error-free role of DNA polymerase eta in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18219-18224; **2009**.
- [155] PENG, W.; SHAW, B. R. Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions. *Biochemistry* 35:10172-10181; **1996**.
- [156] BRASH, D. E.; RUDOLPH, J. A.; SIMON, J. A.; LIN, A.; MCKENNA, G. J.; BADEN, H. P.; HALPERIN, A. J.; PONTEN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10124-10128; **1991**.
- [157] YANG, W. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Sci*; **2011**.
- [158] BOSCA, F.; LHIAUBET-VALLET, V.; CUQUERELLA, M. C.; CASTELL, J. V.; MIRANDA, M. A. The triplet energy of thymine in DNA. *J Am Chem Soc* 128:6318-6319; **2006**.
- [159] MOURET, S.; BAUDOQUIN, C.; CHARVERON, M.; FAVIER, A.; CADET, J.; DOUKI, T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13765-13770; **2006**.
- [160] MOURET, S.; PHILIPPE, C.; GRACIA-CHANTEGREL, J.; BANYASZ, A.; KARPATI, S.; MARKOVITSI, D.; DOUKI, T. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Org Biomol Chem* 8:1706-1711; **2010**.
- [161] MOYSAN, A.; VIARI, A.; VIGNY, P.; VOITURIEZ, L.; CADET, J.; MOUSTACCHI, E.; SAGE, E. Formation of cyclobutane thymine dimers photosensitized by pyridopsoralens: quantitative and qualitative distribution within DNA. *Biochemistry* 30:7080-7088; **1991**.
- [162] EPE, B.; HENZL, H.; ADAM, W.; SAHA-MOLLER, C. R. Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucleic Acids Res* 21:863-869; **1993**.
- [163] PEAK, J. G.; PEAK, M. J.; MACCOSS, M. DNA breakage caused by 334-nm ultraviolet light is enhanced by naturally occurring nucleic acid components and nucleotide coenzymes. *Photochem Photobiol* 39:713-716; **1984**.

- [164] TYRRELL, R. M. Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol* 319:290-296; **2000**.
- [165] GIROTTI, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J Photochem Photobiol B* 63:103-113; **2001**.
- [166] ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X.-H.; CHILDS, C. J. H.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 1:27-42; **2004**.
- [167] FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54:659; **1991**.
- [168] HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 55:145-157; **1992**.
- [169] THOMAS, D. J. ICRU report 85: fundamental quantities and units for ionizing radiation. *Radiation Protection Dosimetry* 150:550-552; **2012**.
- [170] GOODHEAD, D. T. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* 56:623-634; **1989**.
- [171] DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; POUGET, J. P.; TESTARD, I.; CADET, J. Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *Int J Radiat Biol* 82:119-127; **2006**.
- [172] SUTHERLAND, B. M.; BENNETT, P. V.; SIDORKINA, O.; LAVAL, J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:103-108; **2000**.
- [173] GOODHEAD, D. T. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *J Radiat Res* 40 Suppl:1-13; **1999**.
- [174] GULSTON, M.; DE LARA, C.; JENNER, T.; DAVIS, E.; O'NEILL, P. Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Res* 32:1602-1609; **2004**.
- [175] SHIKAZONO, N.; NOGUCHI, M.; FUJII, K.; URUSHIBARA, A.; YOKOYA, A. The Yield, Processing, and Biological Consequences of Clustered DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Journal of Radiation Research* 50:27-36; **2009**.
- [176] CHEN, J.; STUBBE, J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112; **2005**.
- [177] POVIRK, L. F. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 355:71-89; **1996**.
- [178] BURGER, R. M. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chemical Reviews* 98:1153-1170; **1998**.
- [179] KAMIYA, H. Mutagenicity of oxidized DNA precursors in living cells: Roles of nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes, and translesion synthesis DNA polymerases. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 703:32-36; **2010**.
- [180] GROGAN, B. C.; PARKER, J. B.; GUMINSKI, A. F.; STIVERS, J. T. Effect of the Thymidylate Synthase Inhibitors on dUTP and TTP Pool Levels and the Activities of DNA Repair Glycosylases on Uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochemistry* 50:618-627; **2010**.
- [181] SEIPLE, L.; JARUGA, P.; DIZDAROGLU, M.; STIVERS, J. T. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acids Research* 34:140-151; **2006**.
- [182] BEARD, W. A.; WILSON, S. H. Structural Insights into the Origins of DNA Polymerase Fidelity. *Structure* 11:489-496; **2003**.
- [183] BEARD, W. A.; SHOCK, D. D.; VANDE BERG, B. J.; WILSON, S. H. Efficiency of Correct Nucleotide Insertion Governs DNA Polymerase Fidelity. *Journal of Biological Chemistry* 277:47393-47398; **2002**.

- [184] REHA-KRANTZ, L. J. DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804:1049-1063; **2010**.
- [185] JOHNSON, R. E.; PRAKASH, S.; PRAKASH, L. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science* 283:1001-1004; **1999**.
- [186] MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *EMBO J* 19:3100-3109; **2000**.
- [187] HO, T. V.; SCHÄRER, O. D. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51:552-566; **2010**.
- [188] NAIR, D. T.; JOHNSON, R. E.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S.; AGGARWAL, A. K. DNA Synthesis across an Abasic Lesion by Human DNA Polymerase η. *Structure* 17:530-537; **2009**.
- [189] LOCATELLI, G. A.; POSPIECH, H.; TANGUY LE GAC, N.; VAN LOON, B.; HUBSCHER, U.; PARKKINEN, S.; SYVAOJA, J. E.; VILLANI, G. Effect of 8-oxoguanine and abasic site DNA lesions on in vitro elongation by human DNA polymerase in the presence of replication protein A and proliferating-cell nuclear antigen. *Biochem J* 429:573-582; **2010**.
- [190] ENOIU, M.; JIRICNY, J.; SCHÄRER, O. D. Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Research* 40:8953-8964; **2012**.
- [191] FISCHHABER, P. L.; GERLACH, V. L.; FEAVER, W. J.; HATAHET, Z.; WALLACE, S. S.; FRIEDBERG, E. C. Human DNA polymerase kappa bypasses and extends beyond thymine glycols during translesion synthesis in vitro, preferentially incorporating correct nucleotides. *J Biol Chem* 277:37604-37611; **2002**.
- [192] CHOI, J.-Y.; LIM, S.; KIM, E.-J.; JO, A.; GUENGERICH, F. P. Translesion Synthesis across Abasic Lesions by Human B-Family and Y-Family DNA Polymerases, α, δ, η, ι, κ and REV1. *Journal of Molecular Biology* 404:34-44; **2010**.
- [193] HUBSCHER, U.; MAGA, G. DNA replication and repair bypass machines. *Curr Opin Chem Biol*; **2011**.
- [194] SUTTON, M. D. Coordinating DNA polymerase traffic during high and low fidelity synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804:1167-1179; **2010**.
- [195] KUNKEL, T. A.; BEBENEK, K. DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* 69:497-529; **2000**.
- [196] ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439; **2000**.
- [197] COSTELLOE, T.; FITZGERALD, J.; MURPHY, N. J.; FLAUS, A.; LOWNDES, N. F. Chromatin modulation and the DNA damage response. *Experimental Cell Research* 312:2677-2686; **2006**.
- [198] GREEN, C. M.; ALMOUZNI, G. When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3:28-33; **2002**.
- [199] LYDALL, D.; WHITEHALL, S. Chromatin and the DNA damage response. *DNA Repair* 4:1195-1207; **2005**.
- [200] ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516; 2007.
- [201] NOWSHEEN, S.; YANG, E. S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol* 34:243-254; **2012**.
- [202] RODRIGUEZ-ROCHA, H.; GARCIA-GARCIA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; FRANCO, R. DNA damage and autophagy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711:158-166; **2011**.
- [203] EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663-669; **2004**.

- [204] HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell* 28:739-745; **2007**.
- [205] LAVIN, M. F.; KOZLOV, S. ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6:931-942; 2007.
- [206] PETRINI, J. H. The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr Opin Cell Biol* 12:293-296; **2000**.
- [207] KHANNA, K. K.; LAVIN, M. F.; JACKSON, S. P.; MULHERN, T. D. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* 8:1052-1065; **2001**.
- [208] MATSUOKA, S.; BALLIF, B. A.; SMOGORZEWSKA, A.; McDONALD, E. R., 3RD; HUOV, K. E.; LUO, J.; BAKALARSKI, C. E.; ZHAO, Z.; SOLIMINI, N.; LERENTHAL, Y.; SHILOH, Y.; GYGI, S. P.; ELLEDGE, S. J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160-1166; **2007**.
- [209] SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; UNSAL-KACMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39-85; 2004.
- [210] HELTON, E. S.; CHEN, X. p53 modulation of the DNA damage response. *Journal of Cellular Biochemistry* 100:883-896; **2007**.
- [211] MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer* 9:714-723; **2009**.
- [212] ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*; **2012**.
- [213] KAUFMANN, W. K.; PAULES, R. S. DNA damage and cell cycle checkpoints. *The FASEB Journal* 10:238-247; **1996**.
- [214] CHEN, H.; CHAN, D. C.; GERALD, P. S. Mitochondrial Dynamics in Mammals. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press; 18:119-144; **2004**.
- [215] CHEN, X.; CHEN, Z.; CHEN, H.; SU, Z.; YANG, J.; LIN, F.; SHI, S.; HE, X. Nucleosomes Suppress Spontaneous Mutations Base-Specifically in Eukaryotes. *Science* 335:1235-1238; **2012**.
- [216] ENRIGHT, H. U.; MILLER, W. J.; HEBBEL, R. P. Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage. *Nucleic Acids Research* 20:3341-3346; **1992**.
- [217] LJUNGMAN, M.; HANAWALT, P. C. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Molecular Carcinogenesis* 5:264-269; **1992**.
- [218] SMERDON, M. J. DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr Opin Cell Biol* 3:422-428; **1991**.
- [219] TURNER, B. Chromatin: Structure and Function, third edition, Alan Wolffe. *Chromosome Research* 8:457-458; **2000**.
- [220] SULTAN, A.; NESSLANY, F.; VIOLET, M.; BÉCARD, S. V.; LOYENS, A.; TALAHARI, S.; MANSUROGLU, Z.; MARZIN, D.; SERGEANT, N.; HUMEZ, S.; COLIN, M.; BONNEFOY, E.; BUÉE, L.; GALAS, M.-C. Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal of Biological Chemistry* 286:4566-4575; 2011.
- [221] LEE, K. S.; BUMBACA, D.; KOSMAN, J.; SETLOW, P.; JEDRZEJAS, M. J. Structure of a protein DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:2806-2811; **2008**.
- [222] SETLOW, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology* 15:172-180; **2007**.
- [223] DOUKI, T.; BRETONNIERE, Y.; CADET, J. Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiat Res* 153:29-35; **2000**.

- [224] GERNER, E. W.; MEYSKENS, F. L., JR. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 4:781-792; **2004**.
- [225] BUETTNER, G. R. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anticancer Agents Med Chem* 11:341-346; **2011**.
- [226] KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* 32:44-50; **2007**.
- [227] KRISTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711:193-201; **2010**.
- [228] STINEFELT, B.; LEONARD, S. S.; BLEMMINGS, K. P.; SHI, X.; KLANDORF, H. Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. *Ann Clin Lab Sci* 35:37-45; **2005**.
- [229] LADNER, R. D. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci* 2:361-370; **2001**.
- [230] MO, J. Y.; MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11021-11025; **1992**.
- [231] SEKIGUCHI, M.; TSUZUKI, T. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 21:8895-8904; **2002**.
- [232] DRAKE, J. W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; CROW, J. F. Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 148:1667-1686; **1998**.
- [233] O'BRIEN, P. J.; HERSCHLAG, D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* 6:R91-R105; **1999**.
- [234] O'BRIEN, P. J. Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chem Rev* 106:720-752; **2006**.
- [235] EKER, A. P. M.; QUAYLE, C.; CHAVES, I.; HORST, G. T. J. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:968-980; **2009**.
- [236] MISHINA, Y.; DUGUID, E. M.; HE, C. Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem Rev* 106:215-232; **2006**.
- [237] SEDGWICK, B.; ROBINS, P.; TOTTY, N.; LINDAHL, T. Functional domains and methyl acceptor sites of the Escherichia coli ada protein. *J Biol Chem* 263:4430-4433; **1988**.
- [238] SEDGWICK, B.; LINDAHL, T. Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* 21:8886-8894; **2002**.
- [239] PAALMAN, S. R.; SUNG, C.; CLARKE, N. D. Specificity of DNA repair methyltransferases determined by competitive inactivation with oligonucleotide substrates: evidence that Escherichia coli Ada repairs O6-methylguanine and O4-methylthymine with similar efficiency. *Biochemistry* 36:11118-11124; **1997**.
- [240] GOUWS, C.; PRETORIUS, P. J. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): Can function explain a suicidal mechanism? *Med Hypotheses*; **2011**.
- [241] BEGLEY, T. J.; SAMSON, L. D. AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. *Trends in Biochemical Sciences* 28:2-5; **2003**.
- [242] DUNCAN, T.; TREWICK, S. C.; KOIVISTO, P.; BATES, P. A.; LINDAHL, T.; SEDGWICK, B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:16660-16665; **2002**.

- [243] FU, D.; SAMSON, L. D. Direct repair of 3,N4-ethenocytosine by the human ALKBH2 dioxygenase is blocked by the AAG/MPG glycosylase. *DNA Repair*; **2011**.
- [244] ESSEN, L. O.; KLAR, T. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci* 63:1266-1277; **2006**.
- [245] SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103:2203-2237; **2003**.
- [246] GRIFFIN, E. A.; STAKNIS, D.; WEITZ, C. J. Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock. *Science* 286:768-771; **1999**.
- [247] VAN DER HORST, G. T.; MUIJTJENS, M.; KOBAYASHI, K.; TAKANO, R.; KANNO, S.; TAKAO, M.; DE WIT, J.; VERKERK, A.; EKER, A. P.; VAN LEENEN, D.; BUIJS, R.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J. H.; YASUI, A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398:627-630; **1999**.
- [248] DONNELLAN, J. E., JR.; SETLOW, R. B. Thymine Photoproducts but not Thymine Dimers Found in Ultraviolet-Irradiated Bacterial Spores. *Science* 149:308-310; **1965**.
- [249] VARGHESE, A. J. 5-Thyminy-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem Biophys Res Commun* 38:484-490; **1970**.
- [250] MUNAKATA, N.; RUPERT, C. S. Genetically Controlled Removal of "Spore Photoproduct" from Deoxyribonucleic Acid of Ultraviolet-Irradiated *Bacillus subtilis* Spores. *Journal of Bacteriology* 111:192-198; **1972**.
- [251] SLIEMAN, T. A.; REBEIL, R.; NICHOLSON, W. L. Spore photoproduct (SP) lyase from *Bacillus subtilis* specifically binds to and cleaves SP (5-thyminy-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA. *J Bacteriol* 182:6412-6417; **2000**.
- [252] BUIS, J. M.; CHEEK, J.; KALLIRI, E.; BRODERICK, J. B. Characterization of an active spore photoproduct lyase, a DNA repair enzyme in the radical S-adenosylmethionine superfamily. *J Biol Chem* 281:25994-26003; **2006**.
- [253] DE LAAT, W. L.; JASPERS, N. G.; HOEIJMAKERS, J. H. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13:768-785; **1999**.
- [254] FRIEDBERG, E. C. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1:22-33; **2001**.
- [255] SCHARER, O. D. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:2946-2974; **2003**.
- [256] SUGASAWA, K.; NG, J. M.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; VAN DER SPEK, P. J.; EKER, A. P.; HANAOKA, F.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J. H. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2:223-232; **1998**.
- [257] KIM, J. K.; PATEL, D.; CHOI, B. S. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* 62:44-50; **1995**.
- [258] FUJIWARA, Y.; MASUTANI, C.; MIZUKOSHI, T.; KONDO, J.; HANAOKA, F.; IWAI, S. Characterization of DNA Recognition by the Human UV-damaged DNA-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 274:20027-20033; **1999**.
- [259] PAYNE, A.; CHU, G. Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutat Res* 310:89-102; **1994**.
- [260] COIN, F.; OKSENYCH, V.; EGLY, J. M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell* 26:245-256; **2007**.
- [261] O'DONOVAN, A.; DAVIES, A. A.; MOGGS, J. G.; WEST, S. C.; WOOD, R. D. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371:432-435; **1994**.

- [262] MU, D.; HSU, D. S.; SANCAR, A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 271:8285-8294; **1996**.
- [263] BUDD, M. E.; CAMPBELL, J. L. DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15:2173-2179; **1995**.
- [264] SHIVJI, K. K.; KENNY, M. K.; WOOD, R. D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* 69:367-374; **1992**.
- [265] BARNES, D. E.; TOMKINSON, A. E.; LEHMANN, A. R.; WEBSTER, A. D.; LINDAHL, T. Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cell* 69:495-503; **1992**.
- [266] BOHR, V. A.; SMITH, C. A.; OKUMOTO, D. S.; HANAWALT, P. C. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40:359-369; **1985**.
- [267] MELLON, I.; BOHR, V. A.; SMITH, C. A.; HANAWALT, P. C. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8878-8882; **1986**.
- [268] FOUSTERI, M.; MULLENDERS, L. H. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18:73-84; **2008**.
- [269] SARKER, A. H.; TSUTAKAWA, S. E.; KOSTEK, S.; NG, C.; SHIN, D. S.; PERIS, M.; CAMPEAU, E.; TAINER, J. A.; NOGALES, E.; COOPER, P. K. Recognition of RNA Polymerase II and Transcription Bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: Insights for Transcription-Coupled Repair and Cockayne Syndrome. *Molecular Cell* 20:187-198; **2005**.
- [270] SVEJSTRUP, J. Q. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:21-29; **2002**.
- [271] HANAWALT, P. C. DNA repair. The bases for Cockayne syndrome. *Nature* 405:415-416; **2000**.
- [272] NOUSPIKEL, T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66:994-1009; **2009**.
- [273] HAZRA, T. K.; DAS, A.; DAS, S.; CHOUDHURY, S.; KOW, Y. W.; ROY, R. Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective. *DNA Repair (Amst)* 6:470-480; **2007**.
- [274] REIS, A. M.; MILLS, W. K.; RAMACHANDRAN, I.; FRIEDBERG, E. C.; THOMPSON, D.; QUEIMADO, L. Targeted detection of in vivo endogenous DNA base damage reveals preferential base excision repair in the transcribed strand. *Nucleic Acids Res*; **2011**.
- [275] BREGEON, D.; DODDRIDGE, Z. A.; YOU, H. J.; WEISS, B.; DOETSCH, P. W. Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 12:959-970; **2003**.
- [276] TUO, J.; JARUGA, P.; RODRIGUEZ, H.; DIZDAROGLU, M.; BOHR, V. A. The cockayne syndrome group B gene product is involved in cellular repair of 8-hydroxyadenine in DNA. *J Biol Chem* 277:30832-30837; **2002**.
- [277] KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; SCOTTO, J. DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5:511-514; **1984**.
- [278] KRAEMER, K. H.; LEE, M. M.; SCOTTO, J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* 123:241-250; **1987**.
- [279] RAPIN, I.; LINDENBAUM, Y.; DICKSON, D. W.; KRAEMER, K. H.; ROBBINS, J. H. Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* 55:1442-1449; **2000**.
- [280] ROBBINS, J. H.; KRAEMER, K. H.; LUTZNER, M. A.; FESTOFF, B. W.; COON, H. G. Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair. *Ann Intern Med* 80:221-248; **1974**.

- [281] MASUTANI, C.; KUSUMOTO, R.; YAMADA, A.; YUASA, M.; ARAKI, M.; NOGIMORI, T.; YOKOI, M.; EKI, T.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Xeroderma pigmentosum variant: from a human genetic disorder to a novel DNA polymerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:71-80; **2000**.
- [282] YAMADA, A.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; HANAOKA, F. Complementation of defective translesion synthesis and UV light sensitivity in xeroderma pigmentosum variant cells by human and mouse DNA polymerase eta. *Nucleic Acids Res* 28:2473-2480; **2000**.
- [283] NANCE, M. A.; BERRY, S. A. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* 42:68-84; **1992**.
- [284] VAN GOOL, A. J.; VAN DER HORST, G. T.; CITTERIO, E.; HOEIJMAKERS, J. H. Cockayne syndrome: defective repair of transcription? *EMBO J* 16:4155-4162; **1997**.
- [285] BALAJEE, A. S.; MAY, A.; DIANOV, G. L.; FRIEDBERG, E. C.; BOHR, V. A. Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4306-4311; **1997**.
- [286] GIGLIA-MARI, G.; COIN, F.; RANISH, J. A.; HOOGSTRATEN, D.; THEIL, A.; WIJGERS, N.; JASPERS, N. G.; RAAMS, A.; ARGENTINI, M.; VAN DER SPEK, P. J.; BOTTA, E.; STEFANINI, M.; EGLY, J. M.; AEBERSOLD, R.; HOEIJMAKERS, J. H.; VERMEULEN, W. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36:714-719; **2004**.
- [287] WEEDA, G.; EVENO, E.; DONKER, I.; VERMEULEN, W.; CHEVALLIER-LAGENTE, O.; TAIEB, A.; STARY, A.; HOEIJMAKERS, J. H.; MEZZINA, M.; SARASIN, A. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet* 60:320-329; **1997**.
- [288] STEFANINI, M.; LAGOMARSINI, P.; ARLETT, C. F.; MARINONI, S.; BORRONE, C.; CROVATO, F.; TREVISAN, G.; CORDONE, G.; NUZZO, F. Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity. *Hum Genet* 74:107-112; **1986**.
- [289] HASHIMOTO, S.; EGLY, J. M. Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Human Molecular Genetics* 18:R224-R230; **2009**.
- [290] BROWN, T. C.; JIRICNY, J. A specific mismatch repair event protects mammalian cells from loss of 5-methylcytosine. *Cell* 50:945-950; **1987**.
- [291] MACPHERSON, P.; HUMBERT, O.; KARRAN, P. Frameshift mismatch recognition by the human MutS alpha complex. *Mutat Res* 408:55-66; **1998**.
- [292] PALOMBO, F.; IACCARINO, I.; NAKAJIMA, E.; IKEJIMA, M.; SHIMADA, T.; JIRICNY, J. hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* 6:1181-1184; **1996**.
- [293] RADMAN, M.; WAGNER, R. E.; GLICKMAN, B. W.; MESELSON, M. DNA methylation, mismatch correction and genetic stability. *Progress in Environmental Mutagenesis* In M. Alacevic:121-130; **1980**.
- [294] FUKUI, K. DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *Journal of Nucleic Acids* 2010; **2010**.
- [295] KADYROV, F. A.; DZANTIEV, L.; CONSTANTIN, N.; MODRICH, P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair. *Cell* 126:297-308; **2006**.
- [296] MASIH, P. J.; KUNNEV, D.; MELENDY, T. Mismatch Repair proteins are recruited to replicating DNA through interaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Nucleic Acids Research* 36:67-75; **2008**.
- [297] MOLDOVAN, G.-L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* 129:665-679; **2007**.
- [298] GENSCHEL, J.; MODRICH, P. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell* 12:1077-1086; **2003**.

- [299] IYER, R. R.; PLUCIENNIK, A.; BURDETT, V.; MODRICH, P. L. DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chemical Reviews* 106:302-323; **2005**.
- [300] HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 129:391-407; **2008**.
- [301] MODRICH, P.; LAHUE, R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65:101-133; **1996**.
- [302] KOLODNER, R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 10:1433-1442; **1996**.
- [303] LYNCH, H. T.; SCHUELKE, G. S.; KIMBERLING, W. J.; ALBANO, W. A.; LYNCH, J. F.; BISCONE, K. A.; LIPKIN, M. L.; DESCHNER, E. E.; MIKOL, Y. B.; SANDBERG, A. A.; et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). II. Biomarker studies. *Cancer* 56:939-951; **1985**.
- [304] BOLAND, C. R.; THIBODEAU, S. N.; HAMILTON, S. R.; SIDRANSKY, D.; ESHLEMAN, J. R.; BURT, R. W.; MELTZER, S. J.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; FODDE, R.; RANZANI, G. N.; SRIVASTAVA, S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58:5248-5257; **1998**.
- [305] BECKMAN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12:627-631; **1992**.
- [306] DUCKETT, D. R.; DRUMMOND, J. T.; MURCHIE, A. I.; REARDON, J. T.; SANCAR, A.; LILLEY, D. M.; MODRICH, P. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6443-6447; **1996**.
- [307] CECCOTTI, S.; AQUILINA, G.; MACPHERSON, P.; YAMADA, M.; KARRAN, P.; BIGNAMI, M. Processing of O⁶-methylguanine by mismatch correction in human cell extracts. *Curr Biol* 6:1528-1531; **1996**.
- [308] KARRAN, P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22:1931-1937; **2001**.
- [309] BRANCH, P.; AQUILINA, G.; BIGNAMI, M.; KARRAN, P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature* 362:652-654; **1993**.
- [310] CASORELLI, I.; RUSSO, M. T.; BIGNAMI, M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 8:368-380; **2008**.
- [311] LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:776-781; **2003**.
- [312] ADACHI, N.; SUZUKI, H.; IIZUMI, S.; KOYAMA, H. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem* 278:35897-35902; **2003**.
- [313] LIEBER, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181-211; **2010**.
- [314] KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254; **2001**.
- [315] RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature* 407:777-783; **2000**.
- [316] KASS, E. M.; JASIN, M. Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters* 584:3703-3708; **2010**.
- [317] CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R.; BOULTON, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47:497-510; **2012**.
- [318] SZOSTAK, J. W.; ORR-WEAVER, T. L.; ROTHSTEIN, R. J.; STAHL, F. W. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33:25-35; **1983**.

- [319] SONG, B.; SUNG, P. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem* 275:15895-15904; **2000**.
- [320] ESASHI, F.; GALKIN, V. E.; YU, X.; EGELMAN, E. H.; WEST, S. C. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat Struct Mol Biol* 14:468-474; **2007**.
- [321] PARDO, B.; GOMEZ-GONZALEZ, B.; AGUILERA, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 66:1039-1056; **2009**.
- [322] YANEVA, M.; KOWALEWSKI, T.; LIEBER, M. R. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J* 16:5098-5112; **1997**.
- [323] SPAGNOLO, L.; RIVERA-CALZADA, A.; PEARL, L. H.; LLORCA, O. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell* 22:511-519; **2006**.
- [324] MA, Y.; PANNICKE, U.; SCHWARZ, K.; LIEBER, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108:781-794; **2002**.
- [325] GU, J.; LU, H.; TIPPIN, B.; SHIMAZAKI, N.; GOODMAN, M. F.; LIEBER, M. R. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* 26:1010-1023; **2007**.
- [326] JUNG, D.; ALT, F. W. Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. *Cell* 116:299-311; **2004**.
- [327] HIOM, K.; GELLERT, M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell* 88:65-72; **1997**.
- [328] ROTH, D. B.; NAKAJIMA, P. B.; MENETSKI, J. P.; BOSMA, M. J.; GELLERT, M. V(D)J recombination in mouse thymocytes: double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. *Cell* 69:41-53; **1992**.
- [329] ROTHKAMM, K.; KRUGER, I.; THOMPSON, L. H.; LOBRICH, M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706-5715; **2003**.
- [330] TADJOEDIN, M. K.; FRASER, F. C. Heredity of Ataxia-Telangiectasia (Louis-Bar Syndrome). *Am J Dis Child* 110:64-68; **1965**.
- [331] PETERSON, R. D.; FUNKHOUSER, J. D.; TUCK-MULLER, C. M.; GATTI, R. A. Cancer susceptibility in ataxia-telangiectasia. *Leukemia* 6 Suppl 1:8-13; **1992**.
- [332] CUNLIFT, P. N.; MANN, J. R.; CAMERON, A. H.; ROBERTS, K. D.; WARD, H. N. Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* 48:374-376; **1975**.
- [333] DIGWEED, M.; REIS, A.; SPERLING, K. Nijmegen breakage syndrome: consequences of defective DNA double strand break repair. *Bioessays* 21:649-656; **1999**.
- [334] FEATHERSTONE, C.; JACKSON, S. P. DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein. *Curr Biol* 8:R622-625; **1998**.
- [335] GRENON, M.; GILBERT, C.; LOWNDES, N. F. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* 3:844-847; **2001**.
- [336] PAULL, T. T.; LEE, J. H. The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* 4:737-740; **2005**.
- [337] O'DRISCOLL, M.; RUIZ-PEREZ, V. L.; WOODS, C. G.; JEGGO, P. A.; GOODSHIP, J. A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet* 33:497-501; **2003**.
- [338] STEWART, G. S.; MASER, R. S.; STANKOVIC, T.; BRESSAN, D. A.; KAPLAN, M. I.; JASPERS, N. G.; RAAMS, A.; BYRD, P. J.; PETRINI, J. H.; TAYLOR, A. M. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577-587; **1999**.

