



HAL
open science

Mise au point et utilisation d'un test de mesure d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN in vitro sur biopuces pour l'identification de marqueurs d'expositions à des agents génotoxiques de l'environnement

Carine George

► To cite this version:

Carine George. Mise au point et utilisation d'un test de mesure d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN in vitro sur biopuces pour l'identification de marqueurs d'expositions à des agents génotoxiques de l'environnement. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV083 . tel-01744880

HAL Id: tel-01744880

<https://theses.hal.science/tel-01744880>

Submitted on 27 Mar 2018

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 LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **BIOTECHNOLOGIE**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Carine GEORGE

Thèse dirigée par **Jean-Luc RAVANAT** et
codirigée par **Sylvie SAUVAIGO**

préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Moléculaires et
nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Mise au point et utilisation d'un test de
mesure d'activités enzymatiques de
réparation de l'ADN *in vitro* sur biopuces
pour l'identification de marqueurs
d'expositions à des agents génotoxiques
de l'environnement**

Thèse soutenue publiquement le **20 Décembre 2017**
devant le jury composé de :

Madame Janet HALL

Directrice de recherche, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,
Rapporteur

Madame Gladys MIREY

Maître de conférences, Université Toulouse III Paul Sabatier, Rapporteur

Monsieur Eric PEYRIN

Professeur, Université Grenoble Alpes, Président

Madame Carole CHAIX-BAUVAIS

Directrice de recherche, CNRS Lyon, Examineur

Monsieur Jean-Luc RAVANAT

Directeur de recherche, CEA Grenoble, Directeur de thèse

Madame Sylvie SAUVAIGO

Présidente, LXRepair Grenoble, Co-directrice de thèse



A ma mère,

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement mes deux rapporteurs d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, le Pr Janet HALL et le Dr Gladys MIREY, ainsi que les autres membres du jury, Pr Éric PEYRIN et Pr Carole CHAIX-BAUVAIS. Sans oublier les membres de mon comité de suivi de thèse, Pr Anne MAITRE et Dr Marc AUDEBERT pour leurs précieux conseils quant à mon sujet de thèse.

Un très grand merci à mes deux directeurs de thèse : Sylvie SAUVAIGO et Jean-Luc RAVANAT pour m'avoir laissé l'opportunité d'effectuer ma thèse au sein de LXRepair et du CIBEST.

Sylvie, merci pour ta disponibilité et surtout ton optimisme de tous les jours qui m'a permis de ne rien lâcher pendant ces 3,5 années ! Travailler à tes côtés a été un immense plaisir et nos discussions scientifiques (mais pas seulement) vont me manquer ! Je souhaite une très longue vie à ton « bébé » LXRepair !

Jean-Luc, merci également pour ta disponibilité et tes conseils que ce soit lors des caprices du Quantum, de l'analyse des résultats ou encore lors de la rédaction du manuscrit ! La chimie analytique était bien floue pour moi quand je suis arrivée au labo... Dorénavant, j'appréhende moins de m'approcher d'un spectromètre de masse !

J'adresse également mes remerciements à LXRepair, l'ANRT et le CEA qui ont financé ces travaux de thèse.

J'ai eu la chance de travailler au sein de deux laboratoires : LXRepair et le CIBEST (ex-LAN) ce qui rallonge considérablement la liste des personnes que j'ai à remercier !

Je tiens à remercier toute la team du CIBEST pour votre bonne humeur quotidienne et tous les moments partagés que ce soit en salle café, au labo bleu ou entre deux pétris en salle de culture !

Merci à Sylvain avec qui j'ai découvert les joies du Quantum mais aussi les puces ! Merci pour ton aide sur les nombreuses extractions, digestions et analyses au spectro ! Et merci pour tout le reste car tu es bien l'homme à tout faire du labo : informatique, bricolage, bons plans, conseils en série, fournisseur officiel du labo en noix et j'en passe ...

Merci à David alias Dadou pour tes conseils et toutes les discussions qu'on a pu avoir en salle de culture, en salle café ou autour d'une bière !

Merci à la team « Nano » : Marie Do, Adeline et Laure pour tous les bons moments partagés avec nos tup' aux pauses déjeuner ! Marie, merci de m'avoir fait découvrir le milieu associatif mais aussi les multiples activités sportives ou non pratiquées dans la région grenobloise ! ;)

J'adresse mes remerciements à Marie CARRIERE pour ses conseils et son aide en stat' sur les derniers instants où je m'arrachais les cheveux avec mes données !

Je souhaite remercier Thierry DOUKI pour ses précieux conseils scientifiques au cours des trois années ainsi que pour son aide lors de la rédaction du manuscrit. Merci également d'avoir accepté de passer mes 20 puis 250 échantillons sur l'API3000... !

Merci à la team RICC qui a rejoint le LAN pour votre bonne humeur et les fous rires aux pauses café !
Merci à Fanny qui avait quelques mois d'avance sur le planning de la thèse pour avoir répondu à mes multiples questions administratives ou non ! Merci à Laura qui m'a fait découvrir les pétales d'Yves Rocher !

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au labo : Anne, Simona, Solveig, Stéphanie, Camille, Sylvestre, Christine, Morgane, Lionel, Jérémy, Elodie, Lucie, Céline, Fanny, Ozge et tous ceux que je pourrai oublier.

Mes remerciements vont maintenant à la team LXRepair, ma deuxième famille pendant ces 3,5 années ! Le quotidien en start-up n'est pas toujours simple mais cette première expérience a été pour moi très enrichissante que ce soit au niveau professionnel et personnel !

Un énorme BIG UP à ma collègue de bureau et de paillasse Sarah ! Merci pour tout ce que tu as pu me transmettre au labo qui m'a permis d'avoir confiance en moi et mes résultats ! Grâce à toi, je suis passée de jeune Padawan à jeune Jedi, oh yeah ! Et merci pour ton soutien quotidien pendant ces 3,5 ans, notamment pendant la rédaction lorsque je craquais devant mon ordi !

Merci à la nouvelle team LXR : Bertrand, Giovanna et Robin et aux stagiaires : Marion, Flo et Maxime pour les bons moments passés ensemble, courts mais intenses.

Petit remerciement obligatoire pour Picard qui m'a fait gagner beaucoup de temps au cours de ma dernière année de thèse et qui m'a permis de manger équilibré ! :)

Je tiens à remercier mes amis de Grenoble : Marie, Lisa et Félix pour tous les supers souvenirs que ce soit via le milieu associatif, au ski, aux « afterworks », aux « apéros œno », ... mais aussi à mes amies de Paris, de Bretagne ou encore du Sud : Vanou (mon mentor de tous les jours !), Célia, Marin et Isa pour leur soutien pendant ces trois années : « La véritable amitié ce n'est pas d'être inséparables, c'est d'être séparés et que rien ne change ».

Enfin, je remercie infiniment mon père, ma sœur Laura et Martin qui ont su m'accompagner pendant ces trois années et tout particulièrement au cours de la dernière ligne droite de la rédaction. Merci pour votre amour, votre soutien et vos encouragements qui m'ont permis de traverser cette aventure sans encombre !

Sommaire

Liste des abréviations	5
Liste des Figures.....	11
Liste des Tableaux.....	17
Avant-propos	19
Chapitre 1 : Etude bibliographique	23
1. Les biomarqueurs en biosurveillance	23
1.1. La biosurveillance humaine.....	23
1.2. Généralités sur les biomarqueurs	24
1.3. Atouts et limites des BM en biosurveillance	25
1.4. Les différents types de BM en biosurveillance.....	26
1.5. Expositions environnementales et professionnelles	28
1.6. Place du cancer en biosurveillance	29
2. Lésions de l'ADN	31
2.1. Généralités.....	31
2.2. Lésions formées de façon endogène et présentes à l'état basal	34
2.3. Lésions formées suite à l'exposition à des agents génotoxiques (Facteurs exogènes)	39
3. Les voies de réparation de l'ADN	42
3.1. La réparation par excision de bases (BER)	43
3.2. La réparation par excision de nucléotides (NER)	47
3.3. La réparation directe (DR).....	50
3.4. La réparation des mésappariements (MMR)	51
3.5. La réparation des cassures double brin	53
3.6. La réparation des pontages inter-brins (ICLR).....	57
3.7. Les maladies liées à la réparation de l'ADN	60
4. La réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response ou DDR).....	61
4.1. Organisation générale de la réponse aux dommages de l'ADN	61