- [339] HITOMI, K.; IWAI, S.; TAINER, J. A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 6:410-428; **2007**.
- [340] LINDAHL, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:3649-3653; **1974**.
- [341] WILSON, S. H.; KUNKEL, T. A. Passing the baton in base excision repair. *Nat Struct Biol* 7:176-178; **2000**.
- [342] ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* 6:695-711; **2007**.
- [343] BERG, O. G.; WINTER, R. B.; VON HIPPEL, P. H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry* 20:6929-6948; **1981**.
- [344] STIVERS, J. T. Site-specific DNA damage recognition by enzyme-induced base flipping. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 77:37-65; **2004**.
- [345] BANERJEE, A.; SANTOS, W. L.; VERDINE, G. L. Structure of a DNA glycosylase searching for lesions. *Science* 311:1153-1157; **2006**.
- [346] KOOL, E. T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in dna replication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:1-22; **2001**.
- [347] FRIEDMAN, J. I.; STIVERS, J. T. Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes. *Biochemistry* 49:4957-4967; **2010**.
- [348] HUFFMAN, J. L.; SUNDHEIM, O.; TAINER, J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* 577:55-76; **2005**.
- [349] STIVERS, J. T.; JIANG, Y. L. A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem Rev* 103:2729-2759; **2003**.
- [350] MCCULLOUGH, A. K.; DODSON, M. L.; LLOYD, R. S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem* 68:255-285; **1999**.
- [351] DODSON, M. L.; MICHAELS, M. L.; LLOYD, R. S. Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases. *J Biol Chem* 269:32709-32712; **1994**.
- [352] GRIN, I. R.; DIANOV, G. L.; ZHARKOV, D. O. The role of mammalian NEIL1 protein in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroadenine in DNA. *FEBS Letters* 584:1553-1557; **2010**.
- [353] DIZDAROGLU, M.; KARAKAYA, A.; JARUGA, P.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H. E. Novel activities of human uracil DNA N-glycosylase for cytosine-derived products of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 24:418-422; **1996**.
- [354] KAVLI, B.; SUNDHEIM, O.; AKBARI, M.; OTTERLEI, M.; NILSEN, H.; SKORPEN, F.; AAS, P. A.; HAGEN, L.; KROKAN, H. E.; SLUPPHAUG, G. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem* 277:39926-39936; **2002**.
- [355] KROKAN, H. E.; OTTERLEI, M.; NILSEN, H.; KAVLI, B.; SKORPEN, F.; ANDERSEN, S.; SKJELBRED, C.; AKBARI, M.; AAS, P. A.; SLUPPHAUG, G. Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68:365-386; **2001**.
- [356] BOORSTEIN, R. J.; CUMMINGS, A., JR.; MARENSTEIN, D. R.; CHAN, M. K.; MA, Y.; NEUBERT, T. A.; BROWN, S. M.; TEEBOR, G. W. Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* 276:41991-41997; **2001**.
- [357] HAUSHALTER, K. A.; TODD STUKENBERG, M. W.; KIRSCHNER, M. W.; VERDINE, G. L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol* 9:174-185; **1999**.

- [358] NILSEN, H.; HAUSHALTER, K. A.; ROBINS, P.; BARNES, D. E.; VERDINE, G. L.; LINDAHL, T. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 20:4278-4286; **2001**.
- [359] WIBLEY, J. E.; WATERS, T. R.; HAUSHALTER, K.; VERDINE, G. L.; PEARL, L. H. Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol Cell* 11:1647-1659; **2003**.
- [360] HANG, B.; CHENNA, A.; RAO, S.; SINGER, B. 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine are excised by separate human DNA glycosylases. *Carcinogenesis* 17:155-157; **1996**.
- [361] HARDELAND, U.; BENTELE, M.; JIRICNY, J.; SCHAR, P. The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs. *Nucleic Acids Res* 31:2261-2271; **2003**.
- [362] NEDDERMANN, P.; JIRICNY, J. Efficient removal of uracil from G.U mismatches by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1642-1646; **1994**.
- [363] SAPARBAEV, M.; LAVAL, J. 3,N4-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for Escherichia coli double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8508-8513; **1998**.
- [364] CORTELLINO, S.; TURNER, D.; MASCIULLO, V.; SCHEPIS, F.; ALBINO, D.; DANIEL, R.; SKALKA, A. M.; MEROPOL, N. J.; ALBERTI, C.; LARUE, L.; BELLACOSA, A. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15071-15076; **2003**.
- [365] HENDRICH, B.; HARDELAND, U.; NG, H. H.; JIRICNY, J.; BIRD, A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401:301-304; **1999**.
- [366] PETRONZELLI, F.; RICCIO, A.; MARKHAM, G. D.; SEEHOLZER, S. H.; GENUARDI, M.; KARBOWSKI, M.; YEUNG, A. T.; MATSUMOTO, Y.; BELLACOSA, A. Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol* 185:473-480; **2000**.
- [367] TURNER, D. P.; CORTELLINO, S.; SCHUPP, J. E.; CARETTI, E.; LOH, T.; KINSELLA, T. J.; BELLACOSA, A. The DNA N-glycosylase MED1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine. *Cancer Res* 66:7686-7693; **2006**.
- [368] DIZDAROGLU, M. Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531:109-126; **2003**.
- [369] RADICELLA, J. P.; DHERIN, C.; DESMAZE, C.; FOX, M. S.; BOITEUX, S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8010-8015; **1997**.
- [370] TCHOU, J.; KASAI, H.; SHIBUTANI, S.; CHUNG, M. H.; LAVAL, J.; GROLLMAN, A. P.; NISHIMURA, S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4690-4694; **1991**.
- [371] MCGOLDRICK, J. P.; YEH, Y. C.; SOLOMON, M.; ESSIGMANN, J. M.; LU, A. L. Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Mol Cell Biol* 15:989-996; **1995**.
- [372] SLUPSKA, M. M.; BAIKALOV, C.; LUTHER, W. M.; CHIANG, J. H.; WEI, Y. F.; MILLER, J. H. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 178:3885-3892; **1996**.
- [373] ASPINWALL, R.; ROTHWELL, D. G.; ROLDAN-ARJONA, T.; ANSELMINO, C.; WARD, C. J.; CHEADLE, J. P.; SAMPSON, J. R.; LINDAHL, T.; HARRIS, P. C.; HICKSON, I. D. Cloning and characterization of a functional human homolog of Escherichia coli endonuclease III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:109-114; **1997**.

- [374] BREIMER, L. H.; LINDAHL, T. DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 259:5543-5548; **1984**.
- [375] BANDARU, V.; SUNKARA, S.; WALLACE, S. S.; BOND, J. P. A novel human DNA glycosylase that removes oxidative DNA damage and is homologous to *Escherichia coli* endonuclease VIII. *DNA Repair (Amst)* 1:517-529; **2002**.
- [376] ROSENQUIST, T. A.; ZAIKA, E.; FERNANDES, A. S.; ZHARKOV, D. O.; MILLER, H.; GROLLMAN, A. P. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death. *DNA Repair (Amst)* 2:581-591; **2003**.
- [377] TAKAO, M.; KANNO, S.; KOBAYASHI, K.; ZHANG, Q. M.; YONEI, S.; VAN DER HORST, G. T.; YASUI, A. A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue. *J Biol Chem* 277:42205-42213; **2002**.
- [378] HAZRA, T. K.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; IMHOFF, B.; KOW, Y. W.; JARUGA, P.; DIZDAROGLU, M.; MITRA, S. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3523-3528; **2002**.
- [379] HAZRA, T. K.; KOW, Y. W.; HATAHET, Z.; IMHOFF, B.; BOLDOGH, I.; MOKKAPATI, S. K.; MITRA, S.; IZUMI, T. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J Biol Chem* 277:30417-30420; **2002**.
- [380] O'BRIEN, P. J.; ELLENBERGER, T. Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279:9750-9757; **2004**.
- [381] O'CONNOR, T. R.; LAVAL, J. Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun* 176:1170-1177; **1991**.
- [382] SAPARBAEV, M.; KLEIBL, K.; LAVAL, J. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N⁶-ethenoadenine when present in DNA. *Nucleic Acids Res* 23:3750-3755; **1995**.
- [383] SAPARBAEV, M.; LAVAL, J. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5873-5877; **1994**.
- [384] KROKEIDE, S. Z.; LAERDAHL, J. K.; SALAH, M.; LUNA, L.; CEDERKVIST, F. H.; FLEMING, A. M.; BURROWS, C. J.; DALHUS, B.; BJORAS, M. Human NEIL3 is mainly a monofunctional DNA glycosylase removing spiroimidiohydantoin and guanidinohydantoin. *DNA Repair (Amst)*; **2013**.
- [385] LIU, M.; BANDARU, V.; BOND, J. P.; JARUGA, P.; ZHAO, X.; CHRISTOV, P. P.; BURROWS, C. J.; RIZZO, C. J.; DIZDAROGLU, M.; WALLACE, S. S. The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4925-4930; **2010**.
- [386] LIU, M.; BANDARU, V.; HOLMES, A.; AVERILL, A. M.; CANNAN, W.; WALLACE, S. S. Expression and purification of active mouse and human NEIL3 proteins. *Protein Expr Purif* 84:130-139; **2012**.
- [387] BARZILAY, G.; HICKSON, I. D. Structure and function of apurinic/aprimidinic endonucleases. *Bioessays* 17:713-719; **1995**.
- [388] MOL, C. D.; HOSFIELD, D. J.; TAINER, J. A. Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res* 460:211-229; **2000**.
- [389] MATSUMOTO, Y.; KIM, K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269:699-702; **1995**.
- [390] HEGDE, M. L.; HAZRA, T. K.; MITRA, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* 18:27-47; **2008**.

- [391] MEIJER, M.; KARIMI-BUSHERI, F.; HUANG, T. Y.; WEINFELD, M.; YOUNG, D. Pnk1, a DNA kinase/phosphatase required for normal response to DNA damage by gamma-radiation or camptothecin in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277:4050-4055; **2002**.
- [392] WIEDERHOLD, L.; LEPPARD, J. B.; KEDAR, P.; KARIMI-BUSHERI, F.; RASOULI-NIA, A.; WEINFELD, M.; TOMKINSON, A. E.; IZUMI, T.; PRASAD, R.; WILSON, S. H.; MITRA, S.; HAZRA, T. K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* 15:209-220; **2004**.
- [393] DAS, A.; WIEDERHOLD, L.; LEPPARD, J. B.; KEDAR, P.; PRASAD, R.; WANG, H.; BOLDOGH, I.; KARIMI-BUSHERI, F.; WEINFELD, M.; TOMKINSON, A. E.; WILSON, S. H.; MITRA, S.; HAZRA, T. K. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells. *DNA Repair (Amst)* 5:1439-1448; **2006**.
- [394] CALDECOTT, K. W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)* 6:443-453; **2007**.
- [395] BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18:1033-1077; **1995**.
- [396] DEMPTE, B.; DEMOTT, M. S. Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21:8926-8934; **2002**.
- [397] WHITEHOUSE, C. J.; TAYLOR, R. M.; THISTLETHWAITE, A.; ZHANG, H.; KARIMI-BUSHERI, F.; LASKO, D. D.; WEINFELD, M.; CALDECOTT, K. W. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104:107-117; **2001**.
- [398] WINTERS, T. A.; HENNER, W. D.; RUSSELL, P. S.; MCCULLOUGH, A.; JORGENSEN, T. J. Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. *Nucleic Acids Res* 22:1866-1873; **1994**.
- [399] AHEL, I.; RASS, U.; EL-KHAMISY, S. F.; KATYAL, S.; CLEMENTS, P. M.; MCKINNON, P. J.; CALDECOTT, K. W.; WEST, S. C. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* 443:713-716; **2006**.
- [400] RASS, U.; AHEL, I.; WEST, S. C. Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. *J Biol Chem* 282:9469-9474; **2007**.
- [401] INTERTHAL, H.; POULIOT, J. J.; CHAMPOUX, J. J. The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12009-12014; **2001**.
- [402] SCHELLENBERG, M. J.; WILLIAMS, R. S. DNA end processing by polynucleotide kinase/phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20855-20856; **2011**.
- [403] CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9:619-631; **2008**.
- [404] KUBOTA, Y.; NASH, R. A.; KLUNGLAND, A.; SCHAR, P.; BARNES, D. E.; LINDAHL, T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15:6662-6670; **1996**.
- [405] LIU, Y.; BEARD, W. A.; SHOCK, D. D.; PRASAD, R.; HOU, E. W.; WILSON, S. H. DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair. *J Biol Chem* 280:3665-3674; **2005**.
- [406] MATSUMOTO, Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68:129-138; **2001**.
- [407] FORTINI, P.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; SOBOL, R. W.; WILSON, S. H.; DOGLIOTTI, E. Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37:3575-3580; **1998**.
- [408] STUCKI, M.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; FORTINI, P.; WILSON, S. H.; HUBSCHER, U.; DOGLIOTTI, E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17:835-843; **1998**.

- [409] KIM, K.; BIADE, S.; MATSUMOTO, Y. Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* 273:8842-8848; **1998**.
- [410] KLUNGLAND, A.; LINDAHL, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 16:3341-3348; **1997**.
- [411] BALAKRISHNAN, L.; BRANDT, P. D.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; SANCAR, A.; BAMBARA, R. A. Long Patch Base Excision Repair Proceeds via Coordinated Stimulation of the Multienzyme DNA Repair Complex. *Journal of Biological Chemistry* 284:15158-15172; **2009**.
- [412] PASCUCCI, B.; STUCKI, M.; JONSSON, Z. O.; DOGLIOTTI, E.; HUBSCHER, U. Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* 274:33696-33702; **1999**.
- [413] FROSINA, G.; FORTINI, P.; ROSSI, O.; CARROZZINO, F.; RASPAGLIO, G.; COX, L. S.; LANE, D. P.; ABBONDANDOLO, A.; DOGLIOTTI, E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271:9573-9578; **1996**.
- [414] FORTINI, P.; DOGLIOTTI, E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6:398-409; **2007**.
- [415] DAVIET, S.; COUVE-PRIVAT, S.; GROS, L.; SHINOZUKA, K.; IDE, H.; SAPARBAEV, M.; ISHCHENKO, A. A. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway. *DNA Repair (Amst)* 6:8-18; **2007**.
- [416] ISHCHENKO, A. A.; IDE, H.; RAMOTAR, D.; NEVINSKY, G.; SAPARBAEV, M. Alpha-anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases. *Biochemistry* 43:15210-15216; **2004**.
- [417] ZHARKOV, D. O. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci* 65:1544-1565; **2008**.
- [418] D'AMOURS, D.; DESNOYERS, S.; D'SILVA, I.; POIRIER, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2):249-268; **1999**.
- [419] DE MURCIA, G.; SCHREIBER, V.; MOLINETE, M.; SAULIER, B.; POCH, O.; MASSON, M.; NIEDERGANG, C.; MENISSIER DE MURCIA, J. Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 138:15-24; **1994**.
- [420] AME, J. C.; SPENLEHAUER, C.; DE MURCIA, G. The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-893; **2004**.
- [421] KIM, M. Y.; ZHANG, T.; KRAUS, W. L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 19:1951-1967; **2005**.
- [422] CALDECOTT, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2:955-969; **2003**.
- [423] MASSON, M.; NIEDERGANG, C.; SCHREIBER, V.; MULLER, S.; MENISSIER-DE MURCIA, J.; DE MURCIA, G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18:3563-3571; **1998**.
- [424] DAVIDOVIC, L.; VODENICHAROV, M.; AFFAR, E. B.; POIRIER, G. G. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 268:7-13; **2001**.
- [425] AN, Q.; ROBINS, P.; LINDAHL, T.; BARNES, D. E. C → T mutagenesis and gamma-radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases. *EMBO J* 24:2205-2213; **2005**.
- [426] MURAMATSU, M.; KINOSHITA, K.; FAGARASAN, S.; YAMADA, S.; SHINKAI, Y.; HONJO, T. Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* 102:553-563; **2000**.
- [427] KROKAN, H. E.; DRABLOS, F.; SLUPPHAUG, G. Uracil in DNA: occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21:8935-8948; **2002**.

- [428] ANDERSEN, S.; HEINE, T.; SNEVE, R.; KONIG, I.; KROKAN, H. E.; EPE, B.; NILSEN, H. Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 26:547-555; **2005**.
- [429] AUERBACH, P.; BENNETT, R. A.; BAILEY, E. A.; KROKAN, H. E.; DEMPLE, B. Mutagenic specificity of endogenously generated abasic sites in *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17711-17716; **2005**.
- [430] OLSEN, L. C.; AASLAND, R.; WITTEWER, C. U.; KROKAN, H. E.; HELLAND, D. E. Molecular cloning of human uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO J* 8:3121-3125; **1989**.
- [431] PEARL, L. H. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res* 460:165-181; **2000**.
- [432] SLUPPHAUG, G.; EFTEDAL, I.; KAVLI, B.; BHARATI, S.; HELLE, N. M.; HAUG, T.; LEVINE, D. W.; KROKAN, H. E. Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry* 34:128-138; **1995**.
- [433] NAGELHUS, T. A.; SLUPPHAUG, G.; LINDMO, T.; KROKAN, H. E. Cell cycle regulation and subcellular localization of the major human uracil-DNA glycosylase. *Exp Cell Res* 220:292-297; **1995**.
- [434] OTTERLEI, M.; HAUG, T.; NAGELHUS, T. A.; SLUPPHAUG, G.; LINDMO, T.; KROKAN, H. E. Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively. *Nucleic Acids Res* 26:4611-4617; **1998**.
- [435] WATERS, T. R.; GALLINARI, P.; JIRICNY, J.; SWANN, P. F. Human Thymine DNA Glycosylase Binds to Apurinic Sites in DNA but Is Displaced by Human Apurinic Endonuclease 1. *Journal of Biological Chemistry* 274:67-74; **1999**.
- [436] NILSEN, H.; ROSEWELL, I.; ROBINS, P.; SKJELBRED, C. F.; ANDERSEN, S.; SLUPPHAUG, G.; DALY, G.; KROKAN, H. E.; LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell* 5:1059-1065; **2000**.
- [437] OTTERLEI, M.; KAVLI, B.; STANDAL, R.; SKJELBRED, C.; BHARATI, S.; KROKAN, H. E. Repair of chromosomal abasic sites in vivo involves at least three different repair pathways. *EMBO J* 19:5542-5551; **2000**.
- [438] FISCHER, F.; BAERENFALLER, K.; JIRICNY, J. 5-Fluorouracil Is Efficiently Removed From DNA by the Base Excision and Mismatch Repair Systems. *Gastroenterology* 133:1858-1868; **2007**.
- [439] PETTERSEN, H. S.; VISNES, T.; VÅGBØ, C. B.; SVAASAND, E. K.; DOSETH, B.; SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Research*; **2011**.
- [440] CORTAZAR, D.; KUNZ, C.; SAITO, Y.; STEINACHER, R.; SCHÄR, P. The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair* 6:489-504; **2007**.
- [441] KLUNGLAND, A.; BJELLAND, S. Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)* 6:481-488; **2007**.
- [442] LOFT, S.; SVOBODA, P.; KAWAI, K.; KASAI, H.; SØRENSEN, M.; TJØNNELAND, A.; VOGEL, U.; MØLLER, P.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O. Association between 8-oxo-7,8-dihydroguanine excretion and risk of lung cancer in a prospective study. *Free Radical Biology and Medicine*; **2011**.
- [443] SHIBUTANI, S.; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:431-434; **1991**.
- [444] OBER, M.; LINNE, U.; GIERLICH, J.; CARELL, T. The two main DNA lesions 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine exhibit strongly different pairing properties. *Angew Chem Int Ed Engl* 42:4947-4951; **2003**.

- [445] MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *Journal of Bacteriology* 174:6321-6325; **1992**.
- [446] CASTAING, B.; GEIGER, A.; SELIGER, H.; NEHLS, P.; LAVAL, J.; ZELWER, C.; BOITEUX, S. Cleavage and binding of a DNA fragment **containing** a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. *Nucleic Acids Res* 21:2899-2905; 1993.
- [447] TCHOU, J.; MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H.; GROLLMAN, A. P. Function of the zinc finger in Escherichia coli Fpg protein. *J Biol Chem* 268:26738-26744; **1993**.
- [448] GASPARUTTO, D.; BOURDAT, A.-G. L.; D'HAM, C. D.; DUARTE, V.; ROMIEU, A.; CADET, J. Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides. *Biochimie* 82:19-24; **2000**.
- [449] AU, K. G.; CLARK, S.; MILLER, J. H.; MODRICH, P. Escherichia coli mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8877-8881; **1989**.
- [450] MAKI, H.; SEKIGUCHI, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355:273-275; **1992**.
- [451] DENVER, D. R.; SWENSON, S. L.; LYNCH, M. An evolutionary analysis of the helix-hairpin-helix superfamily of DNA repair glycosylases. *Mol Biol Evol* 20:1603-1611; **2003**.
- [452] DOHERTY, A. J.; SERPELL, L. C.; PONTING, C. P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res* 24:2488-2497; **1996**.
- [453] BRUNER, S. D.; NORMAN, D. P.; VERDINE, G. L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403:859-866; **2000**.
- [454] ASAGOSHI, K.; YAMADA, T.; TERATO, H.; OHYAMA, Y.; IDE, H. Enzymatic properties of Escherichia coli and human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylases. *Nucleic Acids Symp Ser*:11-12; **2000**.
- [455] NORMAN, D. P.; CHUNG, S. J.; VERDINE, G. L. Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase. *Biochemistry* 42:1564-1572; **2003**.
- [456] DALHUS, B.; FORSBRING, M.; HELLE, I. H.; VIK, E. S.; FORSTROM, R. J.; BACKE, P. H.; ALSETH, I.; BJORAS, M. Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Structure* 19:117-127; **2011**.
- [457] VIDAL, A. E.; HICKSON, I. D.; BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* 29:1285-1292; **2001**.
- [458] HILL, J. W.; HAZRA, T. K.; IZUMI, T.; MITRA, S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Research* 29:430-438; **2001**.
- [459] MITRA, S.; IZUMI, T.; BOLDOGH, I.; BHAKAT, K. K.; HILL, J. W.; HAZRA, T. K. Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic Biol Med* 33:15-28; **2002**.
- [460] NISHIOKA, K.; OHTSUBO, T.; ODA, H.; FUJIWARA, T.; KANG, D.; SUGIMACHI, K.; NAKABEPPU, Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10:1637-1652; **1999**.
- [461] MARKKANEN, E.; DORN, J.; HUBSCHER, U. MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Front Genet* 4:18; **2013**.
- [462] FROMME, J. C.; BANERJEE, A.; HUANG, S. J.; VERDINE, G. L. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* 427:652-656; **2004**.

- [463] NOLL, D. M.; GOGOS, A.; GRANEK, J. A.; CLARKE, N. D. The C-terminal domain of the adenine-DNA glycosylase MutY confers specificity for 8-oxoguanine. adenine mispairs and may have evolved from MutT, an 8-oxo-dGTPase. *Biochemistry* 38:6374-6379; **1999**.
- [464] KRAHN, J. M.; BEARD, W. A.; MILLER, H.; GROLLMAN, A. P.; WILSON, S. H. Structure of DNA polymerase beta with the mutagenic DNA lesion 8-oxodeoxyguanine reveals structural insights into its coding potential. *Structure* 11:121-127; **2003**.
- [465] FUJIKAWA, K.; KAMIYA, H.; YAKUSHIJI, H.; FUJII, Y.; NAKABEPPU, Y.; KASAI, H. The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J Biol Chem* 274:18201-18205; **1999**.
- [466] LEE, C. Y.; DELANEY, J. C.; KARTALOU, M.; LINGARAJU, G. M.; MAOR-SHOSHANI, A.; ESSIGMANN, J. M.; SAMSON, L. D. Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG). *Biochemistry* 48:1850-1861; **2009**.
- [467] LAU, A. Y.; SCHARER, O. D.; SAMSON, L.; VERDINE, G. L.; ELLENBERGER, T. Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell* 95:249-258; **1998**.
- [468] LAU, A. Y.; WYATT, M. D.; GLASSNER, B. J.; SAMSON, L. D.; ELLENBERGER, T. Molecular basis for discriminating between normal and damaged bases by the human alkyladenine glycosylase, AAG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13573-13578; **2000**.
- [469] CONNOR, E. E.; WYATT, M. D. Active-site clashes prevent the human 3-methyladenine DNA glycosylase from improperly removing bases. *Chem Biol* 9:1033-1041; **2002**.
- [470] BALDWIN, M. R.; O'BRIEN, P. J. Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* 48:6022-6033; **2009**.
- [471] GROMBACHER, T.; KAINA, B. Isolation and analysis of inducibility of the rat N-methylpurine-DNA glycosylase promoter. *DNA Cell Biol* 15:581-588; **1996**.
- [472] LEFEBVRE, P.; ZAK, P.; LAVAL, F. Induction of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase and N3-methyladenine-DNA-glycosylase in human cells exposed to DNA-damaging agents. *DNA Cell Biol* 12:233-241; **1993**.
- [473] CALLEJA, F.; JANSEN, J. G.; VRIELING, H.; LAVAL, F.; VAN ZEELAND, A. A. Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase. *Mutat Res* 425:185-194; **1999**.
- [474] TRIVEDI, R. N.; WANG, X. H.; JELEZCOVA, E.; GOELLNER, E. M.; TANG, J. B.; SOBOL, R. W. Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide. *Mol Pharmacol* 74:505-516; **2008**.
- [475] ENGELWARD, B. P.; WEEDA, G.; WYATT, M. D.; BROEKHOF, J. L.; DE WIT, J.; DONKER, I.; ALLAN, J. M.; GOLD, B.; HOEIJMAKERS, J. H.; SAMSON, L. D. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13087-13092; **1997**.
- [476] ROTH, R. B.; SAMSON, L. D. 3-Methyladenine DNA glycosylase-deficient Aag null mice display unexpected bone marrow alkylation resistance. *Cancer Res* 62:656-660; **2002**.
- [477] BOUZIANE, M.; MIAO, F.; BATES, S. E.; SOMSOUK, L.; SANG, B.-C.; DENISSENKO, M.; O'CONNOR, T. R. Promoter structure and cell cycle dependent expression of the human methylpurine-DNA glycosylase gene. *Mutation Research/DNA Repair* 461:15-29; **2000**.
- [478] BERDAL, K. G.; JOHANSEN, R. F.; SEEBERG, E. Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme. *EMBO J* 17:363-367; **1998**.
- [479] DEMPSEY, B.; HARRISON, L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63:915-948; **1994**.

- [480] DEMPTE, B.; HERMAN, T.; CHEN, D. S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11450-11454; **1991**.
- [481] ROBSON, C. N.; HOCHHAUSER, D.; CRAIG, R.; RACK, K.; BUCKLE, V. J.; HICKSON, I. D. Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res* 20:4417-4421; **1992**.
- [482] SEKI, S.; IKEDA, S.; WATANABE, S.; HATSUSHIKA, M.; TSUTSUI, K.; AKIYAMA, K.; ZHANG, B. A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/aprimidinic endonuclease activities: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1079:57-64; **1991**.
- [483] XANTHOUDAKIS, S.; CURRAN, T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J* 11:653-665; **1992**.
- [484] GORMAN, M. A.; MORERA, S.; ROTHWELL, D. G.; DE LA FORTELLE, E.; MOL, C. D.; TAINER, J. A.; HICKSON, I. D.; FREEMONT, P. S. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J* 16:6548-6558; **1997**.
- [485] FUNG, H.; DEMPTE, B. A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell* 17:463-470; **2005**.
- [486] IZUMI, T.; HAZRA, T. K.; BOLDOGH, I.; TOMKINSON, A. E.; PARK, M. S.; IKEDA, S.; MITRA, S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 21:1329-1334; **2000**.
- [487] SUH, D.; WILSON, D. M., 3RD; POVIRK, L. F. 3'-phosphodiesterase activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends. *Nucleic Acids Res* 25:2495-2500; **1997**.
- [488] MOL, C. D.; IZUMI, T.; MITRA, S.; TAINER, J. A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected]. *Nature* 403:451-456; **2000**.
- [489] ERZBERGER, J. P.; WILSON, D. M., 3RD. The role of Mg²⁺ and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: new insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis. *J Mol Biol* 290:447-457; **1999**.
- [490] PARIKH, S. S.; MOL, C. D.; SLUPPHAUG, G.; BHARATI, S.; KROKAN, H. E.; TAINER, J. A. Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA. *EMBO J* 17:5214-5226; **1998**.
- [491] BALDWIN, M. R.; O'BRIEN, P. J. Nonspecific DNA binding and coordination of the first two steps of base excision repair. *Biochemistry* 49:7879-7891; **2010**.
- [492] CALDECOTT, K. W.; MCKEOWN, C. K.; TUCKER, J. D.; LJUNGQUIST, S.; THOMPSON, L. H. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol* 14:68-76; **1994**.
- [493] PARIKH, S. S.; MOL, C. D.; HOSFIELD, D. J.; TAINER, J. A. Envisioning the molecular choreography of DNA base excision repair. *Curr Opin Struct Biol* 9:37-47; **1999**.
- [494] FUNG, H.; BENNETT, R. A.; DEMPTE, B. Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 276:42011-42017; **2001**.
- [495] GROSCH, S.; FRITZ, G.; KAINA, B. Apurinic endonuclease (Ref-1) is induced in mammalian cells by oxidative stress and involved in clastogenic adaptation. *Cancer Res* 58:4410-4416; **1998**.
- [496] RAMANA, C. V.; BOLDOGH, I.; IZUMI, T.; MITRA, S. Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5061-5066; **1998**.
- [497] TELL, G.; FANTINI, D.; QUADRIFOGLIO, F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 67:3589-3608; **2010**.

- [498] KUNINGER, D. T.; IZUMI, T.; PAPAConstantinou, J.; MITRA, S. Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. *Nucleic Acids Res* 30:823-829; **2002**.
- [499] IZUMI, T.; HENNER, W. D.; MITRA, S. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry* 35:14679-14683; **1996**.
- [500] HADI, M. Z.; GINALSKI, K.; NGUYEN, L. H.; WILSON, D. M., 3RD. Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of Escherichia coli exonuclease III. *J Mol Biol* 316:853-866; **2002**.
- [501] BURKOVICS, P.; HAJDU, I.; SZUKACSOV, V.; UNK, I.; HARACSKA, L. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3' 5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* 37:4247-4255; **2009**.
- [502] BURKOVICS, P.; SZUKACSOV, V.; UNK, I.; HARACSKA, L. Human Ape2 protein has a 3' 5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Research* 34:2508-2515; **2006**.
- [503] KELLEY, M. R.; GEORGIADIS, M. M.; FISHEL, M. L. APE1/Ref-1 role in redox signaling: translational applications of targeting the redox function of the DNA repair/redox protein APE1/Ref-1. *Curr Mol Pharmacol* 5:36-53; **2012**.
- [504] TELL, G.; QUADRIFOGLIO, F.; TIRIBELLI, C.; KELLEY, M. R. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid Redox Signal* 11:601-620; **2009**.
- [505] GAIDDON, C.; MOORTHY, N. C.; PRIVES, C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J* 18:5609-5621; **1999**.
- [506] JAYARAMAN, L.; MURTHY, K. G.; ZHU, C.; CURRAN, T.; XANTHOUDAKIS, S.; PRIVES, C. Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 11:558-570; **1997**.
- [507] NISHI, T.; SHIMIZU, N.; HIRAMOTO, M.; SATO, I.; YAMAGUCHI, Y.; HASEGAWA, M.; AIZAWA, S.; TANAKA, H.; KATAOKA, K.; WATANABE, H.; HANDA, H. Spatial redox regulation of a critical cysteine residue of NF-kappa B in vivo. *J Biol Chem* 277:44548-44556; **2002**.
- [508] CONTICELLO, S. G.; THOMAS, C. J.; PETERSEN-MAHRT, S. K.; NEUBERGER, M. S. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* 22:367-377; **2005**.
- [509] CHELICO, L.; PROCHNOW, C.; ERIE, D. A.; CHEN, X. S.; GOODMAN, M. F. Structural model for deoxycytidine deamination mechanisms of the HIV-1 inactivation enzyme APOBEC3G. *J Biol Chem* 285:16195-16205; **2010**.
- [510] YANG, B.; CHEN, K.; ZHANG, C.; HUANG, S.; ZHANG, H. Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/aprimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* 282:11667-11675; **2007**.
- [511] SCHROFELBAUER, B.; YU, Q.; ZEITLIN, S. G.; LANDAU, N. R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J Virol* 79:10978-10987; **2005**.
- [512] BASSING, C. H.; SWAT, W.; ALT, F. W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl:S45-55; **2002**.
- [513] MANIS, J. P.; TIAN, M.; ALT, F. W. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends in Immunology* 23:31-39; **2002**.
- [514] XU, Z.; ZAN, H.; PONE, E. J.; MAI, T.; CASALI, P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 12:517-531; **2012**.
- [515] STAVNEZER, J.; SCHRADER, C. E. Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends in Genetics* 22:23-28; **2006**.

- [516] DI NOIA, J.; NEUBERGER, M. S. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature* 419:43-48; **2002**.
- [517] IMAI, K.; SLUPPHAUG, G.; LEE, W. I.; REVY, P.; NONOYAMA, S.; CATALAN, N.; YEL, L.; FORVEILLE, M.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E.; OCHS, H. D.; FISCHER, A.; DURANDY, A. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4:1023-1028; **2003**.
- [518] RADA, C.; WILLIAMS, G. T.; NILSEN, H.; BARNES, D. E.; LINDAHL, T.; NEUBERGER, M. S. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12:1748-1755; **2002**.
- [519] DAVIES, E. G.; THRASHER, A. J. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *British Journal of Haematology* 149:167-180; **2010**.
- [520] DURANDY, A. Mini-review Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *European Journal of Immunology* 33:2069-2073; **2003**.
- [521] LONGERICH, S.; BASU, U.; ALT, F.; STORB, U. AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Current Opinion in Immunology* 18:164-174; **2006**.
- [522] PEREZ-DURAN, P.; BELVER, L.; DE YEBENES, V. G.; DELGADO, P.; PISANO, D. G.; RAMIRO, A. R. UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J Exp Med*; **2012**.
- [523] JACOBS, A.; SCHARER, P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*:1-20; **2011**.
- [524] REVY, P.; MUTO, T.; LEVY, Y.; GEISSMANN, F. D. R.; PLEBANI, A.; SANAL, O.; CATALAN, N.; FORVEILLE, M.; DUFOURCQ-LAGELOUSE, R. M.; GENNERY, A.; TEZCAN, I.; ERSOY, F.; KAYSERILI, H.; UGAZIO, A. G.; BROUSSE, N.; MURAMATSU, M.; NOTARANGELO, L. D.; KINOSHITA, K.; HONJO, T.; FISCHER, A.; DURANDY, A. Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell* 102:565-575; **2000**.
- [525] HOTCHKISS, R. D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J Biol Chem* 175:315-332; **1948**.
- [526] BIRD, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321:209-213; **1986**.
- [527] RAZIN, A.; RIGGS, A. D. DNA methylation and gene function. *Science (New York, N.Y.)* 210:604-610; **1980**.
- [528] JONES, P. A.; TAKAI, D. The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science* 293:1068-1070; **2001**.
- [529] KASS, S. U.; PRUSS, D.; WOLFFE, A. P. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 13:444-449; **1997**.
- [530] WU, S. C.; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:607-620; **2010**.
- [531] BHUTANI, N.; BRADY, J. J.; DAMIAN, M.; SACCO, A.; CORBEL, S. Y.; BLAU, H. M. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463:1042-1047; **2010**.
- [532] POPP, C.; DEAN, W.; FENG, S.; COKUS, S. J.; ANDREWS, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463:1101-1105; **2010**.
- [533] CORTAZAR, D.; KUNZ, C.; SELFRIDGE, J.; LETTIERI, T.; SAITO, Y.; MACDOUGALL, E.; WIRZ, A.; SCHUERMANN, D.; JACOBS, A. L.; SIEGRIST, F.; STEINACHER, R.; JIRICNY, J.; BIRD, A.; SCHAR, P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 470:419-423; **2011**.
- [534] TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930-935; **2009**.

- [535] DAHL, C.; GRONBAEK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta* 412:831-836; **2011**.
- [536] ITO, S.; SHEN, L.; DAI, Q.; WU, S. C.; COLLINS, L. B.; SWENBERG, J. A.; HE, C.; ZHANG, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300-1303; **2011**.
- [537] HE, Y. F.; LI, B. Z.; LI, Z.; LIU, P.; WANG, Y.; TANG, Q.; DING, J.; JIA, Y.; CHEN, Z.; LI, L.; SUN, Y.; LI, X.; DAI, Q.; SONG, C. X.; ZHANG, K.; HE, C.; XU, G. L. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333:1303-1307; **2011**.
- [538] MAITI, A.; DROHAT, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286:35334-35338; **2011**.
- [539] RUSMINTRATIP, V.; SOWERS, L. C. An unexpectedly high excision capacity for mispaired 5-hydroxymethyluracil in human cell extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14183-14187; **2000**.
- [540] CORTELLINO, S.; XU, J.; SANNAI, M.; MOORE, R.; CARETTI, E.; CIGLIANO, A.; LE COZ, M.; DEVARAJAN, K.; WESSELS, A.; SOPRANO, D.; ABRAMOWITZ, L. K.; BARTOLOMEI, M. S.; RAMBOW, F.; BASSI, M. R.; BRUNO, T.; FANCIULLI, M.; RENNER, C.; KLEIN-SZANTO, A. J.; MATSUMOTO, Y.; KOBİ, D.; DAVIDSON, I.; ALBERTI, C.; LARUE, L.; BELLACOSA, A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146:67-79; **2011**.
- [541] WILSON, D. M.; THOMPSON, L. H. Life without DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:12754-12757; **1997**.
- [542] FRIEDBERG, E. C.; MEIRA, L. B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage (Version 6). *DNA Repair (Amst)* 3:1617-1638; **2004**.
- [543] KAVLI, B.; ANDERSEN, S.; OTTERLEI, M.; LIABAKK, N. B.; IMAI, K.; FISCHER, A.; DURANDY, A.; KROKAN, H. E.; SLUPPHAUG, G. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J Exp Med* 201:2011-2021; **2005**.
- [544] ROLIG, R. L.; MCKINNON, P. J. Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 23:417-424; **2000**.
- [545] FISHEL, M. L.; VASKO, M. R.; KELLEY, M. R. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat Res* 614:24-36; **2007**.
- [546] DATE, H.; ONODERA, O.; TANAKA, H.; IWABUCHI, K.; UEKAWA, K.; IGARASHI, S.; KOIKE, R.; HIROI, T.; YUASA, T.; AWAYA, Y.; SAKAI, T.; TAKAHASHI, T.; NAGATOMO, H.; SEKIJIMA, Y.; KAWACHI, I.; TAKIYAMA, Y.; NISHIZAWA, M.; FUKUHARA, N.; SAITO, K.; SUGANO, S.; TSUJI, S. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 29:184-188; **2001**.
- [547] MOREIRA, M. C.; BARBOT, C.; TACHI, N.; KOZUKA, N.; UCHIDA, E.; GIBSON, T.; MENDONCA, P.; COSTA, M.; BARROS, J.; YANAGISAWA, T.; WATANABE, M.; IKEDA, Y.; AOKI, M.; NAGATA, T.; COUTINHO, P.; SEQUEIROS, J.; KOENIG, M. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29:189-193; **2001**.
- [548] TAKASHIMA, H.; BOERKOEL, C. F.; JOHN, J.; SAIFI, G. M.; SALIH, M. A.; ARMSTRONG, D.; MAO, Y.; QUIOCHO, F. A.; ROA, B. B.; NAKAGAWA, M.; STOCKTON, D. W.; LUPSKI, J. R. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32:267-272; **2002**.
- [549] EL-KHAMISY, S. F.; SAIFI, G. M.; WEINFELD, M.; JOHANSSON, F.; HELLEDAY, T.; LUPSKI, J. R.; CALDECOTT, K. W. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* 434:108-113; **2005**.
- [550] SHEN, J.; GILMORE, E. C.; MARSHALL, C. A.; HADDADIN, M.; REYNOLDS, J. J.; EYALD, W.; BODELL, A.; BARRY, B.; GLEASON, D.; ALLEN, K.; GANESH, V. S.; CHANG, B. S.; GRIX, A.; HILL, R. S.; TOPCU, M.; CALDECOTT, K. W.;

- BARKOVICH, A. J.; WALSH, C. A. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet* 42:245-249; **2010**.
- [551] WILSON, D. M., 3RD; KIM, D.; BERQUIST, B. R.; SIGURDSON, A. J. Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res* 711:100-112; **2011**.
- [552] GABBITA, S. P.; LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71:2034-2040; **1998**.
- [553] MARKESBERY, W. R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134-147; **1997**.
- [554] WANG, J.; XIONG, S.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R.; LOVELL, M. A. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93:953-962; **2005**.
- [555] MAO, G.; PAN, X.; ZHU, B. B.; ZHANG, Y.; YUAN, F.; HUANG, J.; LOVELL, M. A.; LEE, M. P.; MARKESBERY, W. R.; LI, G. M.; GU, L. Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 35:2759-2766; **2007**.
- [556] LOPEZ-LAZARO, M. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* 16:144-153; **2009**.
- [557] NORDLING, C. O. A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer* 7:68-72; **1953**.
- [558] WALLACE, S. S.; MURPHY, D. L.; SWEASY, J. B. Base excision repair and cancer. *Cancer Letters* 327:73-89; **2011**.
- [559] AL-TASSAN, N.; CHMIEL, N. H.; MAYNARD, J.; FLEMING, N.; LIVINGSTON, A. L.; WILLIAMS, G. T.; HODGES, A. K.; DAVIES, D. R.; DAVID, S. S.; SAMPSON, J. R.; CHEADLE, J. P. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30:227-232; **2002**.
- [560] JONES, S.; EMMERSON, P.; MAYNARD, J.; BEST, J. M.; JORDAN, S.; WILLIAMS, G. T.; SAMPSON, J. R.; CHEADLE, J. P. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 11:2961-2967; **2002**.
- [561] DUNLOP, M. G.; FARRINGTON, S. M. MUTYH-associated polyposis and colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 18:599-610; **2009**.
- [562] SAMPSON, J. R.; JONES, N. MUTYH-associated polyposis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 23:209-218; **2009**.
- [563] CHMIEL, N. H.; LIVINGSTON, A. L.; DAVID, S. S. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated E.coli enzymes. *J Mol Biol* 327:431-443; **2003**.
- [564] WEISS, J. M.; GOODE, E. L.; LADIGES, W. C.; ULRICH, C. M. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 42:127-141; **2005**.
- [565] HUNG, R. J.; HALL, J.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162:925-942; **2005**.
- [566] KIM, J. I.; PARK, Y. J.; KIM, K. H.; SONG, B. J.; LEE, M. S.; KIM, C. N.; CHANG, S. H. hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol* 9:956-960; **2003**.
- [567] XING, D. Y.; TAN, W.; SONG, N.; LIN, D. X. Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer* 95:140-143; **2001**.
- [568] BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377:1-8; **2000**.
- [569] GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:1513-1530; **2002**.

- [570] AUDEBERT, M.; RADICELLA, J. P.; DIZDAROGLU, M. Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res* 28:2672-2678; **2000**.
- [571] JI, Y. N.; ZHAN, P.; WANG, J.; QIU, L. X.; YU, L. K. APE1 Asp148Glu gene polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 38:4537-4543; **2011**.
- [572] AN, Q.; ROBINS, P.; LINDAHL, T.; BARNES, D. E. 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the Smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. *Cancer Res* 67:940-945; **2007**.
- [573] KUNZ, C.; FOCKE, F.; SAITO, Y.; SCHUERMAN, D.; LETTIERI, T.; SELFRIDGE, J.; SCHAR, P. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol* 7:e91; **2009**.
- [574] KOBUNE, M.; XU, Y.; BAUM, C.; KELLEY, M. R.; WILLIAMS, D. A. Retrovirus-mediated expression of the base excision repair proteins, formamidopyrimidine DNA glycosylase or human oxoguanine DNA glycosylase, protects hematopoietic cells from N,N',N"-triethylenethiophosphoramidate (thioTEPA)-induced toxicity in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61:5116-5125; **2001**.
- [575] TUDEK, B. Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance. *J Biochem Mol Biol* 36:12-19; **2003**.
- [576] PRESTON, T. J.; HENDERSON, J. T.; MCCALLUM, G. P.; WELLS, P. G. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 8:2015-2026; **2009**.
- [577] UETA, E.; SASABE, E.; YANG, Z.; OSAKI, T.; YAMAMOTO, T. Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. *Cancer Sci*. 2008 Nov;99(11):2230-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00918.x. Epub 2008 Sep 22.; **2008**.
- [578] WU, M.; ZHANG, Z.; CHE, W. Suppression of a DNA base excision repair gene, hOGG1, increases bleomycin sensitivity of human lung cancer cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 228:395-402; **2008**.
- [579] AGNIHOTRI, S.; GAJADHAR, A. S.; TERNAMIAN, C.; GORLIA, T.; DIEFES, K. L.; MISCHEL, P. S.; KELLY, J.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; CARLSON, B. L.; SARKARIA, J. N.; MARGISON, G. P.; ALDAPE, K.; HAWKINS, C.; HEGI, M.; GUHA, A. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest*; **2012**.
- [580] BOBOLA, M. S.; VARADARAJAN, S.; SMITH, N. W.; GOFF, R. D.; KOLSTOE, D. D.; BLANK, A.; GOLD, B.; SILBER, J. R. Human glioma cell sensitivity to the sequence-specific alkylating agent methyl-lexitropsin. *Clin Cancer Res* 13:612-620; **2007**.
- [581] ENGELWARD, B. P.; DRESLIN, A.; CHRISTENSEN, J.; HUSZAR, D.; KURAHARA, C.; SAMSON, L. Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. *EMBO J* 15:945-952; **1996**.
- [582] PAIK, J.; DUNCAN, T.; LINDAHL, T.; SEDGWICK, B. Sensitization of human carcinoma cells to alkylating agents by small interfering RNA suppression of 3-alkyladenine-DNA glycosylase. *Cancer Res* 65:10472-10477; **2005**.
- [583] HARRISON, J. F.; RINNE, M. L.; KELLEY, M. R.; DRUZHYNIA, N. M.; WILSON, G. L.; LEDOUX, S. P. Altering DNA base excision repair: Use of nuclear and mitochondrial-targeted N-methylpurine DNA glycosylase to sensitize astroglia to chemotherapeutic agents. *Glia* 55:1416-1425; **2007**.
- [584] RINNE, M.; CALDWELL, D.; KELLEY, M. R. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3:955-967; **2004**.

- [585] RINNE, M. L.; HE, Y.; PACHKOWSKI, B. F.; NAKAMURA, J.; KELLEY, M. R. N-methylpurine DNA glycosylase overexpression increases alkylation sensitivity by rapidly removing non-toxic 7-methylguanine adducts. *Nucleic Acids Res* 33:2859-2867; **2005**.
- [586] TRIVEDI, R. N.; ALMEIDA, K. H.; FORNSAGLIO, J. L.; SCHAMUS, S.; SOBOL, R. W. The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res* 65:6394-6400; **2005**.
- [587] KIM, Y. J.; WILSON, D. M., 3RD. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol* 5:3-13; **2012**.
- [588] WANG, D.; LUO, M.; KELLEY, M. R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther* 3:679-686; **2004**.
- [589] SILBER, J. R.; BOBOLA, M. S.; BLANK, A.; SCHOELER, K. D.; HAROLDSON, P. D.; HUYNH, M. B.; KOLSTOE, D. D. The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress. *Clin Cancer Res* 8:3008-3018; **2002**.
- [590] LAM, W.; PARK, S. Y.; LEUNG, C. H.; CHENG, Y. C. Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 protein level is associated with the cytotoxicity of L-configuration deoxycytidine analogs (troxacitabine and beta-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine) but not D-configuration deoxycytidine analogs (gemcitabine and beta-D-arabinofuranosylcytosine). *Mol Pharmacol* 69:1607-1614; **2006**.
- [591] BOBOLA, M. S.; FINN, L. S.; ELLENBOGEN, R. G.; GEYER, J. R.; BERGER, M. S.; BRAGA, J. M.; MEADE, E. H.; GROSS, M. E.; SILBER, J. R. Apurinic/apyrimidinic endonuclease activity is associated with response to radiation and chemotherapy in medulloblastoma and primitive neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res* 11:7405-7414; **2005**.
- [592] MCNEILL, D. R.; LAM, W.; DEWEESE, T. L.; CHENG, Y. C.; WILSON, D. M., 3RD. Impairment of APE1 function enhances cellular sensitivity to clinically relevant alkylators and antimetabolites. *Mol Cancer Res* 7:897-906; **2009**.
- [593] MADHUSUDAN, S.; SMART, F.; SHRIMPTON, P.; PARSONS, J. L.; GARDINER, L.; HOULBROOK, S.; TALBOT, D. C.; HAMMONDS, T.; FREEMONT, P. A.; STERNBERG, M. J. E.; DIANOV, G. L.; HICKSON, I. D. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Research* 33:4711-4724; **2005**.
- [594] SEO, Y.; KINSELLA, T. J. Essential role of DNA base excision repair on survival in an acidic tumor microenvironment. *Cancer Res* 69:7285-7293; **2009**.
- [595] LIUZZI, M.; WEINFELD, M.; PATERSON, M. C. Selective inhibition by methoxyamine of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity associated with pyrimidine dimer-DNA glycosylases from *Micrococcus luteus* and bacteriophage T4. *Biochemistry* 26:3315-3321; **1987**.
- [596] ROSA, S.; FORTINI, P.; KARRAN, P.; BIGNAMI, M.; DOGLIOTTI, E. Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo. *Nucleic Acids Res* 19:5569-5574; **1991**.
- [597] FISHEL, M. L.; HE, Y.; SMITH, M. L.; KELLEY, M. R. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. *Clin Cancer Res* 13:260-267; **2007**.
- [598] TAVERNA, P.; HWANG, H. S.; SCHUPP, J. E.; RADIVOYEVITCH, T.; SESSION, N. N.; REDDY, G.; ZARLING, D. A.; KINSELLA, T. J. Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Res* 63:838-846; **2003**.
- [599] TAVERNA, P.; LIU, L.; HWANG, H. S.; HANSON, A. J.; KINSELLA, T. J.; GERSON, S. L. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. *Mutat Res* 485:269-281; **2001**.
- [600] LIU, L.; NAKATSURU, Y.; GERSON, S. L. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res* 8:2985-2991; **2002**.

- [601] WILSON, D. M., 3RD; Simeonov, A. Small molecule inhibitors of DNA repair nuclease activities of APE1. *Cell Mol Life Sci* 67:3621-3631; **2010**.
- [602] LUO, M.; KELLEY, M. R. Inhibition of the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. *Anticancer Res* 24:2127-2134; **2004**.
- [603] NAIDU, M. D.; AGARWAL, R.; PENA, L. A.; Cunha, L.; Mezei, M.; Shen, M.; Wilson, D. M., III; Liu, Y.; Sanchez, Z.; Chaudhary, P.; Wilson, S. H.; Waring, M. J. Lucanthone and Its Derivative Hycanthone Inhibit Apurinic Endonuclease-1 (APE1) by Direct Protein Binding. *PLoS One* 6:e23679; **2011**.
- [604] TENTORI, L.; LEONETTI, C.; SCARSELLA, M.; D'AMATI, G.; PORTARENA, I.; ZUPI, G.; Bonmassar, E.; Graziani, G. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* 99:2241-2244; **2002**.
- [605] CURTIN, N. J.; WANG, L. Z.; YIAKOUVAKI, A.; KYLE, S.; ARRIS, C. A.; CANAN-KOCH, S.; WEBBER, S. E.; DURKACZ, B. W.; CALVERT, H. A.; HOSTOMSKY, Z.; NEWELL, D. R. Novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, AG14361, restores sensitivity to temozolomide in mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 10:881-889; **2004**.
- [606] HELLEDAY, T.; PETERMANN, E.; LUNDIN, C.; HODGSON, B.; SHARMA, R. A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8:193-204; **2008**.
- [607] JAGTAP, P.; SZABO, C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 4:421-440; **2005**.
- [608] JAVLE, M.; CURTIN, N. J. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* 105:1114-1122; **2011**.
- [609] SHARMA, R. A.; DIANOV, G. L. Targeting base excision repair to improve cancer therapies. *Molecular Aspects of Medicine* 28:345-374; **2007**.
- [610] SAMEER, A. S.; NISSAR, S.; ABDULLAH, S.; CHOWDRI, N. A.; SIDDIQI, M. A. DNA Repair Gene 8-Oxoguanine DNA Glycosylase Ser326Cys Polymorphism and Colorectal Cancer Risk in a Kashmiri Population. *DNA Cell Biol*; **2011**.
- [611] WEI, B.; ZHOU, Y.; XU, Z.; XI, B.; CHENG, H.; RUAN, J.; ZHU, M.; HU, Q.; WANG, Q.; WANG, Z.; YAN, Z.; JIN, K.; ZHOU, D.; XUAN, F.; HUANG, X.; SHAO, J.; LU, P. The Effect of hOGG1 Ser326Cys Polymorphism on Cancer Risk: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS One* 6:e27545; **2011**.
- [612] KARAHALIL, B.; ENGIN, A. B.; COSKUN, E. Could 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 Ser326Cys polymorphism be a biomarker of susceptibility in cancer? *Toxicol Ind Health*; **2012**.
- [613] DUAN, W.-X.; HUA, R.-X.; YI, W.; SHEN, L.-J.; JIN, Z.-X.; ZHAO, Y.-H.; YI, D.-H.; CHEN, W.-S.; YU, S.-Q. The Association between *OGG1* Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 27 Studies. *PLoS One* 7:e35970; **2012**.
- [614] WEI, W.; HE, X. F.; QIN, J. B.; SU, J.; LI, S. X.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; WANG, W. Association between the *OGG1* Ser326Cys and *APEX1* Asp148Glu polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 39:11249-11262; **2012**.
- [615] DECORDIER, I.; LOOCK, K. V.; KIRSCH-VOLDERS, M. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutat Res* 705:107-129; **2010**.
- [616] PAZ-ELIZUR, T.; ELINGER, D.; LEITNER-DAGAN, Y.; BLUMENSTEIN, S.; KRUPSKY, M.; BERREBI, A.; SCHECHTMAN, E.; LIVNEH, Z. Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: Distribution of *OGG1* activity in healthy individuals. *DNA Repair* 6:45-60; **2007**.
- [617] PAZ-ELIZUR, T.; KRUPSKY, M.; BLUMENSTEIN, S.; ELINGER, D.; SCHECHTMAN, E.; LIVNEH, Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:1312-1319; **2003**.