4.2.	Les Senseurs.....	62
4.3.	Les Transducteurs.....	65
4.4.	Les Médiateurs et les Effecteurs.....	65
4.5.	Les réponses au niveau cellulaire.....	69
4.6.	DDR et Cancer.....	73
5.	Outils de mesure de la réparation de l'ADN.....	75
5.1.	Méthodes indirectes basées sur la mesure des lésions.....	76
5.2.	Méthodes de mesure directe des activités enzymatiques de réparation.....	81
6.	Exposition des populations aux agents génotoxiques.....	88
6.1.	Un exemple d'agent génotoxique de l'environnement et de l'industrie : le benzo[a]pyrène 88	
6.2.	Un exemple d'agent génotoxique de l'industrie chimique : le Chlorure de Vinyle.....	100
	Objectifs.....	113
	Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	117
1.	Traitement cellulaire et test de cytotoxicité.....	117
1.1.	Culture cellulaire des lignées cellulaires A549 et HepG2.....	117
1.2.	Test de cytotoxicité MTT.....	119
1.3.	Traitement cellulaire avec les différents agents génotoxiques.....	120
1.4.	Récolte cellulaire.....	121
2.	Dosage des lésions par HPLC-MS/MS.....	121
2.1.	Extraction de l'ADN cellulaire.....	121
2.2.	Digestion enzymatique de l'ADN.....	122
2.3.	Analyse HPLC-MS/MS.....	123
3.	Test ExSy-SPOT.....	126
3.1.	Préparation des substrats plasmidiques contenant une lésion spécifique.....	126
3.2.	Fonctionnalisation de la lame.....	129
3.3.	Mesure des activités de réparation par réaction <i>in vitro</i> d'excision/resynthèse.....	130
3.4.	Normalisation des données.....	134

3.5.	Interprétation des données	135
3.6.	Contrôle qualité des puces fonctionnalisées	138
4.	Analyse statistique.....	139
Chapitre 3 : Résultats.....		143
1.	Introduction.....	143
2.	Etude de la réponse cellulaire au CAA et son précurseur l'IFO.....	147
2.1.	Optimisation de la formation des lésions Ethénobases dans le plasmide pour le test ExSy-SPOT	147
2.2.	Test de viabilité cellulaire et traitement cellulaire avec le CAA et l'IFO.....	153
2.3.	Caractérisation des activités de réparation de l'ADN en réponse au CAA et à l'IFO.....	157
3.	Etude de la réponse cellulaire au BPDE et son précurseur le B[a]P.....	163
3.1.	Optimisation de la formation des adduits du BPDE dans le plasmide pour le test ExSy-SPOT	163
3.2.	Test de viabilité cellulaire et traitement cellulaire avec le BPDE et le B[a]P.....	169
3.3.	Caractérisation des activités de réparation de l'ADN en réponse au BPDE et B[a]P.....	173
4.	Conclusions.....	184
4.1.	Optimisation du test de réparation pour des applications environnementales et professionnelles.....	184
4.2.	Etude des conséquences de l'exposition au CAA et à l'IFO.....	184
4.3.	Etude des conséquences de l'exposition au BPDE et au B[a]P.....	185
4.4.	Résumé	185
Chapitre 4 : Discussion.....		189
1.	Optimisation du test de réparation pour des applications environnementales et professionnelles	189
2.	Impact des agents génotoxiques sur la formation des dommages et la réparation de l'ADN .	192
2.1.	Cas particulier du CAA.....	194
2.2.	Variabilité de la réponse cellulaire.....	196
2.3.	Seuil de la réponse cellulaire	199
2.4.	Spécificité de la réponse cellulaire.....	202

Conclusion et Perspectives	209
Références Bibliographiques	217
Résumé/Abstract	239

Liste des abréviations

5'dRp	5'désoxyribose phosphate
4-HNE	4-hydroxynonenal
1-OHB[a]P	1-hydroxybenzo[a]pyrène
3-OHB[a]P	3-hydroxybenzo[a]pyrène
4-OHIFO	4-hydroxyifosfamide
8oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-déoxyguanosine
8oxoG	8-oxo-7,8-dihydro-guanine
6-4PP	Photoproduits 6-4
A	Adénine
a-NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues alternative
ABC	ATP Binding Cassette
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AIP	Aryl hydrocarbon receptor interacting protein
AKR	Aldo-kéto réductase
ALAT	Alanine aminotransférase
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AP	Site apurinique ou apyrimidique
APE1	AP - endonucléase 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Arnt	Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B[a]P	Benzo[a]pyrène
B[a]P-7,8,9,10-tétraol	7,8,9,10-tetrahydroxy-tetrahydrobenzo(a)pyrène

B[a]P-o-quinone	Benzo(a)pyrène-7,8-dione
BER	Réparation par excision de base
BET	Bromure d'éthidium
BM	Biomarqueur
BPDE	Benzo[a]pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
BSA	Albumine sérique bovine
C	Cytosine
c-NHEJ	Jonction d'extrémités non homologues canonique
CAA	Chloroacétaldéhyde
CAR	Constitutive androstane receptor
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CDB	Cassure double brin
Cdk	Cyclin dépendant kinases
CEO	Oxyde de 2-chloroéthylène
Chk	Checkpoint kinase
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
Comètes	Single cell electrophoresis assay
CPAM	Caisse primaire d'assurance maladie
CPD	Cyclobutane
CMR	Cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques
CSB	Cassure simple brin
CYP450	Monooxygénases à cytochrome P450
DDR	Réponse aux dommages de l'ADN
Diols de Cytosine	5,6-dihydroxy-5,6-dihydrocytosine
Diols de Thymine	5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucleotide triphosphate
DO	Densité optique
DR	Réparation directe
DRC	Capacité de réponse aux dommages
DTT	Dithiothréitol
εA	Ethénoadénine
εC	Ethénocytosine

εG	Ethénoguanine
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EH	Epoxyde hydrolase
FA	Fanconi anemia
FEN1	Flap endonucléase 1
FI	Intensité de fluorescence
FM-HCR	Fluorescent-based Multiplexed Host Cell Reactivation
G	Guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
GG-NER	Réparation globale du génome de la voie NER
GGT	Gamma-glutamine-transférase
GSH	Glutathion
GST	Gluthathion-S-tranférase
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCR	Host Cell Reactivation
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HNPCC	Cancer colorectal héréditaire sans polypose
HPLC-MS/MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem
HPNE	4-hydroxyhydroperoxy-2-nonenal
HR	Recombinaison homologue
Hsp90	Heat shock protein 90
IBE	Indicateur biologique d'exposition
IC₂₀	Dose létale 20%
ICLR	Réparation des pontages inter-brins
IDL	Boucle d'insertion/suppression
IFO	Ifosfamide
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IPM	Ifosforamide moutarde
IR	Rayonnements ionisants
kB	Kilobases
LPO	Peroxydation lipidique
M	Mitose

M1G	MDA-Gua
MDA	Malonaldéhyde
MMC	Mitomycine C
MMR	Réparation des mésappariements
MRM	Multiple Reactions Monitoring
MRP	MultiDrug Resistance Proteins
MTT	Bromure de 3- [4,5-diméthyl-2-thiazolyl] -2,5 diphényltétrazolium
NER	Réparation par excision de nucléotide
NHEJ	Jonction d'extrémité non homologue
NIH	National Institute of Health
Nrf2	NF-E2 related factor 2
NT	Non traité
NQO1	NADPH quinone oxydoréductase 1
ODN	Oligonucléotide
OMS	Organisation mondiale de la santé
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS	Phosphate buffer saline
PCB	Polychlorobiphényles
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase like
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PNK	Poly Nucleotide Kinase
PNSE	Plan national santé-environnement
ppm	Partie par million
PVC	Polychlorure de vinyle
PXR	Pregnane X receptor
RFC	Replication Factor C
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RUO	Research use only
S	Synthèse

SBE	Surveillance biologique de l'exposition
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SENP	SENtrin-specific Protease
SNC	Système nerveux central
SSL	Simulateur solaire
SULT	Sulfotransférase
Sv	Sievert
SVF	Sérum de veau foetal
T	Thymine
TC-NER	Réparation couplée à la transcription de la voie NER
TEA	Triéthylamine
THF	Tétrahydrofurane
U	Uracile
Ub	Ubiquitine
UE	Union Européenne
UGT	UDP-glucuronyltransférase
USP	Enzyme de déubiquitination
UV	Ultraviolets
VBR	Valeur biologique de référence
VLB	Valeur limite biologique
VLEP	Valeur limite d'exposition professionnelle
WHO	World Health Organisation
XAB2	XPA binding protein 2
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRE	Xenobiotic Response Elements