- [618] JANSSEN, K.; SCHLINK, K.; GOTTE, W.; HIPPLER, B.; KAINA, B.; OESCH, F. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res* 486:207-216; **2001**.
- [619] PAZ-ELIZUR, T.; BRENNER, D. E.; LIVNEH, Z. Interrogating DNA repair in cancer risk assessment. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1585-1587; **2005**.
- [620] FORTINI, P.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; D'ERRICO, M.; SIMONELLI, V.; DOGLIOTTI, E. The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85:1053-1071; **2003**.
- [621] BRAMSON, J.; O'CONNOR, T.; PANASCI, L. Effect of alkyl-N-purine DNA glycosylase overexpression on cellular resistance to bifunctional alkylating agents. *Biochemical Pharmacology* 50:39-44; **1995**.
- [622] ELDER, R. H.; JANSEN, J. G.; WEEKS, R. J.; WILLINGTON, M. A.; DEANS, B.; WATSON, A. J.; MYNETT, K. J.; BAILEY, J. A.; COOPER, D. P.; RAFFERTY, J. A.; HEERAN, M. C.; WIJNHOFEN, S. W. P.; VAN ZEELAND, A. A.; MARGISON, G. P. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate. *Molecular and Cellular Biology* 18:5828-5837; **1998**.
- [623] REBECK, G. W.; SAMSON, L. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of Escherichia coli strains lacking the ogt O6-methylguanine DNA repair methyltransferase. *Journal of Bacteriology* 173:2068-2076; **1991**.
- [624] KÖBERLE, B.; GRIMALDI, K. A.; SUNTERS, A.; HARTLEY, J. A.; KELLAND, L. R.; MASTERS, J. R. W. DNA Repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *International Journal of Cancer* 70:551-555; **1997**.
- [625] CLEAVER, J. E. DNA Repair and Radiation Sensitivity in Human (Xeroderma Pigmentosum) Cells. *International Journal of Radiation Biology* 18:557-565; **1970**.
- [626] ROTI ROTI, J. L.; WRIGHT, W. D. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry* 8:461-467; **1987**.
- [627] VINOGRAD, J.; LEBOWITZ, J.; RADLOFF, R.; WATSON, R.; LAIPIS, P. The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 53:1104-1111; **1965**.
- [628] SESTILI, P. The fast-halo assay for the assessment of DNA damage at the single-cell level. *Methods Mol Biol* 521:517-533; **2009**.
- [629] SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; STOCCHI, V. The fast halo assay: An improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 607:205-214; **2006**.
- [630] OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298; **1984**.
- [631] SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191; **1988**.
- [632] COLLINS, A. R.; DUSINSKA, M.; HORSKA, A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 48:611-614; **2001**.
- [633] COLLINS, A. R.; DUTHIE, S. J.; DOBSON, V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733-1735; **1993**.
- [634] COLLINS, A. R.; MITCHELL, D. L.; ZUNINO, A.; DE WIT, J.; BUSCH, D. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environ Mol Mutagen* 29:152-160; **1997**.
- [635] WESSELS, A.; VAN BERLO, D.; BOOTS, A. W.; GERLOFF, K.; SCHERBART, A. M.; CASSEE, F. R.; GERLOFS-NIJLAND, M. E.; VAN SCHOOTEN, F.-J.; ALBRECHT, C.; SCHINS, R. P. F. Oxidative stress and DNA damage responses in rat and mouse lung to inhaled carbon nanoparticles. *Nanotoxicology* 5:66-78; **2011**.

- [636] STANCZYK, M.; SLIWINSKI, T.; TRELINSKA, J.; CUCHRA, M.; MARKIEWICZ, L.; DZIKI, L.; BIENIEK, A.; BIELECKA-KOWALSKA, A.; KOWALSKI, M.; PASTORCZAK, A.; SZEMRAJ, J.; MLYNARSKI, W.; MAJSTEREK, I. Role of base-excision repair in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia with 6-mercaptopurine and high doses of methotrexate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 741:13-21; **2012**.
- [637] SMITH, C. C.; O'DONOVAN, M. R.; MARTIN, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21:185-190; **2006**.
- [638] HAŠPLOVÀ, K.; HUDECOVÀ, A.; MAGDOLANOVÀ, Z.; BARAS, M.; GÀLOVÀ, E. K.; MIADOKOVÀ, E.; DUŠINSKÀ, M. R. DNA alkylation lesions and their repair in human cells: Modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology Letters* 208:76-81; **2012**.
- [639] ALAPETITE, C.; BENOIT, A.; MOUSTACCHI, E.; SARASIN, A. The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J Invest Dermatol* 108:154-159; **1997**.
- [640] ORLOW, I.; PARK, B. J.; MUJUMDAR, U.; PATEL, H.; SIU-LAU, P.; CLAS, B. A.; DOWNEY, R.; FLORES, R.; BAINS, M.; RIZK, N.; DOMINGUEZ, G.; JANI, J.; BERWICK, M.; BEGG, C. B.; KRIS, M. G.; RUSCH, V. W. DNA damage and repair capacity in patients with lung cancer: prediction of multiple primary tumors. *J Clin Oncol* 26:3560-3566; **2008**.
- [641] SPEIT, G.; SCHUTZ, P.; HOFFMANN, H. Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol Lett* 153:303-310; **2004**.
- [642] VANDE LOOCK, K.; DECORDIER, I.; CIARDELLI, R.; HAUMONT, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis* 25:25-32; **2010**.
- [643] FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, R. H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research* 566:209-229; **2004**.
- [644] ANDERSON, D.; YU, T. W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 307:261-271; **1994**.
- [645] COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261; **2004**.
- [646] STANG, A.; WITTE, I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 675:5-10; **2009**.
- [647] KOHN, K. W.; GRIMEK-EWIG, R. A. Alkaline Elution Analysis, a New Approach to the Study of DNA Single-Strand Interruptions in Cells. *Cancer Research* 33:1849-1853; **1973**.
- [648] WHEELER, K. T.; NELSON, G. B. Saturation of DNA repair measured by alkaline elution. *Radiat Res* 125:227-229; **1991**.
- [649] PHOA, N.; EPE, B. Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis* 23:469-475; **2002**.
- [650] BRADLEY, M. O.; KOHN, K. W. X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res* 7:793-804; **1979**.
- [651] MUNZER, J. S.; JONES, S. K.; O'NEILL, J. P.; HARTSHORN, J. N.; ROBISON, S. H. Detection of DNA damage and repair by alkaline elution using human lymphocytes. *Mutat Res* 194:101-108; **1988**.
- [652] PFLAUM, M.; WILL, O.; EPE, B. Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18:2225-2231; **1997**.

- [653] AHNSTROM, G.; ERIXON, K. Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 23:285-289; **1973**.
- [654] KANTER, P. M.; SCHWARTZ, H. S. A hydroxylapatite batch assay for quantitation of cellular DNA damage. *Anal Biochem* 97:77-84; **1979**.
- [655] HARTWIG, A.; DALLY, H.; SCHLEPEGRELL, R. Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol Lett* 88:85-90; **1996**.
- [656] BIRNBOIM, H. C.; JEVCAK, J. J. Fluorometric Method for Rapid Detection of DNA Strand Breaks in Human White Blood Cells Produced by Low Doses of Radiation. *Cancer Research* 41:1889-1892; **1981**.
- [657] RANDEATH, K.; REDDY, M. V.; GUPTA, R. C. 32P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6126-6129; **1981**.
- [658] JONES, N. J. 32P-postlabelling for the Sensitive Detection of DNA Adducts. *T Genetic Toxicology* 817: 183-206; **2012**.
- [659] REDDY, M. V.; RANDEATH, K. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7:1543-1551; **1986**.
- [660] GUPTA, R. C. 32P-postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. *IARC Sci Publ*:11-23; **1993**.
- [661] PFAU, W.; PHILLIPS, D. H. Improved reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of 32P-labelled nucleoside 3',5'-bisphosphate adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr* 570:65-76; **1991**.
- [662] DUNN, B. P.; SAN, R. H. HPLC enrichment of hydrophobic DNA--carcinogen adducts for enhanced sensitivity of 32P-postlabeling analysis. *Carcinogenesis* 9:1055-1060; **1988**.
- [663] PLNA, K.; NILSSON, R.; KOSKINEN, M.; Segerbäck, D. 32P-postlabelling of propylene oxide 1- and N6-substituted adenine and 3-substituted cytosine/uracil: formation and persistence in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 20:2025-2032; **1999**.
- [664] CHATTERJEE, M. L.; Agarwal, R.; Mukhtar, H. Ultraviolet B Radiation-Induced DNA Lesions in Mouse Epidermis: An Assessment Using a Novel 32P-Postlabelling Technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229:590-595; **1996**.
- [665] SHARMA, M.; BOX, H. C.; KELMAN, D. J. Fluorescence postlabeling assay of cis-thymidine glycol monophosphate in X-irradiated calf-thymus DNA. *Chem Biol Interact* 74:107-117; **1990**.
- [666] JAIN, R.; SHARMA, M. Fluorescence postlabeling assay of DNA damage induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 53:2771-2774; **1993**.
- [667] SHARMA, M.; JAIN, R. Nuclease P1-mediated fluorescence postlabeling assay of AAF modified DNA model d(TACGTA) and calf-thymus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 177:151-158; **1991**.
- [668] FLOYD, R. A.; WATSON, J. J.; WONG, P. K.; ALTMILLER, D. H.; RICKARD, R. C. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun* 1:163-172; **1986**.
- [669] DOUKI, T.; MARTINI, R.; RAVANAT, J. L.; TURESKY, R. J.; CADET, J. Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution. *Carcinogenesis* 18:2385-2391; **1997**.
- [670] POUGET, J. P.; DOUKI, T.; RICHARD, M. J.; CADET, J. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem Res Toxicol* 13:541-549; **2000**.
- [671] DEZOR, M.; DORSZEWSKA, J.; FLORCZAK, J.; KEMPISTY, B.; JAROSZEWSKA-KOLECKA, J.; ROZYCKA, A.; POLROLNICZAK, A.; BUGAJ, R.; JAGODZINSKI, P. P.; KOZUBSKI, W. Expression of 8-oxoguanine DNA

glycosylase 1 (OGG1) and the level of p53 and TNF-alpha proteins in peripheral lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 49:123-131; **2011**.

[672] KASAI, H.; CRAIN, P. F.; KUCHINO, Y.; NISHIMURA, S.; OOTSUYAMA, A.; TANOOKA, H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7:1849-1851; **1986**.

[673] DIZDAROGLU, M. The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links. *J Chromatogr* 295:103-121; **1984**.

[674] CHEN, H. J.; CHIU, W. L. Detection and quantification of 1,N6-ethenoadenine in human urine by stable isotope dilution capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 16:1099-1106; **2003**.

[675] PREVOST, V.; SHUKER, D. E. Cigarette smoking and urinary 3-alkyladenine excretion in man. *Chem Res Toxicol* 9:439-444; **1996**.

[676] HAMBERG, M.; ZHANG, L. Y. Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry. *Anal Biochem* 229:336-344; **1995**.

[677] CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ Health Perspect* 105:1034-1039; **1997**.

[678] RAVANAT, J. L.; TURESKY, R. J.; GREMAUD, E.; TRUDEL, L. J.; STADLER, R. H. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography--mass spectrometry and HPLC--electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography--mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* 8:1039-1045; **1995**.

[679] DIZDAROGLU, M. Application of capillary gas chromatography-mass spectrometry to chemical characterization of radiation-induced base damage of DNA: implications for assessing DNA repair processes. *Anal Biochem* 144:593-603; **1985**.

[680] RAVANAT, J. L.; DURETZ, B.; GUILLER, A.; DOUKI, T.; CADET, J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 715:349-356; **1998**.

[681] ANDREWS, C. L.; VOUIROS, P.; HARSCH, A. Analysis of DNA adducts using high-performance separation techniques coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 856:515-526; **1999**.

[682] CADET, J.; DOUKI, T.; FRELON, S.; SAUVAIGO, S.; POUGET, J. P.; RAVANAT, J. L. Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med* 33:441-449; **2002**.

[683] SINGH, R.; FARMER, P. B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. *Carcinogenesis* 27:178-196; **2006**.

[684] WANG, J.; YUAN, B.; GUERRERO, C.; BAHDE, R.; GUPTA, S.; WANG, Y. Quantification of Oxidative DNA Lesions in Tissues of Long-Evans Cinnamon Rats by Capillary High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Coupled with Stable Isotope-Dilution Method. *Anal. Chem.* 83:2201-2209; **2011**.

[685] MALAYAPPAN, B.; JOHNSON, L. A.; NIE, B.; PANCHAL, D.; MATTER, B.; JACOBSON, P.; TRETYAKOVA, N. Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Analysis of Bis-N7-Guanine DNA-DNA Cross-Links in White Blood Cells of Cancer Patients Receiving Cyclophosphamide Therapy. *Anal. Chem.* 82:3650-3658; **2010**.

[686] COOKE, M. S.; LUNEC, J.; EVANS, M. D. Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 33:1601-1614; **2002**.

- [687] HU, C.-W.; LIU, H.-H.; LI, Y.-J.; CHAO, M.-R. Direct Analysis of 5-Methylcytosine and 5-Methyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC-MS/MS: Correlations with N-Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chemical Research in Toxicology* 25:462-470; **2012**.
- [688] TOYOKUNI, S.; TANAKA, T.; HATTORI, Y.; NISHIYAMA, Y.; YOSHIDA, A.; UCHIDA, K.; HIAI, H.; OCHI, H.; OSAWA, T. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76:365-374; **1997**.
- [689] LEADON, S. A.; HANAWALT, P. C. Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol. *Mutat Res* 112:191-200; **1983**.
- [690] KRISTE, A. G.; MARTINCIGH, B. S.; SALTER, L. F. A sensitive immunoassay technique for thymine dimer quantitation in UV-irradiated DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 93:185-192; **1996**.
- [691] VENKATACHALAM, S.; DENISSENKO, M.; WANI, A. A. DNA repair in human cells: quantitative assessment of bulky anti-BPDE-DNA adducts by non-competitive immunoassays. *Carcinogenesis* 16:2029-2036; **1995**.
- [692] LE, X. C.; XING, J. Z.; LEE, J.; LEADON, S. A.; WEINFELD, M. Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* 280:1066-1069; **1998**.
- [693] EGGSET, G.; VOLDEN, G.; KROKAN, H. U.v.-induced DNA damage and its repair in human skin in vivo studied by sensitive immunohistochemical methods. *Carcinogenesis* 4:745-750; **1983**.
- [694] YOUNG, A. R.; CHADWICK, C. A.; HARRISON, G. I.; HAWK, J. L.; NIKAIDO, O.; POTTEN, C. S. The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *J Invest Dermatol* 106:1307-1313; **1996**.
- [695] KUMARI, S. DNA damage: detection strategies. *EXCLI Journal*, 7:44-62 **2008**.
- [696] SANTELLA, R. M. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:733-739; **1999**.
- [697] PARK, E. M.; SHIGENAGA, M. K.; DEGAN, P.; KORN, T. S.; KITZLER, J. W.; WEHR, C. M.; KOLACHANA, P.; AMES, B. N. Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89:3375-3379; **1992**.
- [698] SANTELLA, R. M.; GASPARO, F.; HSIEH, L. L. Quantitation of carcinogen-DNA adducts with monoclonal antibodies. *Prog Exp Tumor Res* 31:63-75; **1987**.
- [699] ATHAS, W. F.; HEDAYATI, M. A.; MATANOSKI, G. M.; FARMER, E. R.; GROSSMAN, L. Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes. *Cancer Res* 51:5786-5793; **1991**.
- [700] MENDEZ, P.; TARON, M.; MORAN, T.; FERNANDEZ, M. A.; REQUENA, G.; ROSELL, R. A modified host-cell reactivation assay to quantify DNA repair capacity in cryopreserved peripheral lymphocytes. *DNA Repair* 10:603-610; **2011**.
- [701] QIAO, Y.; SPITZ, M. R.; GUO, Z.; HADEYATI, M.; GROSSMAN, L.; KRAEMER, K. H.; WEI, Q. Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mutat Res* 509:165-174; **2002**.
- [702] SPIVAK, G.; HANAWALT, P. C. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 5:13-22; **2006**.

- [703] BURGER, K.; MATT, K.; KIESER, N.; GEBHARD, D.; BERGEMANN, J. A modified fluorimetric host cell reactivation assay to determine the repair capacity of primary keratinocytes, melanocytes and fibroblasts. *BMC Biotechnol.* 2010 Jun 22;10:46.; **2010**.
- [704] CHU, G.; BERG, P. DNA cross-linked by cisplatin: a new probe for the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum. *Mol Biol Med* 4:277-290; **1987**.
- [705] RAETZ, A. G.; XIE, Y.; KUNDU, S.; BRINKMEYER, M. K.; CHANG, C.; DAVID, S. S. Cancer-associated variants and a common polymorphism of MUTYH exhibit reduced repair of oxidative DNA damage using a GFP-based assay in mammalian cells. *Carcinogenesis* 33:2301-2309; **2012**.
- [706] PROTIC-SABLJIC, M.; KRAEMER, K. H. Host cell reactivation by human cells of DNA expression vectors damaged by ultraviolet radiation or by acid-heat treatment. *Carcinogenesis* 7:1765-1770; **1986**.
- [707] BRINKMEYER, MEGAN K.; POPE, MARY A.; DAVID, SHEILA S. Catalytic Contributions of Key Residues in the Adenine Glycosylase MutY Revealed by pH-dependent Kinetics and Cellular Repair Assays. *Chemistry & Biology* 19:276-286; **2011**.
- [708] LIVINGSTON, A. L.; O'SHEA, V. L.; KIM, T.; KOOL, E. T.; DAVID, S. S. Unnatural substrates reveal the importance of 8-oxoguanine for in vivo mismatch repair by MutY. *Nat Chem Biol* 4:51-58; **2008**.
- [709] PEARSON, C. G.; SHIKAZONO, N.; THACKER, J.; O'NEILL, P. Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site. *Nucleic Acids Res* 32:263-270; **2004**.
- [710] SHIKAZONO, N.; PEARSON, C.; O'NEILL, P.; THACKER, J. The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res* 34:3722-3730; **2006**.
- [711] MAKSIMENKO, A.; ISHCENKO, A. A.; SANZ, G.; LAVAL, J.; ELDER, R. H.; SAPARBAEV, M. K. A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochem Biophys Res Commun* 319:240-246; **2004**.
- [712] GROS, L.; MAKSIMENKO, A. V.; PRIVEZENTZEV, C. V.; LAVAL, J.; SAPARBAEV, M. K. Hijacking of the human alkyl-N-purine-DNA glycosylase by 3,N4-ethenocytosine, a lipid peroxidation-induced DNA adduct. *J Biol Chem* 279:17723-17730; **2004**.
- [713] KERSHAW, R. M.; HODGES, N. J. Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1. *Mutagenesis*; **2012**.
- [714] MATSUMOTO, N.; TOGA, T.; HAYASHI, R.; SUGASAWA, K.; KATAYANAGI, K.; IDE, H.; KURAOKA, I.; IWAI, S. Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 38:e101; **2010**.
- [715] MIRBAHAI, L.; KERSHAW, R. M.; GREEN, R. M.; HAYDEN, R. E.; MELDRUM, R. A.; HODGES, N. J. Use of a molecular beacon to track the activity of base excision repair protein OGG1 in live cells. *DNA Repair (Amst)* 9:144-152; **2010**.
- [716] KELLY, C. M.; LATIMER, J. J. Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Methods Mol Biol* 291:303-320; **2005**.
- [717] PERO, R. W.; RITCHIE, M.; WINAWER, S. J.; MARKOWITZ, M. M.; MILLER, D. G. Unscheduled DNA synthesis in mononuclear leukocytes from patients with colorectal polyps. *Cancer Res* 45:3388-3391; **1985**.
- [718] RASMUSSEN, R. E.; PAINTER, R. B. Evidence for Repair of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 203:1360-1362; **1964**.
- [719] ATAMNA, H.; CHEUNG, I.; AMES, B. N. A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:686-691; **2000**.

- [720] WANG, Y.; LIU, L.; WU, C.; BULGAR, A.; SOMOZA, E.; ZHU, W.; GERSON, S. L. Direct detection and quantification of abasic sites for in vivo studies of DNA damage and repair. *Nuclear Medicine and Biology* 36:975-983; **2009**.
- [721] COLLINS, A. R.; DUSINSKA, M.; HORVATHOVA, E.; MUNRO, E.; SAVIO, M.; STETINA, R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 16:297-301; **2001**.
- [722] GAIVAO, I.; PIASEK, A.; BREVIK, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biology and Toxicology* 25:45-52; **2009**.
- [723] LANGIE, S. A.; KNAAPEN, A. M.; BRAUERS, K. J.; VAN BERLO, D.; VAN SCHOOTEN, F. J.; GODSCHALK, R. W. Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis* 21:153-158; **2006**.
- [724] LANGIE, S. A. S.; CAMERON, K. M.; WALDRON, K. J.; FLETCHER, K. P. R.; VON ZGLINICKI, T.; MATHERS, J. C. Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: a comet-based in vitro repair assay. *Mutagenesis* 26:461-471; **2011**.
- [725] WOOD, R. D.; ROBINS, P.; LINDAHL, T. Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* 53:97-106; **1988**.
- [726] DIANOV, G.; PRICE, A.; LINDAHL, T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol* 12:1605-1612; **1992**.
- [727] STUART, J. A.; HASHIGUCHI, K.; WILSON, D. M., 3RD; COPELAND, W. C.; SOUZA-PINTO, N. C.; BOHR, V. A. DNA base excision repair activities and pathway function in mitochondrial and cellular lysates from cells lacking mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 32:2181-2192; **2004**.
- [728] ELLIOTT, R. M.; ASTLEY, S. N. B.; SOUTHON, S.; ARCHER, D. B. Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 28:1438-1446; **2000**.
- [729] WANG, Z.; WU, X.; FRIEDBERG, E. C. The Detection and Measurement of Base and Nucleotide Excision Repair in Cell-Free Extracts of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 7:177-186; **1995**.
- [730] HOU, E. W.; PRASAD, R.; ASAGOSHI, K.; MASAOKA, A.; WILSON, S. H. Comparative assessment of plasmid and oligonucleotide DNA substrates in measurement of in vitro base excision repair activity. *Nucleic Acids Res* 35:e112; **2007**.
- [731] SALLES, B.; PROVOT, C. In vitro chemiluminescence assay to measure excision repair in cell extracts. *Methods Mol Biol* 113:393-401; **1999**.
- [732] SALLES, B.; PROVOT, C.; CALSOU, P.; HENNEBELLE, I.; GOSSET, I.; FOURNIE, G. J. A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments. *Anal Biochem* 232:37-42; **1995**.
- [733] MILLAU, J. F.; RAFFIN, A. L.; CAILLAT, S.; CLAUDET, C.; ARRAS, G.; UGOLIN, N.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L.; BRETON, J.; ODDOS, T.; DUMONTET, C.; SARASIN, A.; CHEVILLARD, S.; FAVIER, A.; SAUVAIGO, S. A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip* 8:1713-1722; **2008**.
- [734] APRELIKOVA, O. N.; TOMILIN, N. V. Activity of uracil-DNA glycosylase in different rat tissues and in regenerating rat liver. *FEBS Letters* 137:193-195; **1982**.
- [735] JUN, B. H.; KANG, H.; LEE, Y. S.; JEONG, D. H. Fluorescence-based multiplex protein detection using optically encoded microbeads. *Molecules* 17:2474-2490; **2012**.
- [736] KUBAREVA, E. A.; VOLKOV, E. M.; VINOGRADOVA, N. L.; KANEVSKY, I. A.; ORETSKAYA, T. S.; KUZNETSOVA, S. A.; BREVNOV, M. G.; GROMOVA, E. S.; NEVINSKY, G. A.; SHABAROVA, Z. A. Modified substrates as probes for studying uracil-DNA glycosylase. *Gene* 157:167-171; **1995**.

- [737] KROKAN, H.; WITTEW, C. U. Uracil DNA-glycosylase from HeLa cells: general properties, substrate specificity and effect of uracil analogs. *Nucleic Acids Res* 9:2599-2613; **1981**.
- [738] CHAKRAVARTI, D.; IBEANU, G. C.; TANO, K.; MITRA, S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 266:15710-15715; **1991**.
- [739] ROY, R.; BROOKS, C.; MITRA, S. Purification and biochemical characterization of recombinant N-methylpurine-DNA glycosylase of the mouse. *Biochemistry* 33:15131-15140; **1994**.
- [740] WASHINGTON, W. J.; DUNN, W. C., JR.; GENEROSO, W. M.; MITRA, S. Tissue-specific variation in repair activity for 3-methyladenine in DNA in two stocks of mice. *Mutat Res* 207:165-169; **1988**.
- [741] KARRAN, P.; LINDAHL, T. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus. *Biochemistry* 19:6005-6011; **1980**.
- [742] NIKOLIC, D. A liquid chromatography-mass spectrometric assay for measuring activity of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *Anal Biochem* 396:275-279; **2010**.
- [743] SHINMURA, K.; KASAI, H.; SASAKI, A.; SUGIMURA, H.; YOKOTA, J. 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and AP lyase activities of hOGG1 protein and their substrate specificity. *Mutation Research/DNA Repair* 385:75-82; **1997**.
- [744] YING, B. W.; FOURMY, D.; YOSHIZAWA, S. Substitution of the use of radioactivity by fluorescence for biochemical studies of RNA. *RNA* 13:2042-2050; **2007**.
- [745] LIU, B.; YANG, X.; WANG, K.; TAN, W.; LI, H.; TANG, H. Real-time monitoring of uracil removal by uracil-DNA glycosylase using fluorescent resonance energy transfer probes. *Anal Biochem* 366:237-243; **2007**.
- [746] GHOSH, S. S.; EIS, P. S.; BLUMEYER, K.; FEARON, K.; MILLAR, D. P. Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res* 22:3155-3159; **1994**.
- [747] TANI, H.; FUJITA, O.; FURUTA, A.; MATSUDA, Y.; MIYATA, R.; AKIMITSU, N.; TANAKA, J.; TSUNEDA, S.; SEKIGUCHI, Y.; NODA, N. Real-time monitoring of RNA helicase activity using fluorescence resonance energy transfer in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 393:131-136; **2010**.
- [748] YE, Y.; STIVERS, J. T. Fluorescence-based high-throughput assay for human DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1. *Anal Biochem* 401:168-172; **2010**.
- [749] LEE, S. P.; CENSULLO, M. L.; KIM, H. G.; KNUTSON, J. R.; HAN, M. K. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate. *Anal Biochem* 227:295-301; **1995**.
- [750] MADHUSUDAN, S.; SMART, F.; SHRIMPTON, P.; PARSONS, J. L.; GARDINER, L.; HOULBROOK, S.; TALBOT, D. C.; HAMMONDS, T.; FREEMONT, P. A.; STERNBERG, M. J.; DIANOV, G. L.; HICKSON, I. D. Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* 33:4711-4724; **2005**.
- [751] SIMEONOV, A.; KULKARNI, A.; DORISUREN, D.; JADHAV, A.; SHEN, M.; MCNEILL, D. R.; AUSTIN, C. P.; WILSON, D. M., 3RD. Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1. *PLoS One* 4:e5740; **2009**.
- [752] BESSHO, T.; ROY, R.; YAMAMOTO, K.; KASAI, H.; NISHIMURA, S.; TANO, K.; MITRA, S. Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8901-8904; **1993**.
- [753] DIANOV, G.; BISCHOFF, C.; SUNESEN, M.; BOHR, V. A. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res* 27:1365-1368; **1999**.
- [754] VERJAT, T.; DHÉNAUT, A.; RADICELLA, J. P.; SILVIA. Detection of 8-oxoG DNA glycosylase activity and OGG1 transcripts in the rat CNS. *Mutation Research/DNA Repair* 460:127-138; **2000**.

- [755] VIK, E. S.; ALSETH, I.; FORSBRING, M.; HELLE, I. H. Y.; MORLAND, I.; LUNA, L.; BJØRÅS, M.; DALHUS, B. R. Biochemical mapping of human NEIL1 DNA glycosylase and AP lyase activities. *DNA Repair* 11:766-773; **2012**.
- [756] SWAIN, U.; SUBBA RAO, K. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 132:374-381; **2011**.
- [757] VALLUR, A. C.; MAHER, R. L.; BLOOM, L. B. The efficiency of hypoxanthine excision by alkyladenine DNA glycosylase is altered by changes in nearest neighbor bases. *DNA Repair* 4:1088-1098; **2005**.
- [758] D'HAM, C.; ROMIEU, A.; JAQUINOD, M.; GASPARUTTO, D.; CADET, J. Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by Escherichia coli endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 38:3335-3344; **1999**.
- [759] SPEINA, E.; ZIELINSKA, M.; BARBIN, A.; GACKOWSKI, D.; KOWALEWSKI, J.; GRAZIEWICZ, M. A.; SIEDLECKI, J. A.; OLINSKI, R.; TUDEK, B. Decreased repair activities of 1,N(6)-ethenoadenine and 3,N(4)-ethenocytosine in lung adenocarcinoma patients. *Cancer Res* 63:4351-4357; **2003**.
- [760] KINO, K.; TAKAO, M.; MIYAZAWA, H.; HANAOKA, F. A DNA oligomer containing 2,2,4-triamino-5(2H)-oxazolone is incised by human NEIL1 and NTH1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 734:73-77; **2012**.
- [761] KREKLAU, E. L.; LIMP-FOSTER, M.; LIU, N.; XU, Y.; KELLEY, M. R.; ERICKSON, L. C. A novel fluorometric oligonucleotide assay to measure O(6)-methylguanine DNA methyltransferase, methylpurine DNA glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase and abasic endonuclease activities: DNA repair status in human breast carcinoma cells overexpressing methylpurine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 29:2558-2566; **2001**.
- [762] BALLAL, R.; CHEEMA, A.; AHMAD, W.; ROSEN, E. M.; SAHA, T. Fluorescent oligonucleotides can serve as suitable alternatives to radiolabeled oligonucleotides. *J Biomol Tech* 20:190-194; **2009**.
- [763] HAMANN, I.; SCHWERDTLE, T.; HARTWIG, A. Establishment of a non-radioactive cleavage assay to assess the DNA repair capacity towards oxidatively damaged DNA in subcellular and cellular systems and the impact of copper. *Mutat Res* 669:122-130; **2009**.
- [764] GEORGIADIS, P.; POLYCHRONAKI, N.; KYRTOPOULOS, S. A. Progress in high-throughput assays of MGMT and APE1 activities in cell extracts. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; **2012**.
- [765] YANG, X.; TONG, C.; LONG, Y.; LIU, B. A rapid fluorescence assay for hSMUG1 activity based on modified molecular beacon. *Mol Cell Probes*; **2011**.
- [766] CHOLLAT-NAMY, A. Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence. *Thèse de l'Université Joseph Fourier de Grenoble*; **2006**.
- [767] ONO, T.; WANG, S.; KOO, C. K.; ENGSTROM, L.; DAVID, S. S.; KOOL, E. T. Direct Fluorescence Monitoring of DNA Base Excision Repair. *Angew Chem Int Ed Engl*; **2012**.
- [768] STIVERS, J. T. 2-Aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA: metal-ion and base sequence effects. *Nucleic Acids Res* 26:3837-3844; **1998**.
- [769] COLLINI, M.; CACCIA, M.; CHIRICO, G.; BARONE, F.; DOGLIOTTI, E.; MAZZEI, F. Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy as a potential tool for high-throughput screening of DNA repair activity. *Nucleic Acids Research* 33:e165; **2005**.
- [770] ZHOU, D.-M.; XI, Q.; LIANG, M.-F.; CHEN, C.-H.; TANG, L.-J.; JIANG, J.-H. Graphene oxide-hairpin probe nanocomposite as a homogeneous assay platform for DNA base excision repair screening. *Biosensors and Bioelectronics* 41:359-365; **2013**.

- [771] SAUVAIGO, S.; GUERNIOU, V.; RAPIN, D.; GASPARUTTO, D.; CAILLAT, S.; FAVIER, A. An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Anal Biochem* 333:182-192; **2004**.
- [772] CANDÉIAS, S.; PONS, B.; VIAU, M.; CAILLAT, S.; SAUVAIGO, S. Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: Analysis on dedicated biochips. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 694:53-59; **2010**.
- [773] FLAENDER, M. Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques: Applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur réparation sur support. *Thèse de l'Université de Grenoble*; **2010**.
- [774] CORNE, C.; FICHE, J. B.; CUNIN, V.; BUHOT, A.; FUCHS, J.; CALEM CZUK, R.; FAVIER, A.; LIVACHE, T.; GASPARUTTO, D. SPR-imaging based assays on an oligonucleotide-array to analyze DNA lesions recognition and excision by repair proteins. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*:249-250; **2008**.
- [775] XIA, L.; O'CONNOR, T. R. DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture. *Anal Biochem* 298:322-326; **2001**.
- [776] ZHANG, H.; ZHANG, L.; JIANG, J.; YU, R. A Highly Sensitive Electrochemical Platform for the Assay of Uracil-DNA Glycosylase Activity Combined with Enzymatic Amplification. *Analytical Sciences* 29:193-198; **2013**.
- [777] TYAGI, S.; KRAMER, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14:303-308; **1996**.
- [778] TYAGI, S.; BRATU, D. P.; KRAMER, F. R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* 16:49-53; **1998**.
- [779] MANGANELLI, R.; TYAGI, S.; SMITH, I. Real Time PCR Using Molecular Beacons : A New Tool to Identify Point Mutations and to Analyze Gene Expression in Mycobacterium tuberculosis. *Methods Mol Med* 54:295-310; **2001**.
- [780] MARRAS, S. A.; KRAMER, F. R.; TYAGI, S. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genet Anal* 14:151-156; **1999**.
- [781] SOKOL, D. L.; ZHANG, X.; LU, P.; GEWIRTZ, A. M. Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11538-11543; **1998**.
- [782] WANG, L.; YANG, C. J.; MEDLEY, C. D.; BENNER, S. A.; TAN, W. Locked nucleic acid molecular beacons. *J Am Chem Soc* 127:15664-15665; **2005**.
- [783] PENG, X. H.; CAO, Z. H.; XIA, J. T.; CARLSON, G. W.; LEWIS, M. M.; WOOD, W. C.; YANG, L. Real-time detection of gene expression in cancer cells using molecular beacon imaging: new strategies for cancer research. *Cancer Res* 65:1909-1917; **2005**.
- [784] VET, J. A.; MAJITHIA, A. R.; MARRAS, S. A.; TYAGI, S.; DUBE, S.; POIESZ, B. J.; KRAMER, F. R. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6394-6399; **1999**.
- [785] FANG, X.; LI, J. J.; PERLETTE, J.; TAN, W.; WANG, K. Molecular beacons: novel fluorescent probes. *Anal Chem* 72:747A-753A; **2000**.
- [786] TAN, W.; FANG, X.; LI, J.; LIU, X. Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chemistry* 6:1107-1111; **2000**.
- [787] DRAKE, T. J.; TAN, W. Molecular beacon DNA probes and their bioanalytical applications. *Appl Spectrosc* 58:269A-280A; **2004**.
- [788] LI, Y.; ZHOU, X.; YE, D. Molecular beacons: An optimal multifunctional biological probe. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373:457-461; **2008**.

- [789] BROUDE, N. E. Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology. *Trends Biotechnol* 20:249-256; **2002**.
- [790] GASPARUTTO, D.; CADET, J. New oligonucleotide substrate, useful for detecting dna repair activity, includes double strand region containing a lesion and linked to an energy transfer pair. *Dépôt de brevet* FR2836926; **2003**.
- [791] KUNDU, L. M.; Burgdorf, L. T.; Kleiner, O.; Batschauer, A.; Carell, T. Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity. *Chembiochem* 3:1053-1060; **2002**.
- [792] SVILAR, D.; VENS, C.; SOBOL, R. W. Quantitative, Real-time Analysis of Base Excision Repair Activity in Cell Lysates Utilizing Lesion-specific Molecular Beacons. *J Vis Exp*; **2012**.
- [793] ONO, T.; EDWARDS, S. K.; WANG, S.; JIANG, W.; KOOL, E. T. Monitoring eukaryotic and bacterial UDG repair activity with DNA-multifluorophore sensors. *Nucleic Acids Res* 41:e127; **2013**.
- [794] DARWANTO, A.; FARREL, A.; ROGSTAD, D. K.; SOWERS, L. C. Characterization of DNA glycosylase activity by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 394:13-23; **2009**.
- [795] GASPARUTTO, D.; SAINT-PIERRE, C.; JAQUINOD, M.; FAVIER, A.; CADET, J. MALDI-TOF mass spectrometry as a powerful tool to study enzymatic processing of DNA lesions inserted into oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22:1583-1586; **2003**.
- [796] HUANG, Y.; ZHAO, S.; LIANG, H.; CHEN, Z. F.; LIU, Y. M. Multiplex Detection of Endonucleases by Using a Multicolor Gold Nanobeacon. *Chemistry*; **2011**.
- [797] GUERNIOU, V.; RAPIN, D.; MILLAU, J. F.; BUFFLIER, E.; FAVIER, A.; CADET, J.; SAUVAIGO, S. Repair of oxidative damage of thymine by HeLa whole-cell extracts: simultaneous analysis using a microsupport and comparison with traditional PAGE analysis. *Biochimie* 87:151-159; **2005**.
- [798] PONS, T.; MEDINTZ, I. L.; SAPSFORD, K. E.; HIGASHIYA, S.; GRIMES, A. F.; ENGLISH, D. S.; MATTOUSSI, H. On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles. *Nano Lett* 7:3157-3164; **2007**.
- [799] CORNE, C.; FICHE, J. B.; GASPARUTTO, D.; CUNIN, V.; SURANITI, E.; BUHOT, A.; FUCHS, J.; CALEMCZUK, R.; LIVACHE, T.; FAVIER, A. SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes. *Analyst* 133:1036-1045; **2008**.
- [800] ZHANG, H.; ZANG, Y.; SUN, Y.; JIN, R.; WU, H.; WANG, M.; LI, N.; CHEN, D. A new approach utilizing real-time qPCR to detect in vitro base excision repair. *DNA Repair* 9:898-906; **2010**.
- [801] LEE, W.; LEE, Y. I.; LEE, J.; DAVIS, L. M.; DEININGER, P.; SOPER, S. A. Cross-talk-free dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for the study of enzyme activity. *Anal Chem* 82:1401-1410; **2010**.
- [802] NGUYEN, V. T.; LE, D. V.; NIE, C.; ZHOU, D. M.; WANG, Y. Z.; TANG, L. J.; JIANG, J. H.; YU, R. Q. Enzyme-catalyzed assembly of gold nanoparticles for visualized screening of DNA base excision repair. *Talanta* 100:303-307; **2012**.
- [803] VASILENKO, N. L.; BULYCHEV, N. V.; GORN, V. V.; LEVINA, A. S.; NEVINSKII, G. A. Recognition of uracil in DNA by uracil-DNA-glycosylase from human placenta. *Mol Biol (Mosk)* 28:679-690; **1994**.
- [804] WILSON, D. M., 3RD; TAKESHITA, M.; GROLLMAN, A. P.; DEMPSE, B. Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA. *J Biol Chem* 270:16002-16007; **1995**.
- [805] CARUTHERS, M. H.; BEAUCAGE, S. L.; EFCAVITCH, J. W.; FISHER, E. F.; MATTEUCCI, M. D.; STABINSKY, Y. New chemical methods for synthesizing polynucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser*:215-223; **1980**.
- [806] BEAUCAGE, S. L.; IYER, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* 48:2223-2311; **1992**.

- [807] VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 366:540-551; **2000**.
- [808] ROSTOVTSSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl* 41:2596-2599; **2002**.
- [809] TORNOE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* 67:3057-3064; **2002**.
- [810] HOLMBERG, A.; BLOMSTERGREN, A.; NORD, O.; LUKACS, M.; LUNDEBERG, J.; UHLEN, M. The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* 26:501-510; **2005**.
- [811] DOI, A.; PACK, S. P.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Reinvestigation of the molecular influence of hypoxanthine on the DNA cleavage efficiency of restriction endonucleases BglII, EcoRI and BamHI. *J Biochem* 146:201-208; **2009**.
- [812] MAHER, R. L.; VALLUR, A. C.; FELLER, J. A.; BLOOM, L. B. Slow base excision by human alkyladenine DNA glycosylase limits the rate of formation of AP sites and AP endonuclease 1 does not stimulate base excision. *DNA Repair (Amst)* 6:71-81; **2007**.
- [813] LIU, L.; GERSON, S. L. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 5:623-627; **2004**.
- [814] FISHEL, M. L.; KELLEY, M. R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med* 28:375-395; **2007**.
- [815] TANG, J.-B.; SVILAR, D.; TRIVEDI, R. N.; WANG, X.-H.; GOELLNER, E. M.; MOORE, B.; HAMILTON, R. L.; BANZE, L. A.; BROWN, A. R.; SOBOL, R. W. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase β modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. *Neuro-Oncology* 13:471-486; 2012.
- [816] MOLDAVAN, A. Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells. *Science* 80:188-189; **1934**.
- [817] MARRAS, S. A.; KRAMER, F. R.; TYAGI, S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 30:e122; **2002**.
- [818] GRUBER, H. J.; HAHN, C. D.; KADA, G.; RIENER, C. K.; HARMS, G. S.; AHRER, W.; DAX, T. G.; KNAUS, H.-G. N. Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin. *Bioconjugate Chem.* 11:696-704; **2000**.
- [819] LIZARD, G.; DUVILLARD, L.; WEDEMEYER, N.; MULLER, C.; GHIRINGHELLI, F.; CESBRON, A.; PONCELET, P.; GALLET, F.; KAHN, E.; GAMBERT, P.; GÖHDE, W. Microbilles, nanobilles et cytométrie : applications à l'analyse et à la purification cellulaire et moléculaire. *Pathologie Biologie* 51:418-427; **2003**.
- [820] COLLINS, D. P.; LUEBERING, B. J.; SHAUT, D. M. T-lymphocyte functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression, and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry. *Cytometry* 33:249-255; **1998**.
- [821] MCHUGH, T. M.; VIELE, M. K.; CHASE, E. S.; RECKTENWALD, D. J. The sensitive detection and quantitation of antibody to HCV by using a microsphere-based immunoassay and flow cytometry. *Cytometry* 29:106-112; **1997**.
- [822] MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J. A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical Immunology* 110:252-266; **2004**.

- [823] FULTON, R. J.; MCDADE, R. L.; SMITH, P. L.; KIENKER, L. J.; KETTMAN, J. R., JR. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 43:1749-1756; **1997**.
- [824] CARSON, R. T.; VIGNALI, D. A. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 227:41-52; **1999**.
- [825] OLIVER, K. G.; KETTMAN, J. R.; FULTON, R. J. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin Chem* 44:2057-2060; **1998**.
- [826] VIGNALI, D. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 243:243-255; **2000**.
- [827] FRAGA, M.; VILARIÑO, N.; LOUZAO, M. C.; CAMPBELL, K.; ELLIOTT, C. T.; KAWATSU, K.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. Detection of Paralytic Shellfish Toxins by a Solid-Phase Inhibition Immunoassay Using a Microsphere-Flow Cytometry System. *Anal. Chem.*; **2012**.
- [828] ARMSTRONG, B.; STEWART, M.; MAZUMDER, A. Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry* 40:102-108; **2000**.
- [829] IANNONE, M. A.; TAYLOR, J. D.; CHEN, J.; LI, M. S.; RIVERS, P.; SLENTZ-KESLER, K. A.; WEINER, M. P. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 39:131-140; **2000**.
- [830] KELLAR, K. L.; IANNONE, M. A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Experimental Hematology* 30:1227-1237; **2002**.
- [831] DUNBAR, S. A. Applications of Luminex® xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clinica Chimica Acta* 363:71-82; **2006**.
- [832] SMITH, P. L.; WALKERPEACH, C. R.; FULTON, R. J.; DUBOIS, D. B. A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. *Clin Chem* 44:2054-2056; **1998**.
- [833] GLEASON, L. U.; BURTON, R. S. High-throughput molecular identification of fish eggs using multiplex suspension bead arrays. *Mol Ecol Resour* 12:57-66; **2012**.
- [834] GAO, X.; NIE, S. Quantum Dot-Encoded Mesoporous Beads with High Brightness and Uniformity: Rapid Readout Using Flow Cytometry. *Anal. Chem.* 76:2406-2410; **2004**.
- [835] GAO, Y.; STANFORD, W. L.; CHAN, W. C. W. Quantum-Dot-Encoded Microbeads for Multiplexed Genetic Detection of Non-amplified DNA Samples. *Small* 7:137-146; **2011**.
- [836] HAN, M.; GAO, X.; SU, J. Z.; NIE, S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* 19:631-635; **2001**.
- [837] CHAN, W. C. W.; MAXWELL, D. J.; GAO, X.; BAILEY, R. E.; HAN, M.; NIE, S. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* 13:40-46; **2002**.
- [838] WANG, Z.; MOSBAUGH, D. W. Uracil-DNA glycosylase inhibitor gene of bacteriophage PBS2 encodes a binding protein specific for uracil-DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* 264:1163-1171; **1989**.
- [839] ACHARYA, N.; KUMAR, P.; VARSHNEY, U. Complexes of the uracil-DNA glycosylase inhibitor protein, Ugi, with *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* uracil-DNA glycosylases. *Microbiology* 149:1647-1658; **2003**.
- [840] BENNETT, S. E.; MOSBAUGH, D. W. Characterization of the *Escherichia coli* uracil-DNA glycosylase.inhibitor protein complex. *J Biol Chem* 267:22512-22521; **1992**.
- [841] BENNETT, S. E.; SCHIMERLIK, M. I.; MOSBAUGH, D. W. Kinetics of the uracil-DNA glycosylase/inhibitor protein association. Ung interaction with Ugi, nucleic acids, and uracil compounds. *J Biol Chem* 268:26879-26885; **1993**.
- [842] KIM, T.; EBERWINE, J. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:3173-3178; **2010**.

- [843] GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467; **1973**.
- [844] BACCHETTI, S.; GRAHAM, F. L. Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:1590-1594; **1977**.
- [845] FISCHER, D.; VON HARPE, A.; KUNATH, K.; PETERSEN, H.; LI, Y.; KISSEL, T. Copolymers of Ethylene Imine and N-(2-Hydroxyethyl)-ethylene Imine as Tools To Study Effects of Polymer Structure on Physicochemical and Biological Properties of DNA Complexes. *Bioconjugate Chem.* 13:1124-1133; **2002**.
- [846] KUKOWSKA-LATALLO, J. F.; BIELINSKA, A. U.; JOHNSON, J.; SPINDLER, R.; TOMALIA, D. A.; BAKER, J. R. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:4897-4902; **1996**.
- [847] MENUET, S.; FONTANAY, S.; CLAROT, I.; DUVAL, R. E.; DIEZ, L.; MARSURA, A. Synthesis and Complexation Ability of a Novel Bis- (guanidinium)-tetrakis-(β -cyclodextrin) Dendrimeric Tetrapod as a Potential Gene Delivery (DNA and siRNA) System. Study of Cellular siRNA Transfection. *Bioconjugate Chem.* 19:2357-2362; **2008**.
- [848] FELGNER, P. L.; GADEK, T. R.; HOLM, M.; ROMAN, R.; CHAN, H. W.; WENZ, M.; NORTHROP, J. P.; RINGOLD, G. M.; DANIELSEN, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:7413-7417; **1987**.
- [849] CHU, G.; HAYAKAWA, H.; BERG, P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Research* 15:1311-1326; **1987**.
- [850] SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5:27-37; **1987**.
- [851] KLEIN, R. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* 24:384-386; **1992**.
- [852] TSUKAKOSHI, M.; KURATA, S.; NOMIYA, Y.; IKAWA, Y.; KASUYA, T. A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. *Applied Physics B* 35:135-140; **1984**.
- [853] SCHERER, F.; ANTON, M.; SCHILLINGER, U.; HENKE, J.; BERGEMANN, C.; KRUGER, A.; GANSBACHER, B.; PLANK, C. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* 9:102-109; **2002**.
- [854] SONG, Y.; HAHN, T.; THOMPSON, I. P.; MASON, T. J.; PRESTON, G. M.; LI, G.; PANIWNKY, L.; HUANG, W. E. Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria. *Nucleic Acids Res* 35:e129; **2007**.
- [855] FELGNER, J. H.; KUMAR, R.; SRIDHAR, C. N.; WHEELER, C. J.; TSAI, Y. J.; BORDER, R.; RAMSEY, P.; MARTIN, M.; FELGNER, P. L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 269:2550-2561; **1994**.
- [856] GREEN, C. L.; LOECHLER, E. L.; FOWLER, K. W.; ESSIGMANN, J. M. Construction and characterization of extrachromosomal probes for mutagenesis by carcinogens: site-specific incorporation of O⁶-methylguanine into viral and plasmid genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:13-17; **1984**.
- [857] MASSICH, M. D.; GILJOHANN, D. A.; SCHMUCKER, A. L.; PATEL, P. C.; MIRKIN, C. A. Cellular response of polyvalent oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates. *ACS Nano* 4:5641-5646; **2010**.
- [858] ZHENG, D.; GILJOHANN, D. A.; CHEN, D. L.; MASSICH, M. D.; WANG, X.-Q.; IORDANOV, H.; MIRKIN, C. A.; PALLER, A. S. Topical delivery of siRNA-based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:11975-11980; **2012**.
- [859] CREW, E.; RAHMAN, S.; RAZZAK-JAFFAR, A.; MOTT, D.; KAMUNDI, M.; YU, G.; TCHAH, N.; LEE, J.; BELLAVIA, M.; ZHONG, C.-J. MicroRNA Conjugated Gold Nanoparticles and Cell Transfection. *Anal. Chem.* 84:26-29; **2011**.

- [860] DULKEITH, E.; MORTEANI, A. C.; NIEDEREICHHOLZ, T.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; LEVI, S. A.; VAN VEGGEL, F. C.; REINHOUDT, D. N.; MOLLER, M.; GITTINS, D. I. Fluorescence quenching of dye molecules near gold nanoparticles: radiative and nonradiative effects. *Phys Rev Lett* 89:203002; **2002**.
- [861] LING, J.; HUANG, C. Z. Energy transfer with gold nanoparticles for analytical applications in the fields of biochemical and pharmaceutical sciences. *Analytical Methods* 2:1439-1447; **2010**.
- [862] MAXWELL, D. J.; TAYLOR, J. R.; NIE, S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *J Am Chem Soc* 124:9606-9612; **2002**.
- [863] ROSA, J. O.; CONDE, J. O.; DE LA FUENTE, J. M.; LIMA, J. O. C.; BAPTISTA, P. V. Gold-nanobeacons for real-time monitoring of RNA synthesis. *Biosensors and Bioelectronics* 36:161-167; **2011**.
- [864] XUE, J.; SHAN, L.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHU, H.; DENG, D.; QIAN, Z.; ACHILEFU, S.; GU, Y. Visual detection of STAT5B gene expression in living cell using the hairpin DNA modified gold nanoparticle beacon. *Biosensors and Bioelectronics*; **2013**.
- [865] DUBERTRET, B.; CALAME, M.; LIBCHABER, A. J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 19:365-370; **2001**.
- [866] DU, H.; DISNEY, M. D.; MILLER, B. L.; KRAUSS, T. D. Hybridization-based unquenching of DNA hairpins on Au surfaces: Prototypical "molecular beacon" biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* 125:4012-4013; **2003**.
- [867] WU, Z.-S.; JIANG, J.-H.; FU, L.; SHEN, G.-L.; YU, R.-Q. Optical detection of DNA hybridization based on fluorescence quenching of tagged oligonucleotide probes by gold nanoparticles. *Analytical Biochemistry* 353:22-29; **2006**.
- [868] JAYAGOPAL, A.; HALFPENNY, K. C.; PEREZ, J. W.; WRIGHT, D. W. Hairpin DNA-functionalized gold colloids for the imaging of mRNA in live cells. *J Am Chem Soc* 132:9789-9796; **2011**.
- [869] TAN, D.; HE, Y.; XING, X.; ZHAO, Y.; TANG, H.; PANG, D. Aptamer functionalized gold nanoparticles based fluorescent probe for the detection of mercury (II) ion in aqueous solution. *Talanta* 113:26-30; **2013**.
- [870] CHEN, C.; ZHOU, D.; TANG, H.; LIANG, M.; JIANG, J. A sensitive, homogeneous fluorescence assay for detection of thymine DNA glycosylase activity based on exonuclease-mediated amplification. *Chem. Commun.*; **2013**.
- [871] ROSI, N. L.; GILJOHANN, D. A.; THAXTON, C. S.; LYTTON-JEAN, A. K.; HAN, M. S.; MIRKIN, C. A. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science* 312:1027-1030; **2006**.
- [872] GILJOHANN, D. A.; SEFEROS, D. S.; PRIGODICH, A. E.; PATEL, P. C.; MIRKIN, C. A. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc* 131:2072-2073; **2009**.
- [873] KIM, D. W.; KIM, J. H.; PARK, M.; YEOM, J. H.; GO, H.; KIM, S.; HAN, M. S.; LEE, K.; BAE, J. Modulation of biological processes in the nucleus by delivery of DNA oligonucleotides conjugated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 32:2593-2604; **2011**.
- [874] ROSENTHAL, S. J.; CHANG, J. C.; KOVTUN, O.; MCBRIDE, J. R.; TOMLINSON, I. D. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chem Biol* 18:10-24; **2011**.
- [875] CHANG, E.; MILLER, J. S.; SUN, J.; YU, W. W.; COLVIN, V. L.; DREZEK, R.; WEST, J. L. Protease-activated quantum dot probes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334:1317-1321; **2005**.
- [876] YEH, H. Y.; YATES, M. V.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Molecular beacon-quantum dot-Au nanoparticle hybrid nanoprobe for visualizing virus replication in living cells. *Chem Commun (Camb)* 46:3914-3916; **2010**.
- [877] CADY, N. C.; STRICKLAND, A. D.; BATT, C. A. Optimized linkage and quenching strategies for quantum dot molecular beacons. *Mol Cell Probes* 21:116-124; **2007**.

[878] DYADYUSHA, L.; YIN, H.; JAISWAL, S.; BROWN, T.; BAUMBERG, J. J.; BOOY, F. P.; MELVIN, T. Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing. *Chem. Commun.*:3201-3203; **2005**.

[879] GUEROUI, Z.; LIBCHABER, A. Single-molecule measurements of gold-quenched quantum dots. *Phys Rev Lett* 93:166108; **2004**.

[880] CHOI, Y.; CHO, Y.; KIM, M.; GRAILHE, R.; SONG, R. Fluorogenic Quantum Dot-Gold Nanoparticle Assembly for Beta Secretase Inhibitor Screening in Live Cell. *Anal. Chem.* 84:8595-8601; **2012**.