Liste des Figures

Figure 1 - Les différents types de BM utilisés afin de suivre les conséquences de l'exposition à une substance exogène	27
Figure 2 - Histogramme des différents agents cancérigènes en fonction du nombre de salariés exposés (Brosselin and El Yamani, 2006).....	28
Figure 3 - Du chromosome à l'ADN (adaptée de The Royal Swedish Academy of Science website)	32
Figure 4 - Structure biochimique de l'ADN	33
Figure 5 - Les principaux types de lésions de l'ADN & les voies de réparation (adaptée de Hoeijmakers, 2001).....	34
Figure 6 - Structure chimique d'un site AP	35
Figure 7 - Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale (source : Mémo visuel de Biochimie)	36
Figure 8 - Structure chimique de la base azotée de la 8oxoG.....	37
Figure 9 - Structure chimique des bases azotées : diols de Thymine & Cytosine	37
Figure 10 - Schéma de la LPO.....	38
Figure 11 - Structure chimique des bases azotées : EthénoGuanine, EthénoAdénine et EthénoCytosine	39
Figure 12 - Structure chimique des bases azotées : 6-4PP de type TT et CPD de type TC	40
Figure 13 - Distribution relative de la formation des photoproduits dans des cellules CHO suite à une irradiation UVB ou par SSL. La quantification des photoproduits a été effectuée par HPLC-MS/MS (Cadet et al., 2012).....	41
Figure 14 - Structure chimique de la base azotée : BPDE-N ² -Gua.....	42
Figure 15 - Schéma de la voie de réparation BER (Biola-Clier et al., 2017)	47
Figure 16 - Schéma de la voie de réparation NER (Biola-Clier et al., 2017).....	50
Figure 17 - Schéma de la réparation directe : A) Lésion εG par l'enzyme MGMT B) εA par l'enzyme ALKBH (adaptée de Nay and O'Connor, 2013)	51
Figure 18 - Schéma de la voie MMR (Bak et al., 2014).....	52
Figure 19 - Schéma de la voie HR (Mladenov et al., 2016).....	54
Figure 20 - Schéma des différentes étapes de la c-NHEJ (Mladenov et al., 2016)	56
Figure 21 - Schéma des différentes étapes de la a-NHEJ (adaptée de Mladenov et al., 2016)	57
Figure 22 - Schéma de la voie ICLR (Clauson et al., 2013).....	59
Figure 23 - La cascade de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN (adaptée de Zhou and Elledge, 2000)	62
Figure 24 - Activation d'ATM (Cimprich and Cortez, 2008).....	63
Figure 25 - Activation d'ATR (Cimprich and Cortez, 2008).....	64

Figure 26 - Principales modifications post-traductionnelles impliquées dans la DDR (Polo and Jackson, 2011).....	67
Figure 27 - Les phases du cycle cellulaire et la phase de quiescence G0 (source : site internet RNBio de l'UPMC).....	70
Figure 28 - Schéma du processus de cancérogénèse (source : Centre François Baclesse de lutte contre le cancer de Basse-Normandie)	74
Figure 29 - Méthodes pour étudier les différents niveaux de la réparation de l'ADN	76
Figure 30 - Principe du test des comètes (Genies, 2013).....	77
Figure 31 - Schéma d'une source d'ionisation électrospray couplée à un analyseur quadripôles (adaptée de Marie, 2007)	80
Figure 32 - Schéma simplifié du test FM-HCR.....	82
Figure 33 - Liste des lésions présentes sur le test Glyco-SPOT et des glycosylases et endonucléases correspondantes prenant en charge chaque lésion	85
Figure 34 - Schéma simplifié du test Glyco-SPOT.....	85
Figure 35 - Liste des lésions disponibles pour le test ExSy-SPOT	87
Figure 36 - Schéma simplifié du test ExSy-SPOT	87
Figure 37 - Structure chimique du B[a]P et numérotation des carbones.....	89
Figure 38 - Schéma simplifié de biotransformation du B[a]P.....	92
Figure 39 - Voie d'activation métabolique du B[a]P.....	93
Figure 40 - Schéma d'un transporteur ABC utilisant l'ATP	96
Figure 41 - Schéma simplifié de l'interaction du B[a]P avec le récepteur AhR (Arenas-Huertero et al., 2011).....	97
Figure 42 - Structure chimique du chlorure de vinyle.....	100
Figure 43 - Schéma simplifié de la métabolisation du chlorure de vinyle	102
Figure 44 - Structure chimique de l'Ifosfamide.....	104
Figure 45 - Schéma simplifié du métabolisme hépatique de l'IFO : 1) La voie d'activation : 4-hydroxylation 2) La voie de désactivation : N-déchloroéthylation.....	105
Figure 46 - Schéma simplifié de l'induction des gènes par l'IFO (adaptée de Zhang et al., 2005)	107
Figure 47 - Structure chimique d'un pontage inter ou intra-brin par réaction de l'IPM sur les bases G de l'ADN.....	109
Figure 48 - Fragmentation de l'édG	124
Figure 49 - Fragmentation de la 8oxodG	125
Figure 50 - Fragmentation de l'adduit BPDE-N ² -dGuo	125
Figure 51 - Schéma du plasmide pBlueScript II SK (+/-)	127
Figure 52 - Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8%.....	128

Figure 53 - Schéma des zones de dépôt des plasmides sur la puce.....	129
Figure 54 - Schéma du dépôt des substrats plasmidiques sur la lame hydrogel : le chiffre 1 correspond au ratio C et 1/2 au ratio A	130
Figure 55 - Schéma de la préparation de la biopuce pour la réalisation de la réaction <i>in vitro</i> d'excision/resynthèse	132
Figure 56 - Images en fausses couleurs obtenues après lecture du signal fluorescent à 532 nm. Chaque disque (« spot ») correspond à un type de plasmide. Plus le disque est rouge, plus l'incorporation de dCTP-Cy3 a été importante. A) Extrait nucléaire « NT » B) Extrait nucléaire « T »	135
Figure 57 - Profil d'excision/resynthèse des différentes lésions obtenu après soustraction de l'intensité de fluorescence du plasmide contrôle.....	136
Figure 58 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion : 1) Diagramme NT de l'échantillon « Non Traité » 2) Diagramme T de l'échantillon « Traité »	137
Figure 59 - Rapport de l'intensité de fluorescence des extraits « T » par rapport à la moyenne des extraits « NT ».....	138
Figure 60 - Démarche expérimentale de préparation des substrats plasmidiques contenant les lésions d'intérêt.....	144
Figure 61 - Démarche expérimentale pour l'exploration de la réponse cellulaire ainsi que les paramètres évalués en vue d'identifier des biomarqueurs.....	146
Figure 62 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection de 1 pmol de standard Ethénonucléosides (ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG).....	147
Figure 63 - Test de reproductibilité de formation des Ethénonucléosides dans le plasmide après traitement avec trois concentrations en CAA : 100, 150 et 200 mM par dosage HPLC-MS/MS.....	149
Figure 64 - Comparaison de la proportion des trois types d'Ethénonucléosides formés dans le plasmide suite au traitement avec le CAA. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)	150
Figure 65 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection du plasmide traité à 100 mM CAA	150
Figure 66 - Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% avec marquage BET : la forme superenroulée du plasmide est de 92, 90.4, 90.4 et 90.3% respectivement pour les puits 1, 2, 3 et 4.....	151
Figure 67 - Profil de réparation obtenu avec des extraits HeLa aux concentrations 0.2 et 0.6 mg/mL en utilisant le plasmide traité avec 100 mM CAA	152
Figure 68 - Profil de réparation obtenu avec des extraits HeLa aux concentrations 0.2 et 0.6 mg/mL en utilisant le plasmide traité avec 200 mM CAA	152
Figure 69 - Courbe de cytotoxicité du composé CAA après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2.....	154

Figure 70 - Courbe de cytotoxicité du composé IFO après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2.....	155
Figure 71 - Formation des lésions Ethénonucléosides (ϵ dG, ϵ dA et ϵ dC) dans les cellules A549 traitées à la dose IC ₂₀ avec le composé IFO pendant 24 et 48h.....	157
Figure 72 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection : A) de 1 pmol de standard Ethénonucléosides (ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG) - B) d'un échantillon d'ADN cellulaire de la lignée A549 traitée avec IFO à la dose IC ₂₀ 24h.....	158
Figure 73 - Formation des lésions oxydatives de type 8oxodG dans les cellules A549 traitées à la dose IC ₂₀ avec le composé CAA pendant 24 et 48h.....	159
Figure 74 - Profil de réparation obtenu avec l'extrait de référence HeLa à la concentration 0.6 mg/mL en dCTP-Cy3.....	159
Figure 75 - Profil de réparation obtenu avec les extraits protéiques des lignées A549 (en bleu) et HepG2 (en rouge) à la concentration de 0.15 mg/mL en dCTP-Cy3	160
Figure 76 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion sur la lignée cellulaire A549 et HepG2 avec l'utilisation de dCTP-Cy3.....	161
Figure 77 – Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée HepG2 traitée à l' IFO pendant 24h aux différentes doses (IC ₂₀ /50, IC ₂₀ /10 et IC ₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl)*p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)	162
Figure 78 - Chromatogramme obtenu en HPLC-MS/MS après injection de 200 fmol de standard BPDE-N ² -dG en MS/MS.....	164
Figure 79 - Formation de l'adduit BPDE-N ² -dG dans le plasmide traité au BPDE pendant 2h à 37°C en fonction de la concentration en BPDE	165
Figure 80 - Comparaison des profils de réparation obtenus avec des extraits HeLa et Huh7 à la concentration de 0.4 mg/mL en utilisant le plasmide BPDE 100 μ M.....	166
Figure 81 - Profil de réparation obtenu au niveau de la lésion BPDE avec l'utilisation des extraits protéiques provenant de la lignée cellulaire Huh7 à une concentration de 0.4 mg/mL.....	167
Figure 82 - Profil de réparation obtenu avec des extraits Huh7 aux concentrations 0.2 et 0.4 mg/mL en utilisant le plasmide BPDE 100 μM	167
Figure 83 - Courbe de cytotoxicité du composé BPDE après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2.....	170
Figure 84 - Courbe de cytotoxicité du composé B[a]P après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2.....	171