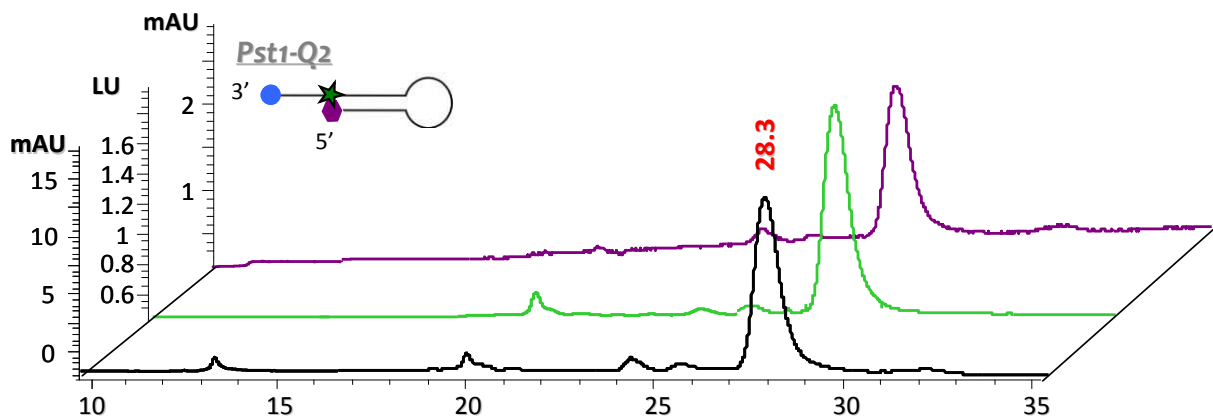
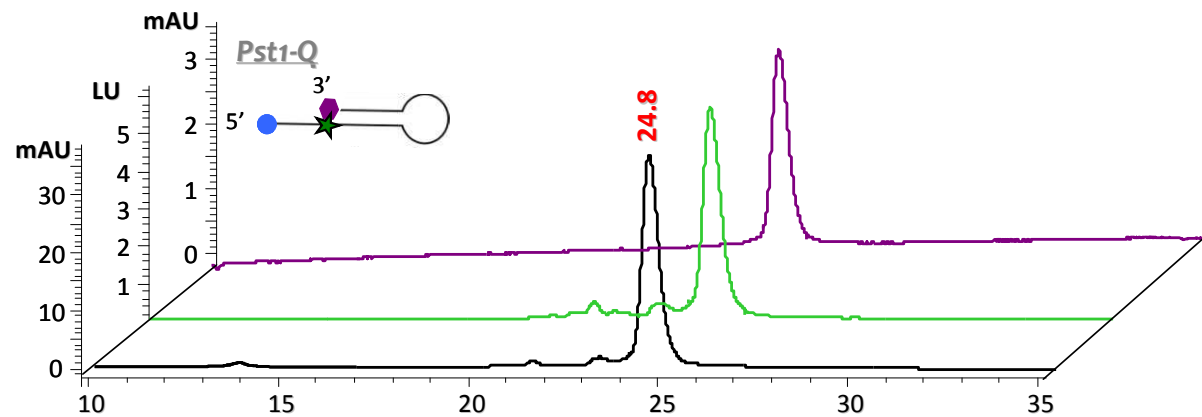
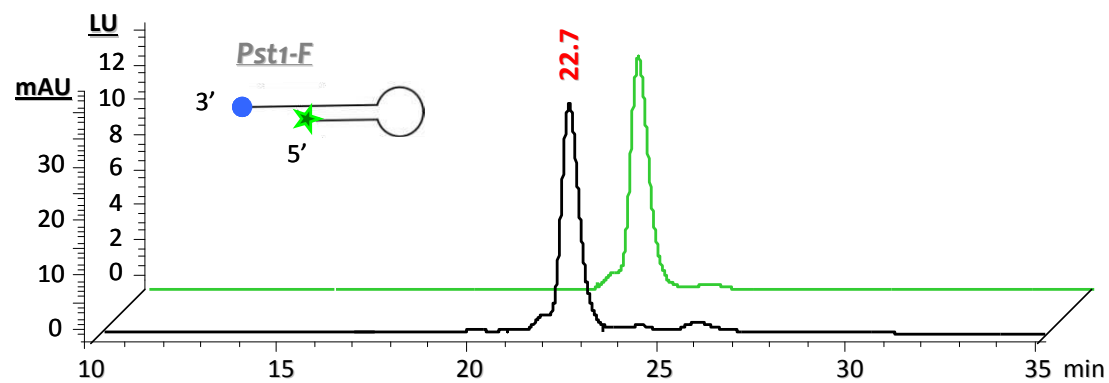
ANNEXES

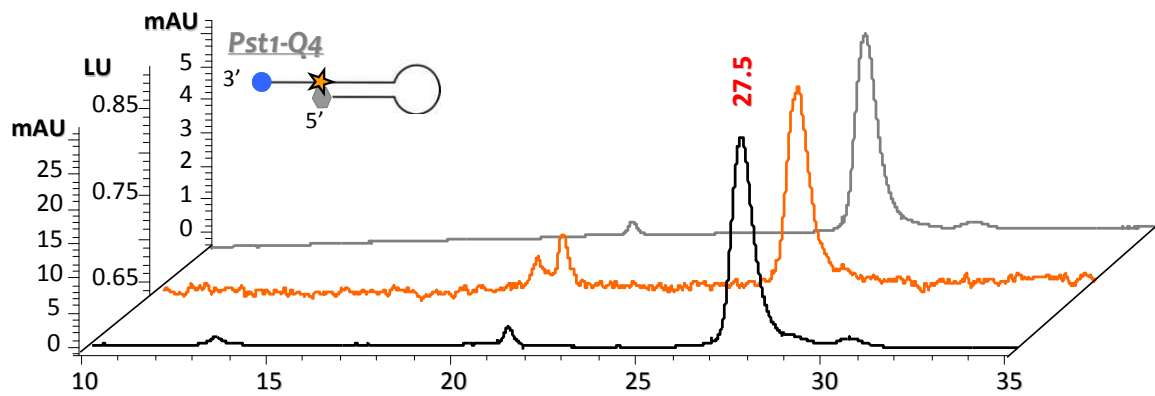
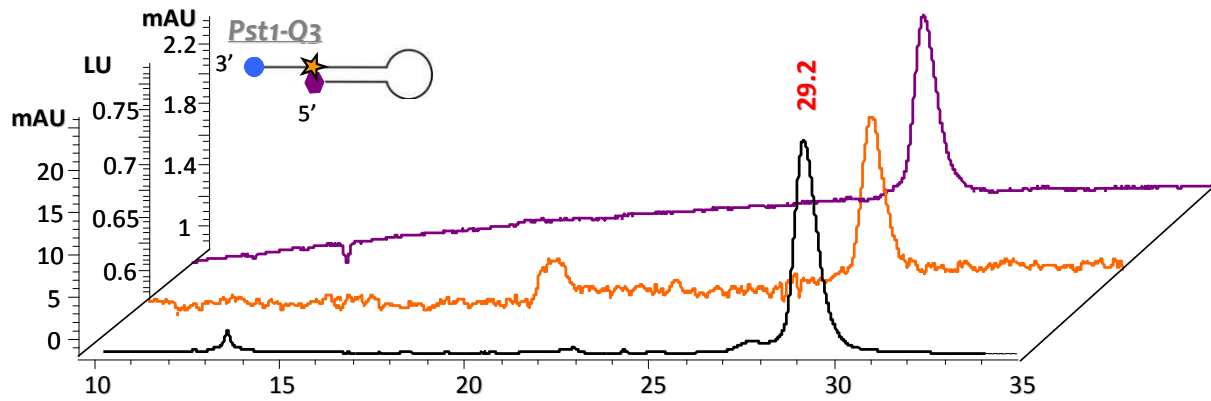
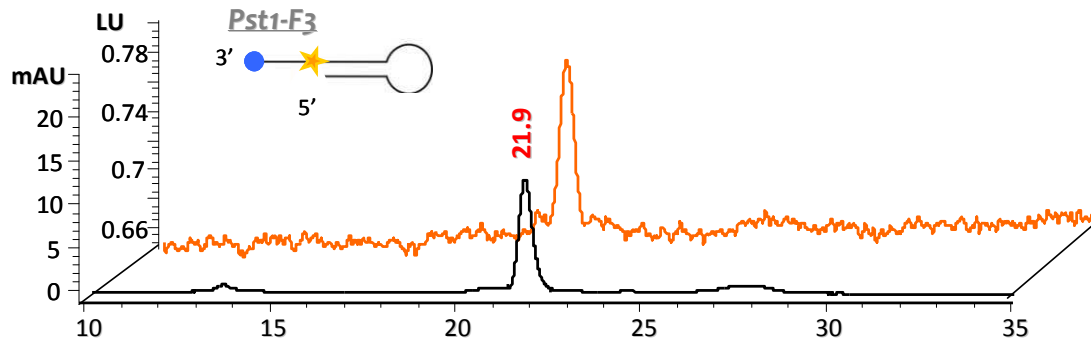
Annexe 1 : Analyses HPLC des oligonucléotides non lésés Pst1	296
Annexe 2 : Rapport de stage M2 de Charlotte Brusa (de janvier à juin 2012)	298
Annexe 3 : Liste des communications scientifiques et publications.....	324
<i>Publications</i>	324
<i>Communications Orales</i>	324
<i>Communications par poster</i>	324

Annexe 1 : Analyses HPLC des oligonucléotides non lésés Pst1

Colonne C18 250 x 4.6 mm, 5 μ m, 50°C; gradient 0-35 % ACN dans TEAA 10 mM en 40 min :

- Détection en absorbance (mAU) de l'ADN (chromatogramme noir) : $\lambda = 260$ nm
- Détection en absorbance (mAU) du dabcyI (chromatogramme violet) : $\lambda = 453$ nm
- Détection en absorbance (mAU) du BHQ2 (chromatogramme gris) : $\lambda = 549$ nm
- Détection en fluorescence (LU) du cy3 (chromatogramme vert): $\lambda_{ex} = 546$ nm, $\lambda_{em} = 563$ nm
- Détection en fluorescence (LU) du cy5 (chromatogramme orange): $\lambda_{ex} = 649$ nm, $\lambda_{em} = 670$ nm





Annexe 2 : Rapport de stage M2 de Charlotte Brusa (de janvier à juin 2012)

L'étude présentée dans ce rapport est le résumé des travaux de Charlotte Brusa dans le cadre de son stage de Master 2 Chimie Bio-organique et Bio-Inorganique de l'Université Joseph Fourier de Grenoble. Elle présente le développement des tests de détection par cytométrie en flux, in vitro et in vivo, de l'activité APE1. Les expériences ont notamment été conduites à partir des lignées cellulaires sauvage et déficiente faisant référence aux lignées KD-CTRL et KD-APE1 précédemment exposées dans le présent manuscrit.

Sondes nucléiques profluorescentes pour l'analyse
de la réparation de l'ADN par cytométrie en flux

ABREVIATIONS	1
I/ INTRODUCTION	2
A/ LES DOMMAGES DE L'ADN	2
B/ LES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN	3
C/ CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	4
II/ RESULTATS ET DISCUSSION	6
A/ LES SONDES D'ACIDES NUCLEIQUES PROFLUORESCENTES	6
B/ IMMOBILISATION DES SONDES SUR BILLES POUR L'ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX <i>IN VITRO</i>	8
1/ IMMOBILISATION SUR BILLES	8
2/ DIGESTION ENZYMATIQUE DES ODN IMMOBILISES SUR BILLES	8
a) Mesure d'activités enzymatiques à partir de protéines purifiées	9
b) Mesure d'activités enzymatiques à partir d'extraits nucléaires HeLa	10
c) Mesure d'activités enzymatiques à partir d'extraits nucléaires knockdown	11
d) Inhibition de l'activité AP-endonucléase par la méthoxyamine	12
C/ TRANSFECTION DES ODN POUR L'ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	13
1/ ETUDE SUR LE CHOIX DE L'AGENT DE TRANSFECTION	14
2/ ETUDE CINETIQUE DE LA TRANSFECTION AVEC ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES CELLULES ..	15
III/ CONCLUSION	17
IV/ MATERIELS ET METHODES	18
V/ BIBLIOGRAPHIE	24

Abréviations

A	Adénine
Aag	Alkyl Adénine Glycosylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Apurinique/Apyrimidique
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
BER	Réparation par excision de base
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Cytosine
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DTT	Dithioréthiol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
G	Guanine
APE1	AP-endonucléase humaine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
KD	Knockdown
Mx	Méthoxyamine
ODN	Oligonucléotide
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldéhyde
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
Pst1	Enzyme de restriction PstI
ROS	Reactive Oxygen Species
shRNA	Small hairpin RNA
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T	Thymine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEAA	Triéthylammonium acétate
TEMED	Tétraméthylethylenediamine
THF	Tétrahydrofurane
UV	Ultra-Violet

I – INTRODUCTION

L'ADN est constitué de 3 milliards de paires de bases qui définissent les caractères génétiques de chaque individu. Il est crucial de conserver l'intégrité du génome or l'ADN est soumis à de nombreux stress pouvant l'endommager [1,2]. Les sources de ces dommages peuvent être soit d'origine endogène [3], causées par des produits ou sous produits du métabolisme cellulaire tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit exogène causées par des facteurs environnementaux tel que le rayonnement solaire (UV) ou des agents génotoxiques (cigarette, rejet industriel,...). Ces lésions peuvent entraîner des mutations, c'est-à-dire une modification de la séquence du génome qui peuvent induire un cancer ou causer la mort programmée des cellules (apoptose) par l'arrêt du cycle cellulaire ou par l'arrêt des processus de réplication et de transcription de l'ADN.

Pour contrecarrer les effets délétères de ces lésions, les cellules ont développé des mécanismes de réparation qui interviennent efficacement et spécifiquement sur chaque type de lésions et participent au maintien de l'intégrité du génome. Dans un premier temps, nous décrirons les divers types de dommages de l'ADN puis nous exposerons les systèmes de réparation cellulaires qui ont été mis au point pour les réparer.

A) Les dommages de l'ADN

La réaction chimique la plus simple mais potentiellement la plus dangereuse pour l'ADN est l'hydrolyse. La liaison N-glycosidique reliant la base et le sucre y est très sensible et conduit à la formation de sites abasiques (sites AP). Ces sites correspondent à une perte de l'information génétique et sont donc hautement mutagènes. Ils sont également très labiles et peuvent provoquer des cassures simple-brin. Une seconde réaction d'hydrolyse est la désamination des amines exocycliques des bases cytosine, 5-méthyl cytosine, adénine et guanine formant les bases uracile, thymine, hypoxanthine et xanthine respectivement. Ces réactions peuvent être mutagènes et causer des mésappariements durant la réplication.

Plusieurs espèces réactives pouvant modifier l'ADN sont générées par le métabolisme cellulaire. Notamment, les espèces réactives de l'oxygène (O_2^- , $HO\cdot$ et H_2O_2) qui conduisent à des modifications oxydatives de l'ADN. La plus fréquente est la 8-oxo-guanine qui est mutagène et bloque la transcription.

Des agents alkylants peuvent provoquer des modifications au sein de la séquence d'ADN. Les cofacteurs des réactions enzymatiques tels que la S-adénosylméthylguanine, un donneur de groupement méthyle, peuvent accidentellement méthyliser l'ADN (O^6 et N^7 de la guanine, N^3 de l'adénine). Il existe également des agents alkylants utilisés en chimiothérapie comme les sels de

platine qui provoquent des pontages inter- ou intra-brins. Ils provoquent une distorsion de l'ADN et bloquent le processus de réplication et induisent la mort cellulaire.

Les facteurs environnementaux sont également une source de dommages. Les lésions causées par les UV sont de types photo-adduits entre pyrimidines adjacentes, principalement des dimères de cyclobutane et des (6-4)-photo-adduits.

B) Les systèmes de réparation de l'ADN

Les organismes ont su mettre au point des mécanismes efficaces pour réparer les dommages causés et maintenir l'intégrité du génome [1]. Ils sont capables de réparer plus ou moins spécifiquement chaque type de lésions, un système pouvant réparer un ou plusieurs types de lésions (figure 1).

La réparation par réversion directe (RR) est spécialisée dans la réparation des adduits O⁶-alkylguanine. Une enzyme, l'alkylguanine transférase (AGT) catalyse le transfert du groupement alkyle de l'oxygène en position 6 de la guanine sur une de ses cystéines. Cette réaction est irréversible et conduit à l'inactivation de cette enzyme puis à sa dégradation par protéolyse.

La réparation des mésappariements (MMR) est impliquée dans les processus de réparation de bases mal appariées (mismatch). Une activité exonucléasique permet la dégradation du brin contenant le mésappariement. Chez l'homme, le brin contenant la base incorrecte par rapport à l'autre brin est discernable grâce à la présence d'interruptions de brins à distance de la lésion. Puis une nouvelle synthèse est effectuée et assure la restauration de la continuité du brin.

L'oxydation, la désamination et l'alkylation des bases sont prises en charge par la réparation par excision de base (BER) qui sera détaillée dans le paragraphe suivant.

L'élimination des lésions volumineuses comme les dimères de pyrimidines et les adduits de platine est assurée par la réparation par excision de nucléotide (NER). De nombreuses enzymes sont impliquées et conduisent à libérer un fragment de 24 à 32 nucléotides autour de la lésion, chez les eucaryotes. Une ADN polymérase et une ADN ligase sont nécessaires pour effectuer une nouvelle synthèse du brin.

La réparation par recombinaison de l'ADN est mise en jeu lors des cassures double-brin ; il existe deux grandes voies. La réparation par recombinaison homologue (HRR) est un mécanisme assez lent qui utilise le chromosome homologue non endommagé pour assurer une réplication fidèle de la lésion et la réparation par recombinaison non homologue (NHEJ) est plus rapide mais le manque de fidélité peut conduire à l'insertion ou à la délétion de quelques nucléotides au moment de la jonction.

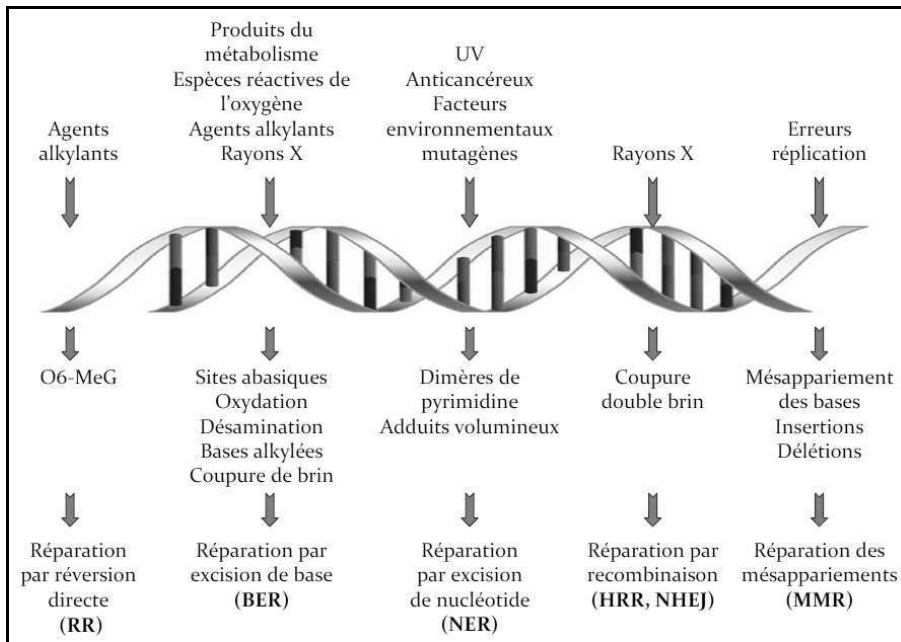


Figure 1 : Les sources de dommages de l'ADN, les différents types de lésions et les systèmes de réparation associés [1].

C) Contexte et objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu précédemment, les organismes possèdent de nombreux mécanismes de réparation qui permettent de corriger une grande diversité des dommages. Ils jouent un rôle important dans la carcinogénèse, la mutagénèse et la résistance aux agents génotoxiques. Cependant, ils apparaissent également comme impliqués dans la résistance des cellules cancéreuses aux dommages induits par un certain nombre d'agents anticancéreux [4]. En effet, ces systèmes de réparation jouent un rôle antagoniste au traitement en diminuant ou en réparant les dommages induits. Il est donc nécessaire d'en comprendre les mécanismes et de trouver des inhibiteurs potentiels pour améliorer la recherche en cancérologie [2,5].

C'est dans ce contexte que la mise au point d'outils permettant la détection et la quantification des enzymes de la réparation au sein d'un organisme est importante. Cela permettrait d'adapter les traitements thérapeutiques en fonction de l'activité de réparation des patients et le développement d'inhibiteurs.

Au cours de cette étude, nous nous sommes principalement intéressés à la réparation par excision de bases (BER) [6, 7], qui répare les lésions peu volumineuses causées par oxydation, désamination et alkylation des bases de l'ADN (figure 2).

Les bases lésées sont reconnues spécifiquement puis excisées par des enzymes appelées ADN glycosylases, qui hydrolysent le lien N-glycosidique en formant un site abasique (AP). Ce site est

ensuite reconnu par une endonucléase apurinique (APE1) qui coupe le lien phosphodiester en 5' du site AP pour générer une interruption du brin d'ADN. Il existe des ADN glycosylases bifonctionnelles qui possèdent également une activité AP-lyase. Le résidu sucre-phosphate restant est ensuite éliminé par une 3'-phosphodiesterase laissant un trou d'un nucléotide dans le brin endommagé. Enfin, une ADN polymérase et une ADN ligase ont pour rôle de re-insérer le bon nucléotide et de restaurer la continuité du brin d'ADN.

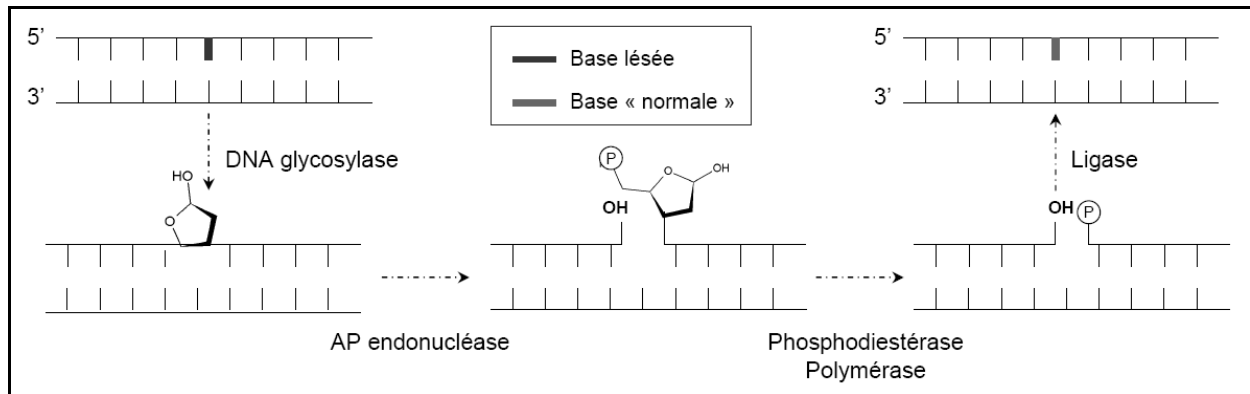


Figure 2 : Schéma du mécanisme de réparation par excision de base (BER).

Dans le but d'étudier l'activité des enzymes de la BER, des sondes oligonucléotidiques ont été développées au laboratoire [8]. Ces sondes possèdent une structure autoccomplémentaire en épingle à cheveux (« hairpins »), mimant un double brin d'ADN. L'atout majeur de ce type de sonde est l'incorporation sélective d'un nucléotide lésé qui la rend substrat d'une ou plusieurs enzymes de la BER [9]. Des travaux précédents ont utilisé ce type de sondes appelées « molecular beacon » [10] où les extrémités 3' et 5' étaient modifiées par 2 chromophores, un fluorophore et un quencher de fluorescence. Lorsque le MB est hybridé, la proximité des 2 chromophores conduit à l'extinction de la fluorescence. Lorsque les enzymes de la BER reconnaissent la lésion, l'oligonucléotide est clivé au niveau du nucléotide lésé [11]. Le fragment contenant le fluorophore se déshybride de celui contenant le quencher induisant une augmentation de la fluorescence. Ainsi, l'activité de réparation peut être visualisée en temps réel par la détection d'une variation de fluorescence.

La suite des recherches menées au laboratoire a consisté à transférer ces tests de détection enzymatique en solution vers des systèmes supportés. Cela a été réalisé sur lames par Mélanie Flaender [12] puis plus récemment sur billes (sujet de thèse actuel de Guillaume Gines au LAN). Ces billes sont de tailles micrométriques et ont la propriété d'être magnétiques. Le greffage des oligonucléotides est réalisé de manière aisée et efficace par interaction streptavidine-biotine. Ce format en fait un outil de choix car il permet une analyse fluorescente haut débit et miniaturisée, contrairement à l'utilisation d'autres méthodes comme l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide couplée à un marquage radioactif ou encore la spectrométrie de masse. Ces sondes étant composées

d'oligonucléotides, donc biocompatibles, peuvent également être transfectées au sein de cellules pour une analyse des activités enzymatiques directement *in cellulo*.

L'objectif de mon stage a été de travailler au développement de nouveaux systèmes d'analyse des activités de réparation de l'ADN en utilisant la cytométrie en flux :

- ***in vitro*** : en immobilisant sur billes micrométriques les ODN puis en réalisant une analyse par cytométrie en flux.
- ***in cellulo*** : en transfectant les sondes nucléiques dans les cellules puis en réalisant une analyse par cytométrie en flux.

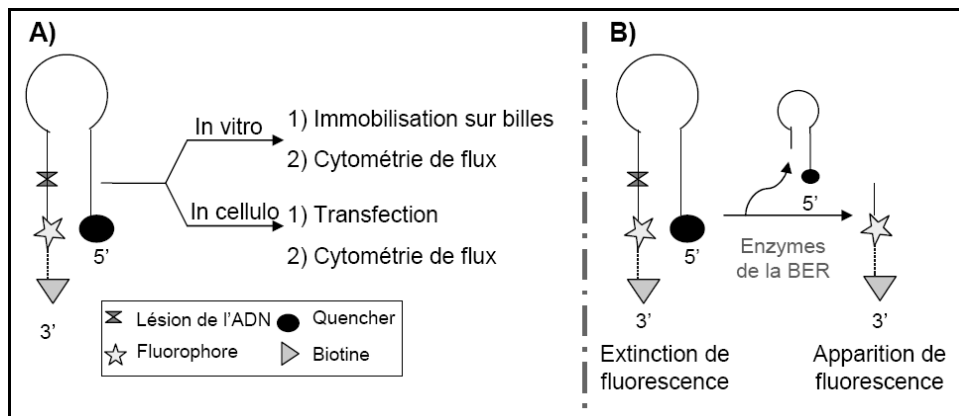


Figure 3 : A) Résumé graphique de l'objectif de mon stage ; B) Schéma du principe des sondes profluorescentes.

II – RESULTATS ET DISCUSSION

A) Les sondes d'acides nucléiques profluorescentes

Les oligonucléotides ont été synthétisés sur support par la voie phosphoramidite à l'aide d'un synthétiseur d'ADN. Les rendements de chaque étape sont estimés par une lecture de l'absorbance du cation diméthoxytrityle à 498 nm lors de l'étape de déprotection du 5'-OH. Le rendement d'un couplage est de l'ordre 97-98 %. Au final, on estime que 30 à 35 % des oligonucléotides présents à la surface du support possèdent la bonne séquence. Les ODN ont ensuite été purifiés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant puis par HPLC.

Les ODN ont une structure en *hairpin* (« épingle à cheveux ») ; ils possèdent à leur extrémité 3' le motif biotine triéthylène glycol, suivi de 6 thymidines non appariées servant d'espaceur. Sur le brin 3' se trouvent également la lésion de l'ADN et le fluorophore (Cyanine 5). Sur le brin

complémentaire 5' (en face du fluorophore) est positionné un résidu dabcy1 qui est le quencher de fluorescence (figure 4). L'extinction de fluorescence repose sur le principe du Förster Resonance Energy Transfer (FRET).

Les sondes que nous allons utilisées sont donc initialement quenchées. Ceci signifie qu'elles ne fluorescent pas puis suite à l'activité des enzymes de la BER, ces dernières vont couper le brin d'ADN, libérant un fragment contenant le dabcy1. Les 2 chromophores sont alors séparés spatialement (absence de FRET), ce qui conduit à une apparition de fluorescence. Cette méthode de marquage fluorescent possède de nombreux avantages et une alternative au marquage radioactif [13], notamment sur l'absence d'exposition à des rayonnements pour les manipulateurs et l'élimination des déchets.

L'intérêt des sondes que nous utilisons est qu'elles sont spécifiques d'une enzyme donnée. Lors de nos expériences, nous avons utilisé principalement deux types de sondes (figure 4) :

- La sonde *Pst1Q2cy5* qui ne possède pas de lésion mais le site de restriction de l'enzyme de restriction Pst1. Dans nos différentes expériences, cette sonde sera utilisée comme témoin négatif car non substrat des enzymes de la BER.

- La sonde *THFQ2cy5* contenant le tétrahydrofurane (THF) qui mime le site abasique ; c'est un analogue stable et moins réactif que le site AP (qui peut conduire à des β -éliminations puis à des coupures simples brins). En présence d'une enzyme à activité AP-endonucléase (APE1), il y aura incision de la lésion qui conduira à la génération d'une coupure de brin et à l'apparition de fluorescence.

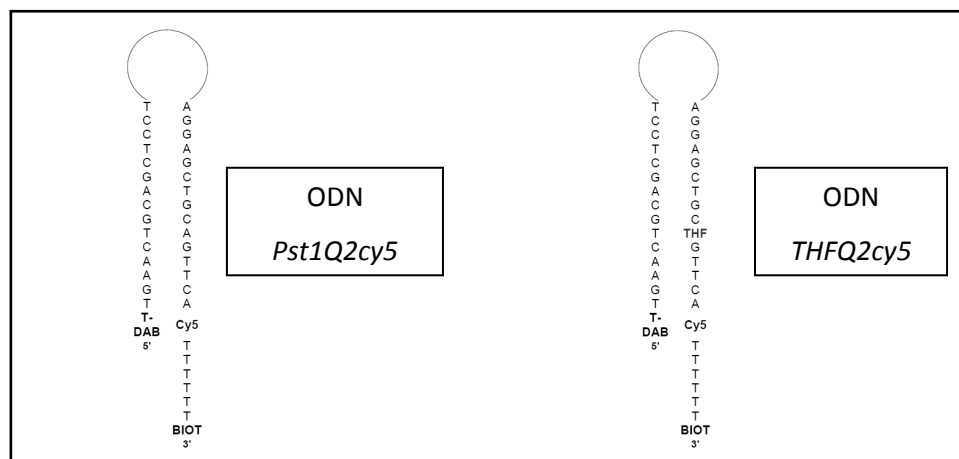


Figure 4 : Séquences ODN utilisées au cours de cette étude.

Avant toute utilisation des sondes, on effectue un contrôle qualité qui permet de vérifier leur pureté mais également leur fonctionnalité. Pour cela, 1 pmol d'ODN est incubé pendant 1h avec

l'enzyme adéquate pour générer une coupure (soit Pst1 soit APE1). Le mélange réactionnel est alors analysé par gel de polyacrylamide (PAGE).

B) Immobilisation des sondes sur billes pour l'analyse par cytométrie en flux *in vitro*

1) Immobilisation sur billes

Le motif biotine intégré aux ODN à l'extrémité 3' permet de les immobiliser sur des billes ayant à leur surface le motif streptavidine. En effet, la biotine et la streptavidine ont une affinité élevée et une des interactions non-covalentes les plus fortes connues dans la nature. Les billes utilisées sont des billes micrométriques qui possèdent un diamètre de 2,8 µm. Elles ont la propriété d'être magnétiques, ce qui facilite le changement des conditions du milieu par l'utilisation d'un aimant qui permet de les sédimenter au fond du tube et ainsi changer leur surnageant. Les conditions de greffage ont été mises au point par G. Gines lors de son stage de M2 (« *Nouvelles sondes nucléiques fluorescentes pour la détection de la réparation sur particules magnétiques* »). La mesure de la fluorescence du surnageant, grâce à un spectrofluorimètre en gouttes (NanoDrop-3300), a permis d'optimiser la quantité de billes à utiliser, le temps d'incubation et estimer le taux de greffage (~90 %). Dans le cas présent et l'utilisation de sondes quenchées, le même protocole élaboré pour les sondes fluorescentes a été utilisé, soit 15 pmol d'ODN pour 100 µg de billes, avec une incubation de 1h à 25°C.

2) Digestions enzymatiques des ODN immobilisés sur billes

Le principe du test enzymatique repose sur l'apparition de fluorescence des billes. Elles sont initialement « éteintes » et suite à l'activité des enzymes de réparation de l'ADN, elles vont « s'éclairer » (figure 5). Chaque digestion enzymatique spécifique est réalisée à partir de 1 pmol d'ODN, ce qui représente 8 µg (5 µL) de billes en solution dans un volume total de 10 µL.

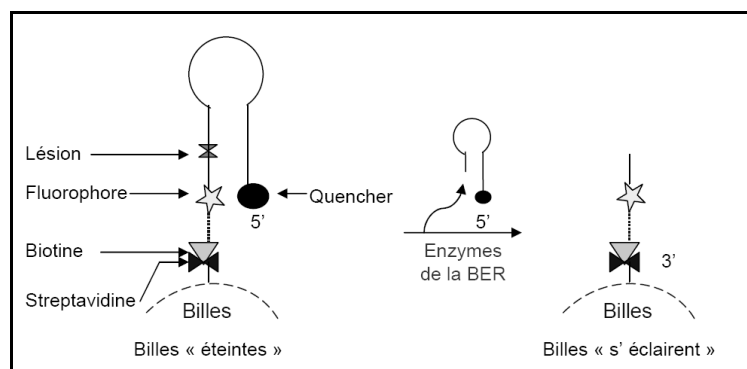


Figure 5 : Schéma d'illumination des billes.

La **cytométrie en flux** est une technique qui consiste à faire défiler très rapidement (plusieurs milliers/seconde) des particules micrométriques en suspension devant un faisceau laser, et

grâce à un flux laminaire de les séparer les unes par rapport aux autres. Pour chaque particule, plusieurs paramètres sont mesurés, ce qui permet de pouvoir les trier dans un même échantillon. On peut mesurer la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes mais aussi la taille et la granulométrie grâce à la lumière diffusée recueillie dans 2 directions différentes. Pour faire ces mesures, on utilise le FACScalibur (cf. annexe fig.D). Il possède deux sources lumineuses (laser Argon à 488 nm et diode rouge à 635 nm) puis les signaux fluorescents sont collectés par une lentille et spectralement divisés par une collection de miroirs dichroïques et de filtres. Cette technique convient donc aux billes utilisées [14] mais également aux cellules toutes deux de tailles micrométriques.

a) Mesure d'activités enzymatiques à partir de protéines purifiées

Dans un premier temps, on mesure les activités enzymatiques en utilisant une gamme d'enzymes purifiées.

Le traitement des résultats de la cytométrie en flux est réalisé à partir du logiciel FACScalibur, il permet de faire des « overlays », c'est-à-dire de rassembler sur un même graphe les mesures d'une expérience (figure 6.A.). Il permet également d'accéder à la moyenne arithmétique du signal fluorescent pour chaque mesure. L'analyse des résultats sera faite à partir d'histogrammes qui représentent l'intensité du signal fluorescent avec comme valeurs les moyennes arithmétiques obtenues, les expériences sont réalisées en triplicata.

D'après les résultats, le quenching initial n'est pas de 100 % car en absence d'enzymes, donc de coupure des ODN, la fluorescence n'est pas totalement éteinte avec une mesure du signal fluorescent de 200 en unités arbitraires. Dans nos expériences, il y aura donc un bruit de fond correspondant à cette valeur. Ceci était prévisible car le spectre d'absorption du dabcy1 ne correspond pas au spectre d'émission de la Cyanine 5 (cf. annexe fig.B/C). Le quenching initial pourrait être amélioré par l'utilisation d'un autre quencher, ce qui est une des perspectives pour améliorer le principe de nos sondes profluorescentes introduites ici.

Pour les billes fonctionnalisées par la sonde *Pst1Q2cy5*, on observe que le signal fluorescent augmente en fonction de la quantité d'enzymes présentes en solution, avec un maximum atteint à 5 unités d'enzymes. La coupure des ODN est donc dépendante de la quantité d'enzymes utilisée. Concernant les billes *THFQ2cy5*, le signal est maximum à partir de 0,25 unité d'APE1, ce qui montre l'efficacité d'excision de cette enzyme pour la lésion.

Ces deux résultats permettent de valider le test enzymatique avec une coupure spécifique des sondes nucléiques en fonction de l'enzyme utilisée et de sa quantité, et de prouver ainsi leur fonctionnalité.

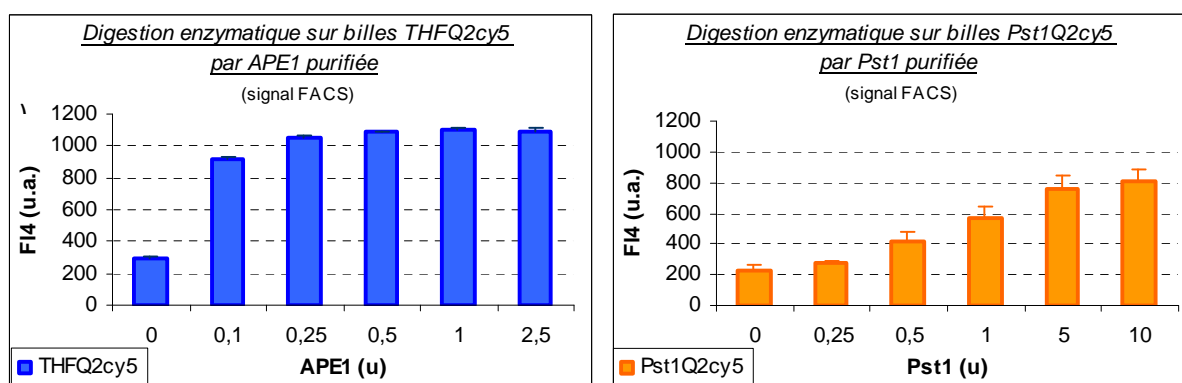
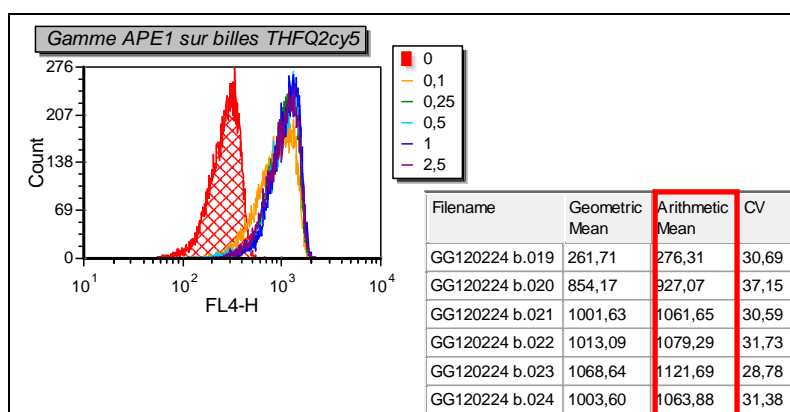


Figure 6: Digestion enzymatique des ODN sur billes par des enzymes purifiées ; A) Résultats obtenus à l'aide du logiciel FACSexpress ; B) Histogrammes obtenus à partir des « moyennes arithmétiques ».

b) Mesure d'activités enzymatiques à partir d'extraits nucléaires HeLa

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué nos tests enzymatiques aux extraits nucléaires HeLa commerciaux, avec l'utilisation d'une gamme de concentrations croissantes (figure 7).

L'utilisation des ODN dans des extraits cellulaires pose le problème de leur stabilité face aux nucléases. En effet, une dégradation des sondes en solution est observée, avec la visualisation de plusieurs bandes non caractéristiques du fragment coupé, lors de l'analyse par électrophorèse. Le changement de configuration des sondes, en immobilisant les ODN sur billes par l'extrémité 3', a permis de supprimer cette réaction.

Pour les billes fonctionnalisées par la sonde *THFQ2cy5*, à partir de 2,5 µg/mL d'extraits HeLa, l'excision du site AP par l'enzyme APE1 est maximale car le signal fluorescent atteint la valeur de 1000 en unités arbitraires. Ceci nous montre que l'enzyme APE1 a une efficacité élevée d'excision et que celle-ci est présente en quantité importante dans les extraits HeLa. On observe la diminution du

signal fluorescent à 1000 µg/mL, l'hypothèse est que l'extrait est trop concentré en protéines et celles-ci se fixent à l'ADN (de manière plus ou moins spécifique) empêchant l'excision du site AP. L'ODN *Pst1Q2cy5* n'est pas coupé par les protéines contenues dans les extraits nucléaires, car il n'y a pas de variation de fluorescence. Cela prouve que cette sonde est un bon témoin négatif et que la variation de fluorescence observée pour la sonde contenant la lésion THF n'est due qu'à l'excision de l'ODN et qu'aucune dégradation significative n'est détectée dans nos conditions opératoires.

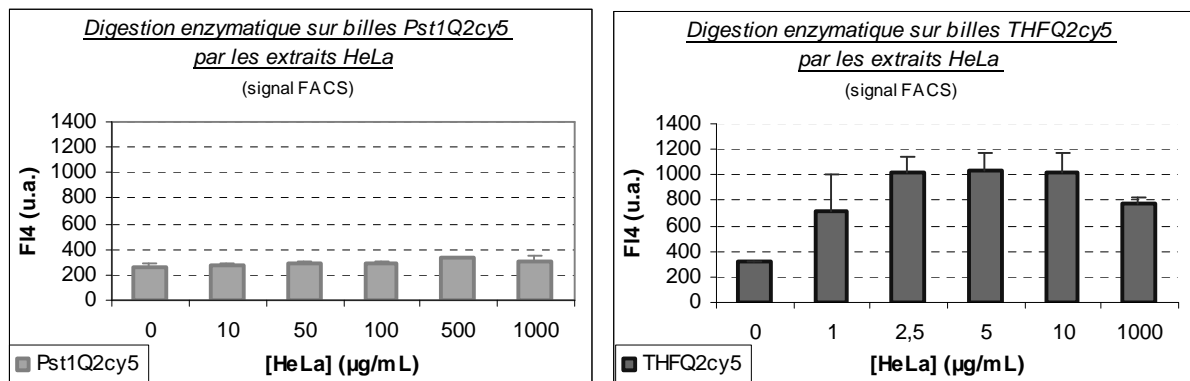


Figure 7 : Digestion enzymatique des ODN sur billes par une concentration croissante en extraits nucléaires de cellules HeLa.

c) Mesure d'activités enzymatiques à partir d'extraits nucléaires knockdown contrôle et APE1

Pour une utilisation de ces ODN comme outil de détection et de quantification des enzymes de la réparation, nous envisageons de les transférer. Cela permettrait de s'affranchir de l'étape de préparation des extraits cellulaires des patients qui suivent une thérapie anticancéreuse et ainsi accéder rapidement aux activités enzymatiques présentes pour orienter le traitement. Pour réaliser de telles expérimentations, nous avons utilisé des cellules qui sont knockdown [15] pour un gène de la réparation de l'ADN (cellules obtenues commercialement de la société *Trevigen*TM). Ces cellules sont des glioblastomes (LN428) dans lesquels il y a eu incorporation de shRNA ciblant un ARN messager transcrit spécifique d'un gène de la réparation de l'ADN. Cette technique permet de diminuer la quantité de protéines traduites APE1 à partir de l'ARN messager. Ainsi avec ces cellules, nous espérons valider nos sondes profluorescentes comme outil de quantification des protéines de réparation *in cellulo*.

Les extraits *KD APE1* sont ceux qui possèdent un shRNA ciblant l'ARN messager de la protéine APE1 et les extraits *KD Ctrl* sont les cellules qui n'ont pas d'ARN interférent.

Avant de réaliser une étude *in cellulo*, nous avons effectué des tests enzymatiques *in vitro* à partir des extraits nucléaires de ces deux lignées cellulaires.

Les résultats sont présentés en figure 7. Au cours de cette étude, nous avons effectué une analyse cinétique (figure 7.A.), grâce à un lecteur Stratagène® qui est un appareil de PCR. Il permet de mesurer la fluorescence en format microplaque, en fonction du temps. D'après les résultats, on observe que la cinétique des réactions est plus faible dans les extraits *KD APE1*. Notamment, on remarque que les cinétiques à 5 µg/mL de *KD APE1* et à 2,5 µg/mL de *KD Ctrl* sont quasi-identiques. On peut donc affirmer qu'il y a une diminution d'environ 50 % de l'activité enzymatique d'APE1 dans les extraits nucléaires *KD APE1* par rapport aux extraits *KD Ctrl*. Les résultats du FACS (figure 7.B), qui correspondent au signal fluorescent obtenu après une heure d'incubation, permettent d'observer des différences entre les deux lignées jusqu'à 2,5 µg/mL. Cependant, à partir de 5 µg/mL, la coupure est maximale pour les deux lignées et la distinction se fait uniquement en fonction de la cinétique.

En conclusion, ces résultats montrent que les sondes peuvent être utilisées comme outil de quantification des activités enzymatiques de réparation. En effet, ils permettent de confirmer que les extraits *KD APE1* ont une diminution de l'activité enzymatique d'APE1 par rapport à la lignée contrôle. Cependant, il faut se placer à des concentrations faibles de protéines et être attentif à l'aspect cinétique de la réaction si on veut différencier les deux types d'extraits. Pour la transfection, la concentration n'est pas un paramètre sur lequel on peut influencer. Il faudra « jouer » sur l'aspect cinétique, et réaliser l'observation à des temps relativement courts (à déterminer).

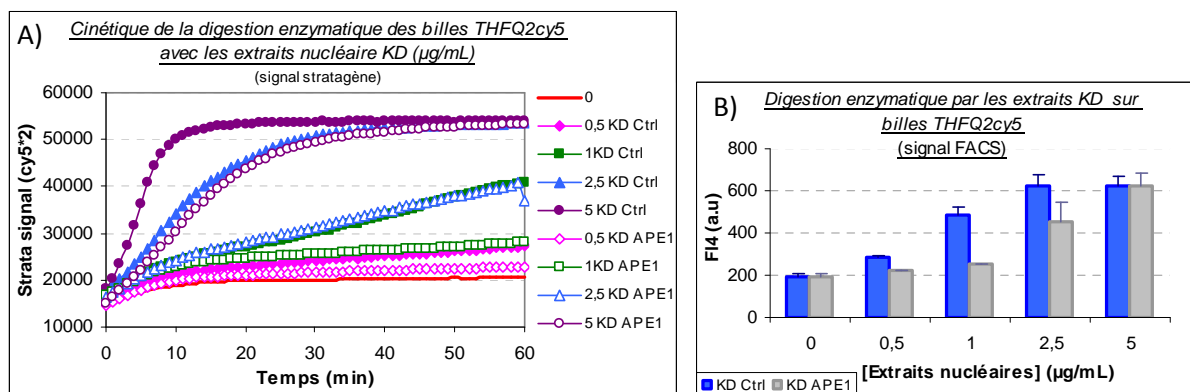


Figure 7 : Digestion enzymatique par les extraits knockdown sur billes-THFQ2cy5. A) Etude cinétique ; B) Signal FACS

d) Inhibition de l'activité AP-endonucléase par la méthoxyamine

La méthoxyamine (Mx) est une molécule organique capable d'inhiber l'action des AP-endonucléases en réagissant avec le site abasique [16]. La fonction amine de l'inhibiteur réagit avec la fonction aldéhyde de la forme ouverte du site abasique conduisant à la formation d'un éther

d'oxime (cf. annexe fig.F). La formation de cet adduit est un intermédiaire stable qui empêche l'activité lyase d'APE1.

Nous avons voulu vérifier si le système des sondes immobilisées sur billes est capable de mettre en évidence cette activité d'inhibition, mais également si la diminution de l'activité AP-lyase des extraits *KD APE1* (confirmée par l'expérience précédente) entraîne une concentration moins importante en méthoxyamine pour inhiber l'action des enzymes AP-endonucléases par rapport aux cellules *KD Ctrl*.

Pour ce faire, nous avons utilisé un ODN fluorescent contenant la lésion Inosine (InoF2). Lors du processus BER, la glycosylase Aag (Adénine Alkyl Glycosylase) [17] excise l'inosine formant un site basique. Lors de notre étude, nous avons utilisé 0,05 u d'Aag purifiée (permettant la formation du site AP), les extraits KD à 5 µg/mL puis une concentration croissante en méthoxyamine. Nous avons choisi une concentration d'extraits à 5 µg/mL car cela correspond à la concentration à laquelle les deux extraits KD ont la même efficacité d'excision, après une heure d'incubation.

Les résultats obtenus (figure 8) nous montrent que la coupure du site AP de la sonde *InoF2* est inhibée par la Mx et que celle-ci est directement corrélée à la concentration en Mx. On observe également une « tendance » entre les deux extraits KD, l'inhibition est plus importante dans les extraits *KD APE1* que pour les extraits *KD Ctrl* aux mêmes concentrations en Mx. Les résultats obtenus à 10 mM ne sont pas représentatifs. En effet à cette concentration, précisément lors de l'analyse par FACS, on observe que les billes s'agglomèrent fortement entre elles.

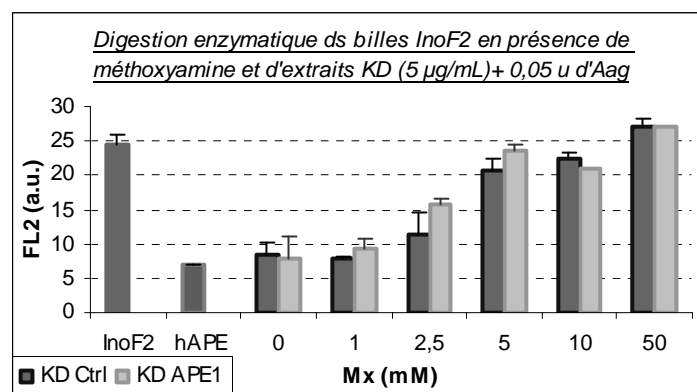


Figure 8 : Digestion enzymatique par les extraits knockdown (5 µg/mL) sur billes InoF2 en présence de méthoxyamine.

C) Transfection des ODN pour l'analyse par cytométrie en flux

Pour effectuer cette étude, nous avons travaillé avec le laboratoire Biopuces du CEA de Grenoble qui possède une expertise reconnue dans le domaine de la transfection et qui nous a

fournit le matériel nécessaire. Dans un premier temps, nous avons fait une étude sur le choix de l'agent de transfection puis ensuite nous avons transfecté des ODN et arrêté la transfection à différents temps donnés.

1) Etude sur le choix de l'agent de transfection

Il a été nécessaire de choisir quel agent de transfection était le mieux adapté à notre étude. Pour chaque type cellulaire, un agent de transfection est le plus adapté et celui-ci est également choisi en fonction du « produit » à transférer (ARN, ADN, plasmide, ...). Nous avons testé deux agents de transfection : la lipofectamine 2000 et la lipofectamine RNAimax (*Invitrogen*TM). Comme leur nom l'indique, le principe de ces deux agents est de former un liposome englobant les ODN qui peut fusionner avec la membrane puisqu'ils sont tous les deux composés d'une bicouche de phospholipides, et ainsi permettre l'entrée des ODN dans la cellule.

Pour ce faire, nous avons transfecté des ODN possédant le fluorophore Cyanine 3 : un 20 mer linéaire, un « *hairpin* » (*HdG*) et un « *hairpin* » quenché (*HdG*), contenant aucune base lésée. Les résultats présentés sont obtenus 24h après transfection ; nous avons réalisé une observation au microscope inversé et une analyse par cytométrie en flux. Les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde, qui stabilise les tissus et permet une conservation de la localisation (les différentes molécules de la cellule sont pontées en les intégrant à un maillage plus ou moins fin - cf. annexe IV).

L'observation au microscope, nous a permis de mettre en évidence que les cellules étaient transfectées car on observait les sondes Cy3 dans les cellules avec le filtre adapté (cf. annexe fig.G). Cependant cela ne nous a pas donné d'information concrète, notamment sur la localisation car le grossissement utilisé n'était pas assez important.

Les analyses par cytométrie en flux sont présentées en figure 8. Pour évaluer le taux de transfection, nous avons ajouté un quadrillage sur le « plot » des cellules non transfectées qui permet de délimiter quatre zones (figure 9.A). Pour les cellules transfectées, celles qui sont en bas à gauche sont considérées comme négatives pour la transfection, tandis que les cellules en bas à droites sont positives (Figure 9.B). Les résultats sont présentés sous forme de tableau indiquant pour chaque condition ; le pourcentage de cellules transfectées et la mesure du signal fluorescent de la Cy3 (filtre F12) (Figure 9.C).

Nous remarquons que la transfection des cellules *KD Ctrl* est d'environ 100 % pour les deux agents de transfection, cependant l'intensité du signal fluorescent est plus élevée pour la lipofectamine 2000. Pour les cellules *KD APE1*, la transfection a une efficacité proche des 55-60 % et

le signal fluorescent est plus élevé pour la lipofectamine 2000 également. On observe que le signal fluorescent de la sonde quenchée est identique à celle non quenchée. Cela montre qu'il y a eu une dégradation importante des sondes par les nucléases cellulaires et/ou par le PFA.

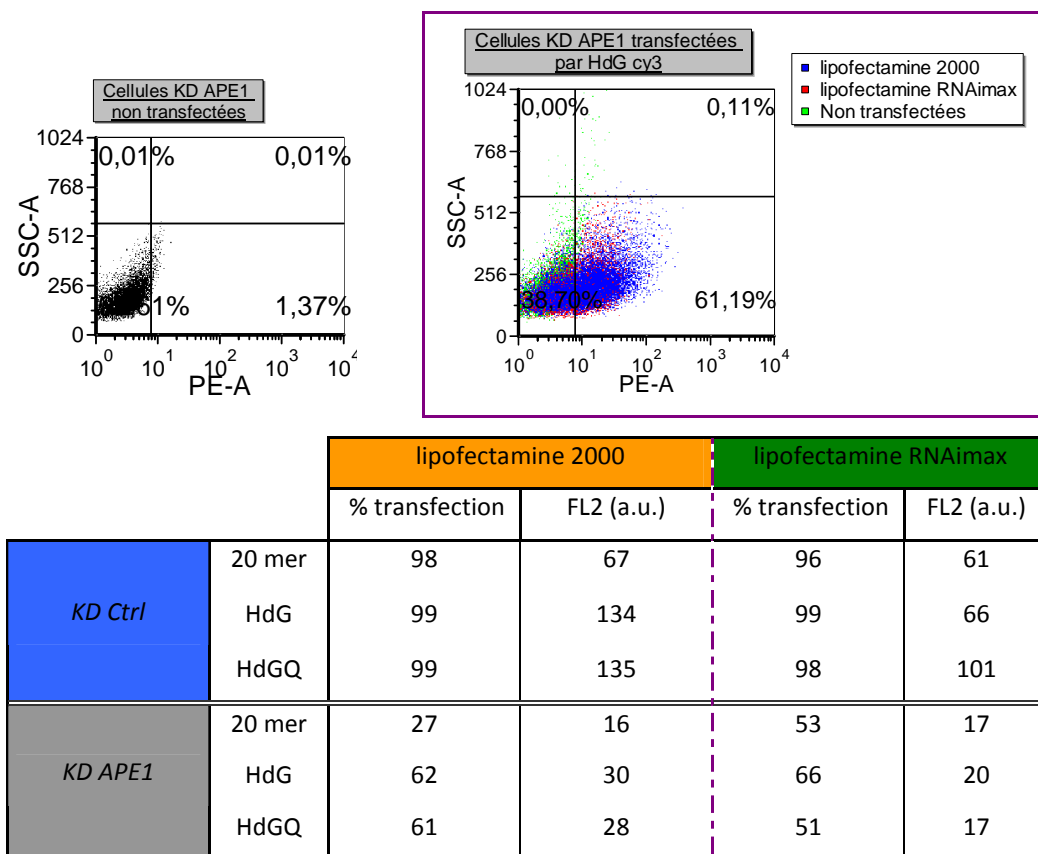


Figure 9 : Analyse par cytométrie en flux de la transfection des ODN Cy3 dans les cellules KD.