Figure 85 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dG lors du traitement des cellules A549 avec 175 (IC ₂₀ 48h) et 350 nM (IC ₂₀ 24h) de BPDE . Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	173
Figure 86 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dG lors du traitement des cellules HepG2 avec 200 (IC ₂₀ 48h) et 800 nM (IC ₂₀ 24h) de BPDE . Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	174
Figure 87 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dG lors du traitement des cellules A549 avec 100 (IC ₂₀ 48h) et 200 µM (IC ₂₀ 24h) de B[a]P . Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	175
Figure 88 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dG lors du traitement des cellules HepG2 avec 1 (IC ₂₀ 48h) et 150 µM (IC ₂₀ 24h) de B[a]P . Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	175
Figure 89 - Cinétique de formation des lésions 8oxodG lors du traitement des cellules A549 avec 175 nM BPDE (IC ₂₀ 48h) ; et des cellules HepG2 avec 800 nM BPDE (IC ₂₀ 24h). Les quantités de lésions sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	177
Figure 90 - Cinétique de formation des lésions 8oxodG lors du traitement des cellules A549 avec 100 (IC ₂₀ 48h) et 200 µM (IC ₂₀ 24h) de B[a]P ; et des cellules HepG2 avec 150 µM (IC ₂₀ 24h) de B[a]P . Les quantités de lésions sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis).....	178
Figure 91 - Rapport de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée A549 traitée au DMSO 0.2 ou 0.5% pendant 24 ou 48h par rapport à l'extrait protéique de la lignée A549 non traitée. *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA).....	179
Figure 92 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée A549 traitée au BPDE pendant 24h aux différentes doses (IC ₂₀ /50, IC ₂₀ /10 et IC ₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)	180
Figure 93 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée HepG2 traitée au BPDE pendant 24h aux différentes doses (IC ₂₀ /50, IC ₂₀ /10 et IC ₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)	181
Figure 94 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion sur la lignée cellulaire HepG2 pour l'extrait protéique contrôle (Ctrl) et la dose intermédiaire de BPDE 24h (IC ₂₀ /10).....	182
Figure 95 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée HepG2 traitée au BPDE pendant 48h aux différentes doses (IC ₂₀ /50, IC ₂₀ /10 et IC ₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)	182

Figure 96 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **HepG2** traitée au **B[a]P** pendant **48h** aux différentes doses ($IC_{20}/50$, $IC_{20}/10$ et IC_{20}) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ (Test ANOVA) 183

Figure 97 - Schéma général des quatre phases cellulaires du devenir d'un xénobiotique (source : Mémo visuel de Biochimie) 193

Liste des Tableaux

Tableau 1 - ADN N-glycosylases chez les mammifères intervenant dans la voie BER (adaptée de Krokan and Bjoras, 2013).....	44
Tableau 2 - Principales maladies impliquant des défauts dans les voies de réparation (adaptée de Ciccia and Elledge, 2010; Hoeijmakers, 2009; Jeppesen et al., 2011).....	60
Tableau 3 - Récapitulatif des principaux médiateurs impliqués dans la DDR en fonction des transducteurs	68
Tableau 4 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test des comètes	78
Tableau 5 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de la technique HPLC-MS/MS.....	80
Tableau 6 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test HCR.....	82
Tableau 7 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test Glyco-SPOT.....	86
Tableau 8 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test ExSy-SPOT.....	87
Tableau 9 - Composition des tampons de lyse A et B et de la solution de NaI utilisés pour l'extraction d'ADN.....	122
Tableau 10 - Composition des tampons de lyse A et B pour la préparation des extraits protéiques nucléaires.....	131
Tableau 11 - Concentration finale en réactifs lors du test ExSy-SPOT	133
Tableau 12 - Résumé des différentes concentrations utilisées pour les deux composés CAA et IFO en fonction des deux lignées cellulaires : A549 et HepG2	156
Tableau 13 - Tableau récapitulatif des différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées sur la lignée cellulaire HepG2 traitée ou non à l'IFO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Test ANOVA).....	162
Tableau 14 - Résumé des différentes concentrations utilisées pour les deux composés BPDE (en nM) et B[a]P (en μM) en fonction des deux lignées cellulaires : A549 et HepG2	172
Tableau 15 - Tableau récapitulatif des différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées sur la lignée cellulaire HepG2 traitée ou non au BPDE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Test ANOVA) ...	181
Tableau 16 - Tableau synthétique des différents résultats obtenus au cours de ce projet en fonction des composés et des lignées cellulaires	186
Tableau 17 - Tableau récapitulatif des différents résultats obtenus en fonction des composés, de la lignée cellulaire, du temps de traitement et de la méthode utilisée.	200

Avant-propos

Une des préoccupations majeures en santé humaine concerne les substances génotoxiques que l'on peut retrouver en milieu environnemental ou professionnel. Par ailleurs, les êtres humains sont constamment confrontés à des agents génotoxiques exogènes chimiques ou physiques. Ils peuvent être retrouvés de manière naturelle comme les ultraviolets (UV) ou être liés aux activités humaines comme les polluants atmosphériques, les résidus industriels ou encore les rayonnements ionisants (IR) pouvant survenir suite à des catastrophes nucléaires. Ces agents génotoxiques induisent différents types de lésions sur l'ADN. Pour préserver son information génétique, la cellule possède divers mécanismes de réparation qui permettent leur élimination. L'ensemble de ces voies de réparation constitue un système de protection puissant contre ces différentes attaques. Cependant, si ces lésions ne sont pas réparées, cela peut entraîner des mutations et donc un risque accru de développer certaines maladies comme le cancer, des maladies neurodégénératives ou encore un vieillissement prématuré.

Aujourd'hui face aux conséquences des expositions à des génotoxiques de l'environnement, il existe une demande sociétale grandissante de pouvoir caractériser le risque d'exposition ainsi que d'évaluer les conséquences. L'impact de ces agents exogènes sur l'organisme a d'ailleurs conduit à l'émergence d'un nouveau domaine, la biosurveillance en santé environnementale. Celle-ci a pour but de mieux appréhender l'exposition globale en identifiant des indicateurs de ces expositions. Pour cela, aux cours des dernières années, on a pu assister à une intensification du développement de biomarqueurs. Cependant, une des limites principales dans ce domaine est le manque de méthodes et de biomarqueurs disponibles pour toutes les expositions environnementales présentant un intérêt sanitaire. Il y a donc un fort intérêt à développer de nouvelles méthodes qui permettront d'élaborer des biomarqueurs pertinents afin d'estimer le risque de l'exposition des êtres vivants à ces génotoxiques.

Ce projet de recherche a pour but de participer au développement de la biosurveillance en explorant la réponse cellulaire induite suite à une exposition à des agents génotoxiques de l'environnement. L'étude de ces mécanismes a été effectuée sous deux approches :

- La mesure des lésions formées dans l'ADN au cours de l'exposition
- La mesure des activités de réparation de l'ADN

Le premier chapitre de manuscrit permet d'aborder différentes notions importantes autour des biomarqueurs, des différents types de lésions et des voies de réparation qui existent chez les êtres vivants. Nous verrons également les différentes caractéristiques des agents génotoxiques que nous avons sélectionnés pour ce projet afin d'appréhender au mieux l'interprétation des résultats obtenus

qui suivront. Les objectifs de la thèse seront ensuite définis. Dans une seconde partie, seront exposées les méthodes utilisées pour atteindre ces objectifs. Enfin, les résultats obtenus au cours de cette étude seront présentés. Ils sont divisés en deux grandes parties en fonction du type d'agent génotoxique utilisé. Pour finir, nous discuterons des résultats puis conclurons et proposerons quelques perspectives à ce travail.

CHAPITRE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. Les biomarqueurs en biosurveillance

La biosurveillance en santé humaine est un domaine en plein développement qui consiste à surveiller la présence et les effets sur l'organisme des polluants environnementaux. Pour cela, la biosurveillance utilise des biomarqueurs (BM) comme indicateurs de l'exposition à ces agents externes. Cette première partie va donc s'intéresser à définir ce qu'est la biosurveillance et les différents types de biomarqueurs qui sont développés.

1.1. La biosurveillance humaine

Selon l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), la biosurveillance humaine également appelée biométrie (biomonitoring) ou encore surveillance biologique de l'exposition (SBE) permet de « surveiller la présence, dans l'organisme, d'agents de notre environnement ou de leurs produits de dégradation ». Elle consiste également à évaluer les effets sur l'organisme de ces substances exogènes. La biosurveillance se veut un outil puissant puisqu'elle permet en théorie de caractériser l'exposition de la population par une approche intégrant les différentes sources et voies d'exposition.

C'est un domaine récent puisqu'en France, la biosurveillance a vu le jour en 1985. Depuis, elle n'a cessé d'évoluer et a été mentionnée pour la première fois au niveau européen en 1995 conduisant à la création d'un comité scientifique. Au niveau national, l'évolution de ce secteur d'application est de plus en plus importante depuis la création du Plan National Santé-Environnement (PNSE) en 2004. Suite au Grenelle Environnement de 2009, un nouveau PNSE a notamment été élaboré comprenant un programme de biosurveillance. Celui-ci a permis la mise en place d'un dispositif expérimental de traçabilité des expositions professionnelles aux produits Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxiques (CMR). Il prévoit également des actions pour réduire les expositions à ces agents.

Traditionnellement, les expositions aux polluants étaient étudiées en utilisant les concentrations mesurées dans l'environnement comme l'air, le sol, l'eau ou l'alimentation. Or, aujourd'hui, la surveillance biologique permet une meilleure approche du risque sanitaire puisqu'elle a pour objectif de s'intéresser à l'individu en évaluant directement la dose de polluant absorbée par son organisme afin d'estimer la charge biologiquement active et d'évaluer le risque pour la santé. Cette nouvelle vision est

essentielle étant donné que la présence de substances dans l'organisme ne signifie pas nécessairement un risque pour la santé (Paustenbach and Galbraith, 2006).

Les objectifs de la biosurveillance sont variés, celle-ci permet notamment (Fréry et al., 2009) :

- d'enrichir la connaissance du lien entre les expositions environnementales et les effets sanitaires,
- de caractériser et de suivre les variations géographiques et temporelles des expositions,
- d'identifier et de décrire l'imprégnation de populations à risque, fortement exposées ou particulièrement sensibles, pour cibler des programmes de réduction des expositions,
- d'améliorer et d'évaluer les mesures de gestion des risques,
- de fournir un signal d'alerte précoce.

Concernant la gestion des risques environnementaux, la biosurveillance s'avère être un outil précieux puisqu'elle fournit les informations nécessaires aux décideurs afin d'identifier les priorités en termes de stratégies de réduction des expositions (Verrier et al., 2009).

De plus, elle permet d'apporter les renseignements utiles aux acteurs de santé publique, médecins et scientifiques pour les aider à identifier l'existence d'une exposition à certains polluants de l'environnement, faciliter l'identification de leurs sources et prévenir les maladies ou symptômes pouvant provenir d'une telle exposition.

Un des buts de la biosurveillance est également d'établir des valeurs de référence pour des substances dosées dans la population générale. Pour cela, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) définit des valeurs limites biologiques (VLB) à ne pas dépasser, ou des valeurs biologiques de référence (VBR) qui sont issues de la population générale non exposée (ANSES, 2017).

Ces valeurs sont établies à partir d'indicateurs biologiques d'exposition (IBE) qui utilisent notamment des biomarqueurs. Ces biomarqueurs sont donc essentiels en biosurveillance. Nous allons maintenant les définir et décrire les différents types qui existent.

1.2. Généralités sur les biomarqueurs

La notion de BM est issue du domaine de l'épidémiologie moléculaire qui correspond à l'utilisation de la biologie moléculaire et de l'épidémiologie pour comprendre les causes de survenue de certaines maladies comme le cancer, et améliorer leur prévention (Perera and Weinstein, 2000).

Les biomarqueurs ont été définis par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré dans le corps humain ou les matrices biologiques susceptibles d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie » (Toniolo et al., 1997).

Les BM peuvent donc être révélateurs d'expositions environnementales, de maladies, de troubles ou d'une prédisposition génétique.

La mesure de BM est le plus couramment effectuée à l'aide d'échantillons faciles à collecter utilisant des méthodes non invasives comme la collecte d'urine, de cheveux, de lait maternel, des fragments d'ongles ou encore d'air expulsé. Cependant, elle peut également être réalisée à partir de méthodes invasives comme les prélèvements de sang, des tissus lipidiques voire d'autres types de tissus.

Cependant, le développement de BM en biosurveillance reste un challenge. En effet, un BM doit être mesuré avec une précision et une reproductibilité suffisantes ce qui apporte de nombreuses contraintes pour la validation scientifique.

1.3. Atouts et limites des BM en biosurveillance

Idéalement, les BM permettent de suivre l'impact des substances sur les êtres humains en évaluant (Mistretta and Charlier, 2013) :

- La durée de l'exposition,
- l'absorption d'une substance par l'organisme en intégrant toutes les voies d'exposition (ingestion, inhalation ou cutanée),
- l'ensemble des sources d'exposition : professionnelle ou environnementale,
- la quantité de substance absorbée par un individu en tenant compte de facteurs autres que l'exposition comme la susceptibilité individuelle (polymorphisme génétique, âge, ...),
- l'efficacité des équipements de protection individuelle (port du masque, gants, ...) dans le cas d'exposition professionnelle.

Cependant, il existe certaines limites notamment dans l'interprétation des résultats qui peut s'avérer particulièrement difficile puisque (Mistretta and Charlier, 2013) :

- les IBE peuvent varier d'un pays à l'autre,
- il existe un nombre réduit de valeurs de référence (VLB ou VBR),

- les liens existants d'une part entre ces valeurs de référence et les répercussions possibles sur la santé, et d'autre part entre le niveau et le temps d'exposition sont mal connus pour la plupart des substances exogènes,
- l'interprétation du taux de certains BM ne permet pas de distinguer une exposition récente, d'une exposition chronique.

Au-delà de ces limites concernant l'interprétation des résultats, il y a également plusieurs freins pour le développement de BM qui concernent des aspects éthiques et pratiques pour le prélèvement d'échantillons biologiques. De plus, la mise en place d'études au niveau des populations impose une logistique importante qui constitue un aspect lourd sur le plan financier et organisationnel.

Enfin, il est également important de noter que les BM sont étroitement liés aux données épidémiologiques et aux études toxicologiques. Or, il y a un manque important d'information sur les agents environnementaux à ces deux niveaux rendant le développement de BM d'autant plus complexe.

1.4. Les différents types de BM en biosurveillance

Malgré les limites que nous venons de citer, les BM sont les seuls outils qui permettent d'apporter des informations afin de mieux appréhender le risque sanitaire lié aux expositions environnementales. Ils représentent donc le chaînon manquant entre l'environnement et les effets sanitaires afin d'établir un lien de causalité. Les BM sont divisés en trois types (Fréry et al., 2009; Manno et al., 2010; Orsière et al., 2008) :

Les biomarqueurs d'exposition :

Ils permettent de mettre en évidence une exposition actuelle ou passée en estimant la quantité de substances exogènes absorbées ou éventuellement accumulées dans l'organisme. Il peut s'agir du dosage de la substance elle-même ou de métabolites dans les différents échantillons biologiques.

On distingue deux types de BM d'exposition :

- Les BM d'exposition de dose interne c'est-à-dire des indicateurs de la présence d'une substance dans l'organisme (exemple : métabolites urinaires)
- Les BM d'exposition de dose biologique active (ou dose efficace) c'est-à-dire la dose de la substance exogène qui va entrer en contact avec une cible de l'organisme (exemple : adduits de l'ADN)

Ce sont les plus répandus et les mieux validés parmi les trois types de BM qui existent. Ce type de BM apparaît après l'exposition à un agent exogène.

Les biomarqueurs d'effet :

Ils reflètent l'interaction entre l'agent exogène et l'individu ce qui se traduit par la mesure d'un changement biologique. Ils permettent d'aider à la compréhension des mécanismes qui mènent à l'apparition de cette modification. Contrairement aux BM d'exposition, ils sont peu ou pas spécifiques de l'exposition à une substance.