Selon cette étude, l'efficacité de transfection est plus élevée avec la lipofectamine 2000, c'est pourquoi nous avons décidé de l'utiliser par la suite. La différence sur l'efficacité de transfection entre les deux lignées est certainement due au fait que les cellules *KD APE1* ont une croissance deux fois plus élevée par rapport aux cellules *KD Ctrl* ; ainsi, leur division conduit à la dilution de la sonde pour chaque cellule.

2) Etude cinétique de la transfection avec analyse par cytométrie en flux des cellules

Suite au choix qui s'est porté sur la lipofectamine 2000, nous avons décidé de continuer la transfection d'ODN. Cette fois-ci, nous avons arrêté la transfection à des temps donnés : 2h, 4h et 8h. Nous avons transfecté les ODN *Pst1Q2cy5* et *THFQ2cy5* pour essayer de distinguer l'activité de réparation de l'ADN et *HdG* et *HdGQ* afin d'observer le phénomène de dégradation.

Les résultats sont présentés figure 10. Contrairement aux résultats précédents, toutes les cellules sont transfectées, mais il y a une différence d'intensité du signal fluorescent entre les deux lignées qui montrent que l'entrée des ODN dans les cellules *KD Ctrl* est soit plus aisée que dans les cellules *KD APE1* ou que les cellules *KD APE1* ont une croissance telle que l'ODN est dilué. Nous avons réalisé une expérience en immobilisant sur billes une sonde quenchée (donc résistante aux nucléases) en présence de PFA, et on observe que la sonde reste quenchée. Le PFA n'a donc à priori aucun effet sur le quenching des ODN.

Après seulement 2h de transfection, on remarque que l'ODN quenché *HdGQ* émet un signal fluorescent de même intensité que l'ODN non quenché *HdG*, ce qui signifie qu'il y a eu une dégradation importante par les nucléases qui aboutit à la coupure de l'ODN. Nous n'observons aucune activité de réparation significative de l'ADN car la sonde *THFQ2cy5* n'a pas une intensité de signal fluorescent plus importante que la sonde *Pst1Q2cy5*.

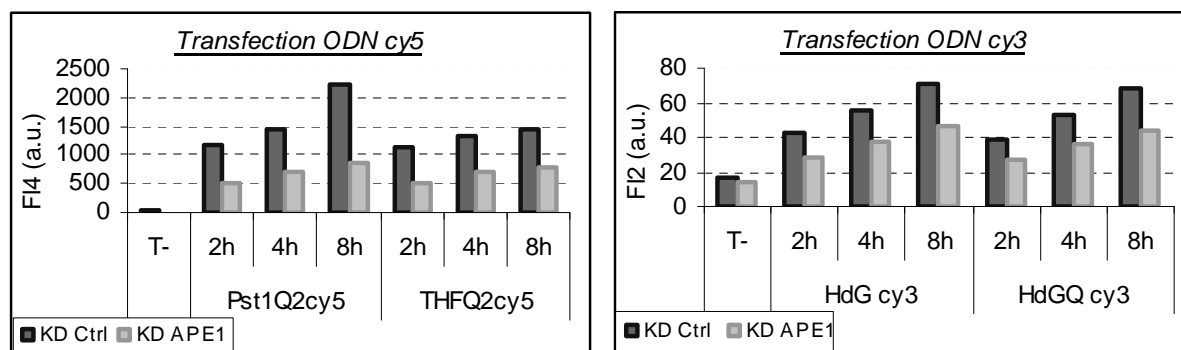


Figure 10 : Analyse par cytométrie en flux des différents ODN.

Cette expérience, qui a été réalisée une seule fois en fin de stage et demande donc confirmation, montre qu'avant de continuer dans ces tests *in cellulo*, il sera nécessaire de trouver des solutions pour éviter cette réaction de dégradation par les nucléases. Cette réaction pourrait être réduite, voire éliminée, par l'immobilisation sur billes nanométriques par l'extrémité 3' ou encore par protection des ODN contre l'action des nucléases par l'insertion d'analogues stables d'acides nucléiques [9] (liens phosphorothioates, méthylphosphonates, Locked Nucleic Acid,...).

III - CONCLUSION

Au cours de ce stage, nous avons immobilisé des sondes oligonucléotidiques « *hairpins* » quenchées contenant une lésion de l'ADN sur billes magnétiques grâce à l'interaction streptavidine/biotine. Nous avons utilisé cette plateforme bioanalytique originale pour l'étude de la réparation par excision de base et plus particulièrement l'excision du site abasique avec l'utilisation d'un analogue stable : le tétrahydrofurane. Le principe de ces tests repose sur la mesure de fluorescence des billes fonctionnalisées, initialement quenchées, émettent un signal fluorescent directement corrélé au taux de coupure des ODN. Nous avons montré que l'immobilisation d'ODN sur billes était un outil de choix pour la quantification de la réparation de l'ADN, permettant de réaliser des analyses rapides et sensibles (1 pmol ODN utilisée par test). De plus, une analyse par cytométrie en flux apporte à cet outil l'avantage d'une détection haut débit et miniaturisée. Les sondes développées ici ont permis de quantifier des activités de réparation au sein d'extraits cellulaires et ont été validées pour la mesure d'inhibition par la méthoxyamine.

Les perspectives envisagées sont d'améliorer le principe des sondes profluorescentes en utilisant d'autres quenchers que le dabcyI qui permettraient de diminuer encore le bruit de fond de fluorescence initial. Il est aussi envisagé d'utiliser ce type de sondes supportées pour faire du multiplexage, c'est-à-dire d'utiliser des sondes contenant différentes lésions correspondant chacune à un fluorophore spécifique. Ainsi, cette approche permettrait une détection simultanée de plusieurs activités de réparation au sein d'un même extrait cellulaire.

Les premiers résultats *in cellulo* montrent que les sondes transfectées sont très vulnérables à la dégradation par les nucléases. Pour poursuivre cette étude, il faudra envisager des solutions visant à minimiser voire éliminer cette réaction de dégradation; soit par l'immobilisation sur nanobilles [18] par l'extrémité 3', soit par l'incorporation dans la séquence d'analogues stables d'acides nucléiques. Les enzymes de réparation se trouvant essentiellement dans le noyau, un problème majeur lié à l'utilisation de nanobilles serait de savoir si ces dernières peuvent passer à travers la membrane nucléaire, ce qui est actuellement une théorie controversée.

IV – MATERIELS ET METHODES

1 - Synthèse des oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés à l'échelle de 1 ou 0,5 micromole avec un synthétiseur automatique d'acides nucléiques (*Applied Biosystems 392 DNA/RNA Synthetizer*). La synthèse a été effectuée selon la voie phosphoramidite sur support solide : cette technique permet de s'affranchir des étapes d'isolement et de purification des intermédiaires oligonucléotidiques. En effet le support silice, insoluble dans les solvants organiques est fonctionnalisé par le premier nucléotide fixé par sa fonction 3'. Pour les oligonucléotides contenant un groupement biotine en 3', le monomère utilisé est le *BiotineTEG CPG support* (société *Glen Research*). Ensuite, l'addition séquentielle des monomères (*dA, dG, dC, dT-3'-CE Phosphoramidite*), du nucléotide lésé (sous forme de synthon phosphoramidite), du fluorophore (*Cy5™ Phosphoramidite*) et du quencher de fluorescence (*Dabcyl-dT Phosphoramidite*) de la société *Glen Research*, en solution dans l'acétonitrile permet l'élongation de la séquence de l'extrémité 3' vers 5'. Le support est simplement lavé puis séché entre chaque cycle afin d'éliminer les excès des réactifs.

Le cycle de condensation de la méthode de phosphoramidite se décompose en 4 étapes : la détritulation de la fonction alcool en 5', l'activation du monomère phosphoramidite couplé à la condensation, le « capping » des fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi et l'oxydation du phosphite en phosphate.

2 - Purifications des mélanges bruts de synthèse et caractérisation des oligonucléotides

A) Purification sur gel d'acrylamide

Les bruts de synthèse ont été purifiés sur un gel de polyacrylamide 20 % avec urée. La solution de polyacrylamide est constituée de 210g d'urée dissouts à chaud dans 250 mL d'acrylamide à 40 % et 50 mL de tampon Tris/Borate/EDTA (TBE 10X de chez Invitrogen™). La solution est complétée à 500 mL avec de l'eau milliQ avant d'être filtrée sur fritté. Les plaques de verre, les espaceurs et le peigne sont lavés au détergent puis à l'eau et enfin à l'éthanol avant leur utilisation. Les faces internes des plaques sont traitées avec une solution de diméthylchlorosilane à 1 % dans du dichlorométhane (facilite le démoulage final). La polymérisation du gel est initiée en ajoutant 700 µL de solution de persulfate d'ammonium (APS) à 10 % puis 70 µL de TEMED pour 100 mL de solution d'acrylamide à 20 %. Le gel, une fois coulé et polymérisé est préchauffé à 1000 V en limitant la puissance à 3 W pendant une nuit.

La migration des oligonucléotides s'effectue à 2000 V en limitant la puissance à 20 W, le tampon de migration utilisé est une solution de TBE 1X. Les ODN étant fluorescents et concentrés, la

bande d'intérêt est distinguable à l'œil nu. Celle-ci est découpée puis broyée, 12 mL de PBS sont ajoutés dans un Falcon de 15 mL. La solution est agitée toute une nuit. Le lendemain, elle est centrifugée pour éliminer l'excès d'acrylamide et le surnageant contenant l'ADN est prélevé. La solution est concentrée au Speed-Vac, filtrée sur colonne d'exclusion Nap 10 (*GE healthcare*) puis re-concentrée au Speed-Vac.

B) Purification par HPLC

Les oligonucléotides sont re-purifiés une seconde fois par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne C18 chauffée à 50°C. Les différents fragments d'ADN sont séparés par un gradient linéaire d'acétonitrile (8 à 25 %) dans du TEAA 10 mM. La détection de ces fragments se fait à l'aide d'une double détection : grâce à un détecteur UV à 260 nm et à un spectrofluorimètre permettant de mettre en évidence la présence des marqueurs Cyanines (Cy3 ou Cy5). Les fractions collectées sont ensuite concentrées au Speed-Vac puis reprises dans de l'eau milliQ. La concentration est déterminée grâce à la mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre en goutte de type Nanodrop ND-1000.

C) Hybridation des oligonucléotides (duplex « hairpins »)

Les fragments d'ADN auto-complémentaires doivent être placés dans un milieu salin pour permettre l'hybridation et la formation de la structure double brin. Cela permet de s'assurer que les « hairpins » sont sous forme de double brins autocomplémentaires et substrats des enzymes étudiées. Ainsi, 1 pmol de l'oligonucléotide est reprise dans une solution aqueuse de tampon (10 mM HEPES/KOH pH 7,8 ; 2 mM EGTA/KOH pH 7,8 ; 80 mM KCl ; 0,1 mM ZnCl₂ ; 1 mM DTT ; 0,5 mg/ml BSA). L'échantillon est chauffé à 90°C pendant 3 minutes puis subit un refroidissement lent jusqu'à température ambiante. Cela permet d'éviter les sous structures non désirées.

D) Contrôle qualité des oligonucléotides en solution

Une fois les oligonucléotides purifiés, ils sont incubés avec l'enzyme spécifique soit de la lésion soit du site de restriction inséré dans les sondes, pendant 1h à 37°C. Les solutions sont alors analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 20 % dénaturant. Pour les sondes quenchées, on mesure la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre en goutte de type Nanodrop 3000 ; cette dernière analyse permet de vérifier le processus de quenching initial. Les échantillons, avant d'être déposés, sont dénaturés par chauffage à 90°C pendant 3 minutes dans 3 µL de solution de bleu dans la formamide (90 % formamide, 0,02/ xylène cyanol, 0,02 % bleu de bromophénol). Après la migration, le gel est analysé à l'aide d'un scanner de fluorescence (*Typhoon*TM chez *GE Healthcare*).

Les fractions pures recherchées sont ensuite rassemblées puis la concentration est déterminée par mesure d'absorbance à 260nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000.

3 - Immobilisation des sondes nucléiques sur billes Dynabeads[®] M280-streptavidine

Les billes utilisées sont fournies par la société *Invitrogen*TM. Ces billes ont un diamètre de 2,8µm et sont recouvertes d'une couche de streptavidine.

A) Préparation des billes

Le flacon de stockage est vortexé vigoureusement pour que la solution soit homogénéisée et que les billes soient placées en suspension. Un volume de billes est prélevé puis transvasé dans un tube eppendorf[®]. Le tube est placé ensuite dans un portoir magnétique, les billes sont alors culottées et le surnageant est retiré. Les billes sont lavées 3 fois avec 1 volume de « Binding and Washing 1X » (B&W) en retirant le surnageant et en remettant en suspension les billes par vortexage à chaque fois. Enfin les billes sont remises en suspension dans un volume de Binding solution 2X.

B) Immobilisation des sondes nucléiques

En parallèle, les sondes oligonucléotidiques subissent un cycle d'hybridation avant d'être immobilisées sur billes. Pour 100 µg de billes, 15 pmol des « hairpins » ODN sont placées dans 60 µL de Binding solution 1X. La solution est chauffée à 90°C pendant 3 minutes puis elle subit un refroidissement lent jusqu'à température ambiante. Le surnageant de la solution de billes est retiré et les 60µL de solution contenant les ODN sont ajoutés puis placés dans bloc agitateur (thermomixer eppendorf[®]), 1h à 25°C à 1400 rpm. Après 1h, les billes sont culottées puis le surnageant est retiré et les billes sont lavées 3 fois avec la solution « Binding and Washing 1X » puis 60 µL du tampon désiré sont ajoutés. Les billes fonctionnalisées sont stockées à 4°C.

4 – Préparation des extraits protéiques nucléaires

Les cellules Knockdown pour APE1 (KD-BER-LN428-APE1) et leur contrôle (KD-BER-LN428-Control) sont fournies par *Trevigen*TM. Les cellules sont cultivées dans du α-Eagle's MEM supplémenté par 10 % sérum de veau fœtal inactivé, de L-glutamine, d'antibiotique/antimycotique, gentamicine et de puromycine selon les indications du fournisseur.

Les extraits sont préparés à partir de cellules congelées à -80°C. Toutes les manipulations s'effectueront à 4°C. Les cellules sont décongelées puis centrifugées 5 min à 500g. Elles sont ensuite reprises dans 1 mL de PBS puis centrifugées 5 min à 500g. Le culot est repris par du tampon A de lyse froid (tampon A : 10 mM HEPES pH 7,8, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl 0,02 % Triton X-100, 0,5 mM DTT et 18 µg/mL de PMSF), 500 µL de tampon A pour 2.10⁶ cellules. On incube 20 min dans la glace. Puis

la solution est vortexée 30s pour faciliter la lyse de la membrane cytoplasmique. La lyse est vérifiée au bleu trypan (9 μL suspension cellulaire pour 1 μL de bleu trypan) : si plus de 90 % des cellules se colorent en bleu cela signifie que la lyse a fonctionné, dans le cas contraire il y a de nouveau incubation dans la glace pendant 20 min. La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 2300g et tout le tampon A résiduel doit être enlevé avec attention (sinon on dilue notre extrait). Les noyaux sont ensuite repris dans du tampon B froid (tampon B : 10 mM HEPES pH 7,8, 1,5 mM MgCl_2 , 25 % glycérol, 400 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF et 0.7X d'antiprotéases), 12,5 μL pour 10^6 cellules). Les noyaux sont incubés 20 min dans la glace puis 2 cycles de congélation (-80°C) - décongélation (4°C , 5 min) sont effectués. Finalement, la solution est centrifugée 10 min à 16000g. 2 μL du surnageant sont prélevés et ajoutés à 318 μL d'eau milliQ pour effectuer un dosage des protéines nucléaires. Puis le lysat obtenu est aliquoté et stocké à -80°C par fraction de 10 μL .

Le dosage des protéines nucléaires s'effectue par la méthode de Pierce sur plaque 96 puits avec comme témoin la BSA.

5 - Digestion enzymatique des ODN in vitro sur billes

Chaque digestion enzymatique est réalisée à partir de 1 pmol d'ODN, ce qui représente 5 μL de billes en solution. Le surnageant est retiré grâce au portoir magnétique puis les réactifs nécessaires à la digestion sont ajoutés.

A) Enzymes purifiées

<u>Enzyme</u>	<u>Provenance</u>	<u>Tampon</u>
<i>APE1</i> (2,5 u/ μL)	Société Trevigen®	10 mM HEPES/KOH pH 7,8 ; 2 mM EGTA/KOH pH 7.8 ; 80 mM KCl ; 0,1 mM ZnCl_2 ; 1 mM DTT ; 0,5 mg/ml BSA
<i>Pst1</i> (10 u/ μL)	Société Invitrogen®	50 mM TrisHCl pH 8 10 mM ZnCl_2 ; 50 mM NaCl
<i>Aag</i> (5u/ μL)	Société Invitrogen®	10 mM HEPES/KOH pH 7,8 ; 2 mM EGTA/KOH pH 7.8 ; 80 mM KCl ; 0,1 mM ZnCl_2 ; 1 mM DTT ; 0,5 mg/ml BSA

Tableau : Enzymes et tampons utilisés lors des digestions enzymatiques

Une fois le surnageant retiré, on ajoute dans l'ordre : le tampon souhaité, l'eau milliQ et les enzymes pour un volume final de 10 μL dans des tubes de 300 μL . Les échantillons sont incubés 1h à 37°C au Stratagène pour le suivi de la cinétique. En fin de réaction, on ajoute 190 μL de PBS pour

stopper la réaction puis les solutions de 200 µL sont transférées dans des tubes de 5 mM (Falcon® ; Becton Dickinson) l'analyse par cytométrie en flux.

B) Extraits nucléaires

Les digestions ont été réalisées soit à partir d'extraits commerciaux HeLa soit à partir d'extraits nucléaires réalisés au laboratoire à partir des cellules knockdown. On ajoute une fois le surnageant retiré des billes : le tampon (10 mM HEPES/KOH pH 7,8 ; 2 mM EGTA/KOH pH 7,8 ; 80 mM KCl ; 0,1 mM ZnCl₂ ; 1 mM DTT ; 0,5 mg/ml BSA), l'eau milliQ puis la solution d'extraits nucléaires pour un volume de 10 µL. Les échantillons sont incubés 1h à 37°C au Stratagène pour le suivi de la cinétique. En fin de réaction, on ajoute 190 µL de PBS pour stopper la réaction puis les solutions de 200 µL sont transférées dans des tubes FACS pour l'analyse par cytométrie en flux.

6 - Cytométrie en flux et analyse

Pour chaque acquisition, un minimum de 2×10^4 évènements est collecté pour chaque échantillon, le filtre est choisi en fonction du fluorophore. Les données sont analysées par FACS express (*De Novo Software*). Les intensités moyennes de fluorescence sont enregistrées pour le filtre FL4 sur une population de billes.

7 - Transfection

La transfection a été effectuée en plaque 24 puits et 12 puits. Le protocole, ci-dessous convient à une plaque 24 puits. Pour une plaque 12 puits, il faut augmenter de façon proportionnelle les quantités pour arriver à un volume final de 650 µL au lieu de 500 µL.

Premier jour : ensemencement de la plaque. Les cellules sont ensemencées dans du milieu α-MEM avec 10 % de SVF et contenant de la L-glutamine (sans antibiotique). Les cellules sont ensemencées de telle sorte que la confluence des puits soit à 30-50 % de confluence le jour de la transfection. Nous mettons 30 000 cellules/puits pour une plaque 24 puits et 60 000 cellules/puits pour une plaque 12 puits.

Deuxième jour : transfection des ODN (protocole pour une plaque 24 puits, on multiplie par 1,3 pour une plaque 12 puits). Le milieu est retiré puis remplacé par 400 µL d'optiMEM + 2 % de SVF. Puis, on réalise dans 2 tubes différents des duplexes : 1/ tube 50 µl optiMEM free + 0,5 µL de ODN (10µM) soit 5 pmol (= tube A) et 2/ tube 50 µl optiMEM free + 0,75 µl de Lipofectamine-RNAimax ou Lipofectamine-2000(= tube B). On attend 10 min afin que l'équilibre se fasse dans les tubes puis on

ajoute B dans A et on attend encore 15 min. Enfin, on ajoute les ~100 μL de solution dans les différents puits. Il faut qu'il y ait une concentration de 10 nM finale en ODN dans chaque puits.

Troisième jour : analyse des résultats. Les cellules sont fixées soit pour une visualisation au microscope soit pour les analyser par cytométrie en flux.

Pour une visualisation au microscope : le milieu des cellules est retiré puis on ajoute 300 μL de Hoechst 3342 1:500 dans du PBS (contenant du CaCl_2 et du MgCl_2) et on laisse incuber 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées 5 fois avec du PBS puis on ajoute du paraformaldéhyde 4 % dans le PBS. On laisse agir pendant 30 min à RT puis on rince 2 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite remises dans une solution de PBS avec 20-30 % de glycérol.

Pour l'analyse par cytométrie en flux : les cellules sont lavées avec du PBS (sans CaCl_2 et MgCl_2) et trypsinées (300 μL de trypsine EDTA puis 1,7 mL de milieu pour neutraliser la trypsine) puis centrifugées. Les cellules sont resuspendues dans 200 μL de PBS puis on ajoute 200 μL de PFA 4 % dans du PBS.

V - BIBLIOGRAPHIE

1. Scharer, O.D., Chemistry and biology of DNA repair, **2003**, *Angew Chem Int Ed Engl.* **42**(26): p. 2946-74.
2. Pourquier, P., La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie, **2006**, *Bull Cancer.* p. 124-44.
3. Gates, K.S., An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals, **2009**, *Chem Res Toxicol.* **22**(11): p. 1747-60.
4. Wang, D., et al., APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells, **2009**, *Lung Cancer.* **66**(3): p. 298-304.
5. Helleday, T., et al., DNA repair pathways as targets for cancer therapy, **2008**, *Nat Rev Cancer.* **8**(3): p. 193-204.
6. Lindahl, T., P. Karran, and R.D. Wood, DNA excision repair pathways, **1997**, *Curr Opin Genet Dev.* **7**(2): p. 158-69.
7. Seeberg, E., L. Eide, and M. Bjoras, The base excision repair pathway, **1995**, *Trends Biochem Sci.* **20**(10): p. 391-7.
8. Sauvaigo, S., et al., An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage, **2004**, *Analytical Biochemistry.* **333**(1): p. 182-192.
9. Matsumoto, N., et al., Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair, **2010**, *Nucleic Acids Res.* **38**(7): p. e101.
10. Li, Y., X. Zhou, and D. Ye, Molecular beacons: An optimal multifunctional biological probe, **2008**, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **373**(4): p. 457-461.
11. Maksimenko, A., et al., A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities, **2004**, *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **319**(1): p. 240-246.
12. Flaender, M., Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques : applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur réparation sur support, **2010**, *Thèse au Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques/SCIB/INAC/DSM/CEA.*
13. Ballal, R., et al., Fluorescent oligonucleotides can serve as suitable alternatives to radiolabeled oligonucleotides. *J Biomol Tech*, 2009. **20**(4): p. 190-4.
14. Horejsh, D., et al., A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry, **2005**, *Nucleic Acids Research.* **33**(2): p. e13.
15. Fishel, M.L., et al., Knockdown of the DNA repair and redox signaling protein Ape1/Ref-1 blocks ovarian cancer cell and tumor growth, **2008**, *DNA Repair.* **7**(2): p. 177-186.
16. Liuzzi, M., M. Weinfeld, and M.C. Paterson, Selective inhibition by methoxyamine of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity associated with pyrimidine dimer-DNA glycosylases from *Micrococcus luteus* and bacteriophage T4, **1987**, *Biochemistry.* **26**(12): p. 3315-21.
17. Maher, R.L., et al., Slow base excision by human alkyladenine DNA glycosylase limits the rate of formation of AP sites and AP endonuclease 1 does not stimulate base excision, **2007**, *DNA Repair.* **6**(1): p. 71-81.
18. Prigodich, A.E., et al., Nano-flares for mRNA regulation and detection. **2009**, *ACS Nano*, **3**(8): p. 2147-52.

Annexe 3 : Liste des communications scientifiques et publications

Publications

- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "New fluorescent DNA probes for detection of DNA repair on functionalized magnetic particles". (soumise)
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Microbeacons for specific DNA repair analysis by flow cytometry" (en préparation)
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Multiplex assay based on fluorescence-encoded magnetic beads to monitor DNA repair activities by flow cytometry" (en preparation)

Communications Orales

- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : De nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN applicables au screening d'inhibiteurs". **XII^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs de la Société de Chimie Thérapeutique**, 2-3 Février 2012 (Romainville, FRANCE) : Prix de la communication orale
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : De nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN applicables au screening d'inhibiteurs ». **14^{èmes} REcontres en Chimie Organique Biologique**, 18-22 Mars 2012 (Aussois, FRANCE)
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Sondes nucléiques supportées sur billes magnétiques pour la détection spécifique d'activités de réparation de l'ADN par cytométrie en flux". **Journée Rhône-Alpes des Biomolécules**, 7 Juin 2013 (Lyon, FRANCE)

Communications par poster

- GINES, G.*, FLAENDER, M., DESIRON, C., SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "On support fluorescent assays based on functionalized oligonucleotides to monitor specific DNA repair activities". **XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components**, 5-10 Juin 2011 (Český Krumlov, RÉPUBLIQUE TCHÈQUE)
- GINES, G.*, BRUSA, C. SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Nanostructures d'ADN supportées sur billes magnétiques : De nouveaux outils senseurs des systèmes de réparation de l'ADN applicables au screening d'inhibiteurs". **Journée Rhône-Alpes des Biomolécules**, 1^{er} Juin 2012 (Grenoble, FRANCE)
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "On beads fluorescent assays based on functionalized oligonucleotides to monitor specific DNA repair activities". **9th Winter Research Conference on DNA Damage: formation, repair, health consequences and industrial issues**, 11-16 Mars 2012, (Les Houches, FRANCE)
- GINES, G.*, SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "On Bead Fluorescent Assay based on Functionalized Oligonucleotides to Monitor Specific DNA Repair Activities". **244th American Chemical Society National Meeting & Exposition**, 19-23 Août 2012 (Philadelphia, ETATS-UNIS)
- GINES, G*., SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D. "Muiltplex Assay based on Encoded Magnetic Microbeads Functionalized with Damaged Oligonucleotides to Monitor Specific DNA Repair Activities by Flow Cytometry". **5th « Nano & Micro Environments for Cell Biology » Workshop**, 8 Novembre 2012 (Grenoble, FRANCE)
- FERRIER R.J. JR*, GINES G., SAINT-PIERRE C., COMPOSTO R.J., GASPARUTTO D., PÉPIN-DONAT B., RANNOU P., "Janus gold nanorod and DNA-based functional supramolecular architectures for organic (opto)electronics", **2nd French American Workshop-FAW2013**, 1-2 Juillet 2013 (Grenoble, FRANCE)