On distingue également dans ce type de BM deux catégories :

- BM d'effets précoces qui sont proches de l'exposition (exemples : lésions oxydatives, effets cytogénétiques, mutations)
- BM d'effets tardifs qui sont proches de la survenue de la maladie (exemple : activation ou inhibition de certains gènes)

Les biomarqueurs de susceptibilité :

Ce type de BM est plus complexe puisqu'ils incluent un ensemble de paramètres (âge, genre, mode de vie, polymorphisme génétique, ...) qui permet d'expliquer la variabilité des réponses entre les individus pour un niveau d'exposition semblable. Ils permettent d'estimer la capacité innée ou acquise d'un individu à répondre de façon spécifique à une exposition, et donc de la probabilité de la survenue de la maladie. On peut citer en exemples, la variation de réponse d'enzymes ou des mécanismes de réparation de l'ADN.

Ces BM sont disponibles avant, pendant et après l'exposition et permettent de prédire un risque accru des effets de l'exposition à un agent. Ce type de BM est encore exploratoire dans le domaine de l'environnement.

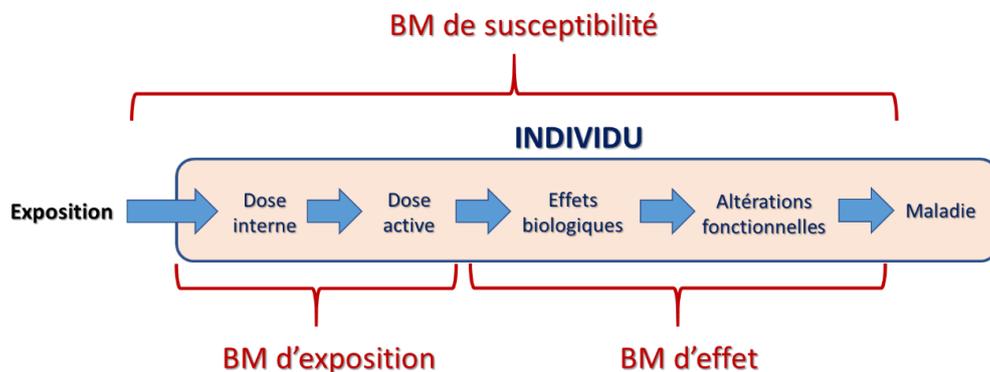


Figure 1 - Les différents types de BM utilisés afin de suivre les conséquences de l'exposition à une substance exogène

1.5. Expositions environnementales et professionnelles

Les BM peuvent être utiles pour différentes applications :

- à titre préventif en médecine du travail, dans le cas de surveillance d'expositions professionnelles afin de pouvoir adapter les différents moyens de protection mis en place pour les travailleurs exposés,
- en épidémiologie, afin de suivre les expositions de certaines populations à des polluants.

Les expositions aux substances exogènes peuvent être classées en deux types : environnementales et professionnelles.

Dans les pays industrialisés, la source d'exposition la plus importante provient des activités professionnelles. En 2005, en France, plus de 10% des salariés soit environ 2 250 000 personnes, ont été exposés à des produits CMR (Figure 2).



Figure 2 - Histogramme des différents agents cancérigènes en fonction du nombre de salariés exposés (Brosselin and El Yamani, 2006)

Plusieurs activités de biosurveillance ont été menées par l'InVS au niveau national. Nous verrons plus tard qu'il est difficile d'établir un lien entre une exposition professionnelle et l'apparition d'une maladie. Cependant, parmi les agents exogènes les plus connus, on peut citer la surveillance de la plombémie (taux de plomb dans le sang). En effet, le plomb impose une surveillance périodique des travailleurs exposés et la VLB du plomb à ne pas dépasser est fixée à 400 µg/L de sang pour les hommes et à 300 µg/L pour les femmes. Cette traçabilité des expositions peut être utile dans une démarche de reconnaissance de maladie professionnelle comme le saturnisme (intoxication au plomb).

Un autre exemple concerne les radiations ionisantes dont la surveillance est obligatoire pour toute personne pouvant être exposée dans son travail à un risque nucléaire et radiologique. En France, la valeur limite d'exposition est fixée à 20 mSv/an sur le corps entier. Les travailleurs susceptibles d'être exposés sont répartis en différentes classes selon le niveau d'exposition. Par exemple, pour ceux qui sont les plus exposés, un suivi dosimétrique individuel est obligatoire et est effectué mensuellement. De nombreuses recherches sont actuellement en cours pour identifier les BM les plus pertinents qui pourraient être utilisées pour suivre ces expositions aux IR ainsi que d'évaluer l'impact des doses faibles sur l'individu qui sont souvent difficiles à mettre en évidence (Hall et al., 2017; Pernot et al., 2012).

Concernant les expositions environnementales, on peut citer les études conduites sur la biosurveillance du risque mercuriel en Guyane. En effet, les activités d'orpaillage sont responsables de rejets de mercure dans l'environnement et plus particulièrement dans les rivières. Or, il a été montré que des expositions trop importantes au mercure peuvent conduire à des risques de retard dans le développement psychomoteur. Ce programme de biosurveillance a permis de suivre les concentrations de mercure présentes dans les cheveux et a notamment entraîné plusieurs actions de gestion du risque auprès des enfants et des femmes enceintes (Fréry et al., 2009).

Plus récemment, une étude a porté sur le suivi de l'exposition aux dioxines des populations qui habitent proche de parc d'incinérateurs ou encore les polychlorobiphényles (PCB) utilisés dans l'industrie. Bien que les résultats de l'étude ne soient pas interprétables au niveau des effets sanitaires, celle-ci a permis de fournir un nombre important d'informations sur l'exposition comme l'identification des personnes les plus exposées (Fréry et al., 2007).

La biosurveillance porte une attention particulière aux substances exogènes classées cancérigènes. Nous allons voir maintenant que le lien entre exposition et cancer est très étudié.

1.6. Place du cancer en biosurveillance

De par la fréquence des cancers et la sous-estimation des cancers liées aux expositions, le cancer a pris une place majeure en biosurveillance. En effet, parmi les 17 objectifs du plan cancer 2014-2019 présenté par le gouvernement, l'un d'eux est de « prévenir les cancers liés au travail ou à l'environnement ».

Le cancer est une des premières causes de mortalité en France et son incidence a augmenté de plus de 60% entre 1978 et 2000 (Remontet et al., 2003). Cette maladie est donc devenue un enjeu majeur de santé publique entraînant deux objectifs primordiaux dans les programmes de biosurveillance : d'une

part, de s'intéresser au lien entre cancer et expositions professionnelles et d'autre part entre cancer et expositions environnementales.

Le lien entre cancer et facteurs environnementaux ou professionnels est difficile à établir dû :

- au caractère multifactoriel des cancers : susceptibilité génétique individuelle (polymorphisme de certains gènes qui peuvent moduler les effets de l'environnement), exposition à des agents cancérigènes, mode de vie, habitudes alimentaires, ...
- à la complexité des processus de cancérogénèse qui fait de la prévention du risque cancérigène un véritable défi,
- à la diversité des expositions,
- à l'historique souvent incomplet des expositions au cours de la vie professionnelle ou personnelle,
- à une période de latence longue entre l'exposition et l'apparition de la maladie.

Le travail d'investigation est donc complexe et entraîne une estimation de l'exposition des individus aux agents exogènes et cancérigènes qui s'avère difficile et délicate.

Cependant, suite à de multiples scandales sanitaires, de nombreux dispositifs ont pu être mis en place au cours des dernières années et ont permis d'établir des liens entre certaines expositions et certains types de cancers.

Concernant l'exposition professionnelle, il est estimé que 13.5% des salariés seraient exposés à un ou plusieurs agents cancérogènes au cours de leur activité professionnelle (Sandret and Guignon, 2005). Parmi les cancers qui ont pu être associés à des expositions professionnelles, on peut citer l'exposition à l'amiante qui provoque des cancers du revêtement des poumons, du cœur et de la cavité abdominale (mésothéliome) ou encore les sarcomes qui sont corrélés à une exposition au chlorure de vinyle dont nous reparlerons plus en détail dans la dernière partie de ce chapitre.

En ce qui concerne les expositions environnementales, 5 à 10% des cancers seraient liés à des facteurs environnementaux selon le rapport de l'InVS publié en 2003 alors que l'OMS les estime à 19%. Ces chiffres varient dus aux difficultés que nous avons présentées précédemment pour établir une corrélation entre cancer et exposition environnementale. Cependant, il a été montré que le rayonnement solaire entraîne un développement accru de cancers cutanés et que l'exposition au radon présent dans les régions à forte radioactivité naturelle conduit à des cancers du poumon.

Depuis la prise de conscience de l'ensemble des paramètres que nous venons de citer ainsi que la mise en place de différents dispositifs en biosurveillance, l'exposition est de mieux en mieux estimée pour les travailleurs et la population.

Les agents cancérigènes peuvent être classés selon différentes catégories. Ils peuvent notamment être répartis selon leur mode d'action principal en deux types (INSERM, 2005) :

- les agents non génotoxiques qui n'agissent pas directement sur les gènes, mais qui participent au processus de cancérogenèse,
- les agents génotoxiques qui agissent directement sur les gènes par mutations dûs à leur capacité à interagir avec l'ADN et à entraîner la formation de dommages.

Ce projet s'intéresse à ce dernier type d'agents et nous allons maintenant détailler les différents types de lésions qui peuvent être formés dans l'ADN.

2. Lésions de l'ADN

2.1. Généralités

L'acide désoxyribonucléique ou communément appelé ADN est le support de l'information génétique permettant le développement et le fonctionnement des cellules ainsi que le vecteur de l'hérédité d'une génération de cellules à l'autre. Chez les eucaryotes, on le retrouve dans le noyau où ont lieu plusieurs événements majeurs comme la transcription et la réplication. C'est également à cet emplacement qu'a lieu la réparation des dommages de l'ADN auquel nous nous intéresserons particulièrement dans ce projet de recherche. Dans ce compartiment cellulaire, l'ADN se trouve compacté grâce à des protéines, les histones, sous la forme de chromosome permettant ainsi un stockage ordonné et très dense de l'ADN. Chaque cellule possède 23 paires de chromosomes et si l'on mettait bout à bout l'ensemble des brins de l'ADN, la taille mesurerait deux mètres.

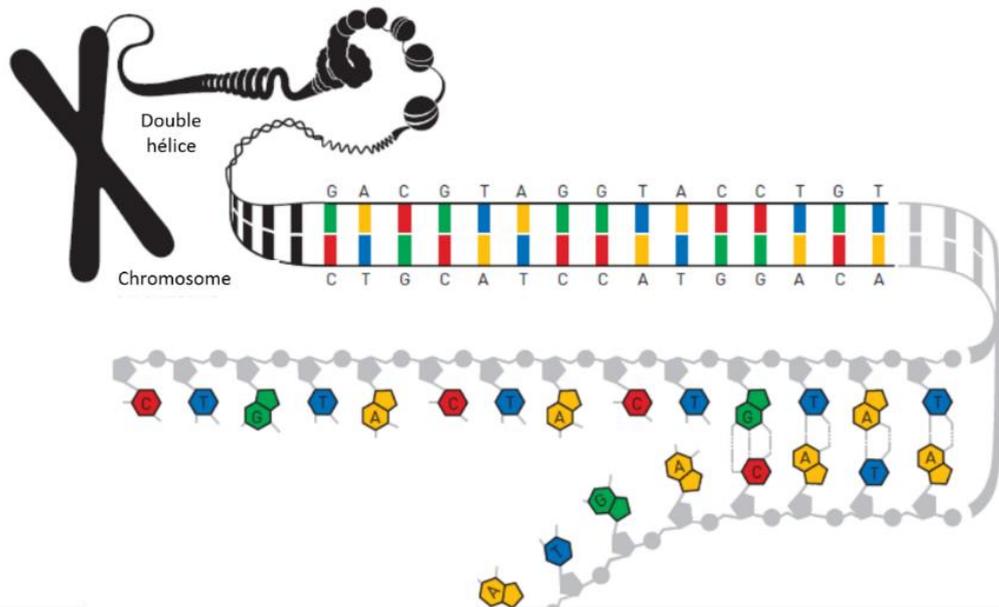


Figure 3 - Du chromosome à l'ADN (adaptée de The Royal Swedish Academy of Science website)

Sa structure biochimique fut élucidée en 1953 par Watson et Crick qui ont proposé un modèle en double hélice, grâce aux clichés d'ADN obtenus par diffraction des rayons X de Rosalind Franklin. L'ADN est une molécule très longue formée d'un enchainement de nucléotides. Un nucléotide est constitué d'un sucre, d'un phosphate et d'une base azotée. Il existe quatre bases différentes donnant lieu à quatre nucléotides : l'Adénine (A), la Thymin (T), la Cytosine (C) et la Guanine (G) qui s'associent de manière complémentaire : A avec T et C avec G (Figure 4). L'ensemble des chromosomes d'une cellule représente 3 milliards de paires de nucléotides.

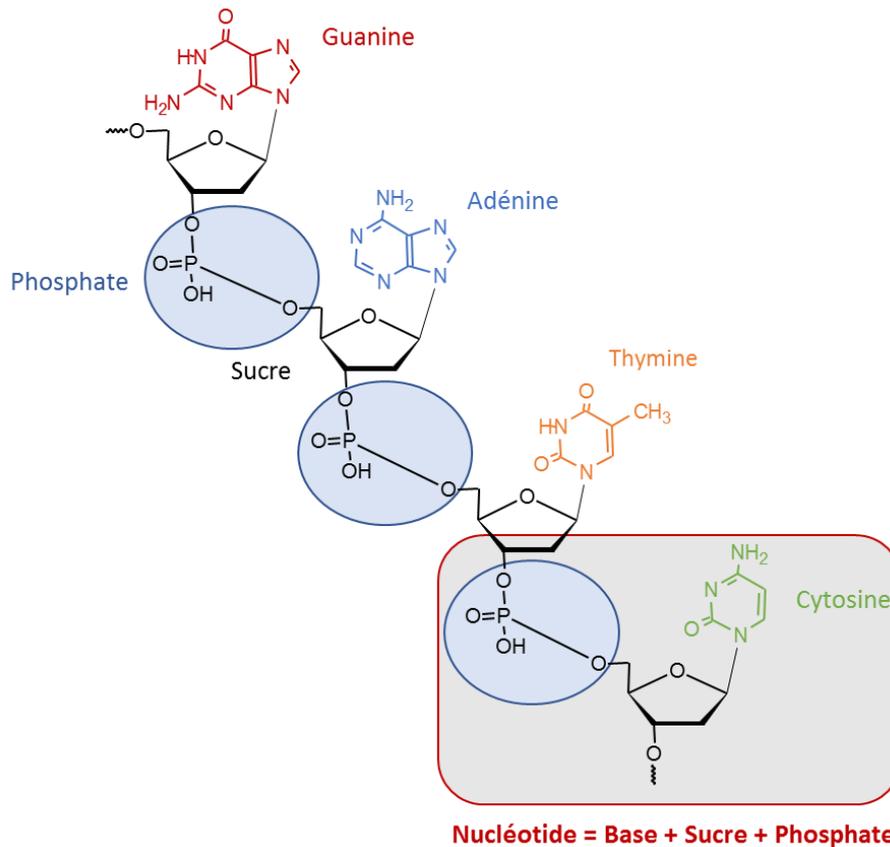


Figure 4 - Structure biochimique de l'ADN

Comme nous l'avons vu précédemment, les êtres humains sont soumis à des agressions provenant de différentes sources exogènes (UV, IR, polluants atmosphériques, ...) qui peuvent conduire à différents types de dommages dans l'ADN que nous allons détailler dans la suite de cette partie (Lindahl, 1993). Une lésion ou un dommage de l'ADN correspond à une modification chimique de l'ADN susceptible de perturber le fonctionnement de la cellule.

Ces lésions peuvent être également provoquées par des facteurs endogènes c'est-à-dire par des molécules qui seront générées via le métabolisme normal des cellules. En effet, certains mécanismes cellulaires entraînent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduisant à différents types de lésions présentes naturellement dans les cellules. De plus, l'ADN est le siège de réactions d'hydrolyse ou d'alkylation.

Chaque jour, on estime que les 100 000 milliards de cellules qui constituent notre organisme subissent la formation d'environ 100 000 lésions dans le génome humain suite au métabolisme cellulaire (Hoeijmakers, 2009). Avantageusement, la cellule possède divers mécanismes de réparation spécifique

d'un type de dommage qui permettent leur élimination afin d'éviter la formation de mutations (Figure 5).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons détailler les différents types de lésions qui peuvent être formées dans l'ADN en fonction de leurs sources exogènes ou endogènes ainsi que les mécanismes qui existent pour réparer ces lésions. Puis, nous verrons les différentes méthodes qui permettent d'évaluer la réparation de ces lésions.

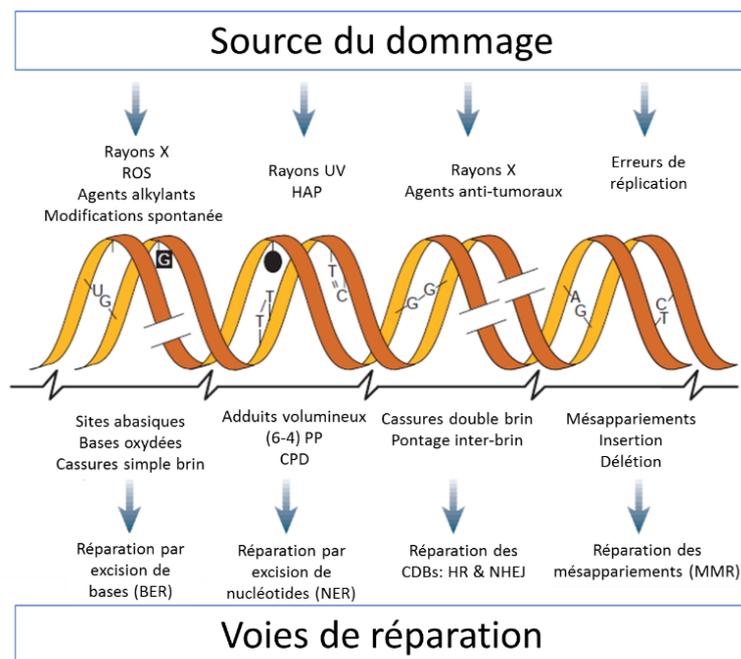


Figure 5 - Les principaux types de lésions de l'ADN & les voies de réparation (adaptée de Hoeijmakers, 2001)

Etant donné qu'il existe un grand nombre de lésions qui peuvent être formées dans l'ADN, nous nous focaliserons uniquement sur les dommages qui vont être étudiés dans le cadre de ce projet de recherche en les répartissant selon les facteurs endogènes et exogènes.

2.2. Lésions formées de façon endogène et présentes à l'état basal

2.2.1. Les sites abasiques (site AP)

L'hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre le sucre et la base entraîne la perte de la base azotée et ceci concerne toutes les bases (A, T, C & G). En fonction du type de base qui a été enlevé, la lésion formée est appelée site apurinique (A & G) ou site apyrimidinique (T & C) (site AP) (Figure 6).

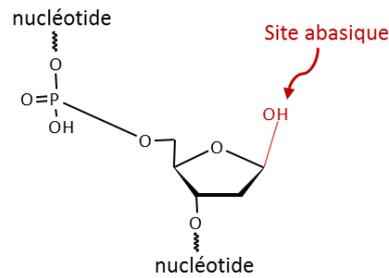


Figure 6 - Structure chimique d'un site AP

Les sites abasiques sont les plus communément retrouvés dans l'ADN avec environ 10 000 sites AP formés dans une cellule par jour (Lindahl and Barnes, 2000). Ils peuvent être générés de différentes manières :

- par perte spontanée de la base suite à une hydrolyse de la liaison N-glycosidique. Il est important de noter que la dépurination est plus fréquente que la dépyrimidination due à une vitesse d'hydrolyse plus rapide sur les bases puriques que pyrimidiques (Gates, 2009),
- par les ADN N-glycosylases qui interviennent lors de la première étape du processus de Réparation par Excision de Base (BER) (McCullough et al., 1999),
- par des facteurs endogènes comme les ROS ou les phénomènes d'alkylation,
- suite à la perte d'adduits instables (Partie les adduits du BPDE ci-après).

2.2.2. Les lésions oxydatives

Dans les conditions physiologiques, les ROS sont des espèces chimiques issues de la chaîne de transport d'électrons pendant la respiration aérobie. A un faible niveau, les ROS sont des médiateurs de processus cellulaires particuliers comme dans les réactions redox ainsi que dans la défense immunitaire en réponse à l'invasion de pathogènes. La production de ces ROS s'effectue principalement de manière endogène suite au métabolisme aérobie dans les mitochondries mais aussi par les NADPH oxydases (lors de la phagocytose), le métabolisme des lipides dans les peroxyosomes et les cyclooxygénases cytosoliques. Au cours de la respiration cellulaire, l'oxygène (O_2) est progressivement réduit par un apport contrôlé de 4 électrons pour donner de l'eau selon les réactions suivantes : $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} \rightarrow H_2O$. Cependant, si cette réduction est incomplète, trois ROS sont potentiellement produits : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Des ROS et des

espèces réactives de l'azote (Reactive Nitrogen Species : RNS) sont également produites en quantité importante en cas d'inflammation.

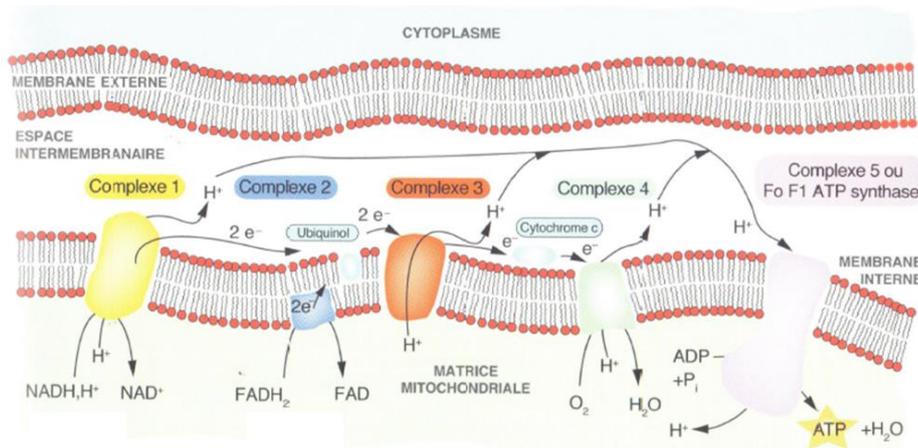


Figure 7 - Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale (source : Mémo visuel de Biochimie)

Ces ROS peuvent également être formées de manière exogène par les IR ou par divers xénobiotiques.

A l'état basal, la quantité de ROS intracellulaire varie peu due à la résultante d'un équilibre entre leur production et leur élimination par les systèmes antioxydants. Cependant, s'il y a une production excessive de ROS ou que l'élimination est diminuée, il y a une induction d'un stress oxydant au sein de la cellule. Les ROS sont responsables de la formation de plus de 100 types de dommages oxydatifs de bases différents ainsi que de cassures simple brin et des pontages ADN-protéine (Cadet et al., 2010; Ravanat et al., 2012). Nous allons voir le détail de deux types de lésions oxydatives produites par ces ROS : la 8oxoG et les diols de pyrimidines.

2.2.2.1. 8oxoG

La lésion la plus abondamment étudiée et produite par les ROS est la 8-oxo-7,8-dihydro-guanine (8oxoG). Ce dommage est formé suite à l'oxydation en position C8 de la guanine qui est la base possédant le potentiel redox le plus bas ce qui en fait une cible préférentielle d'oxydation (Figure 8). La 8oxoG est majoritairement formée à partir de OH[•] (Hall et al., 1996). Par ailleurs, cette lésion est également formée par l'oxygène singulet et par l'oxydation à un électron. Pendant la réplication, cette lésion peut former une paire incorrecte avec la base A au lieu de C entraînant des transversions GC → TA.

La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8oxodG) est le marqueur ubiquitaire du stress oxydatif dans les cellules qui est le plus communément utilisé (Cadet, 2003).

On retrouve ce dommage à un niveau basal autour de 1 lésion/10⁶ nucléotides (ESCODD, 2003). De plus, on estime qu'entre 400 et 1 500 lésions 8oxoG sont formées dans une cellule par jour (Klungland et al., 1999).

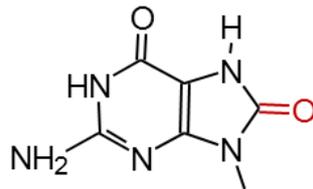


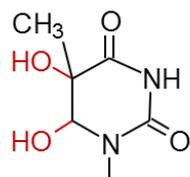
Figure 8 - Structure chimique de la base azotée de la 8oxoG

2.2.2.2. Diols de Thymine et de Cytosine

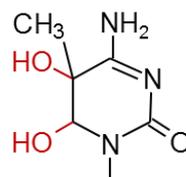
Les lésions 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (diols de Thymine) et 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrocytosine (diols de Cytosine) sont formées par une attaque du radical hydroxyle OH[•] en position C5 et C6 de la double liaison des bases pyrimidiques (Breen and Murphy, 1995) (Figure 9). Ces lésions peuvent également être produite par des facteurs exogènes suite à l'irradiation aux UV mais en quantité minoritaire comparé aux dimères de pyrimidines formés (Partie dommages photo-induits ci-après) ou après IR.

Il a été estimé qu'environ 300 diols de Thymine sont formées dans la cellule par jour (Adelman et al., 1988).

La formation de diols de Cytosine a été détectée plus tardivement que les diols de Thymine car cette lésion est peu stable en solution aqueuse et se dégrade rapidement lorsqu'elle est en sous la forme d'un nucléoside. Cependant, elle s'avère être stable lorsqu'elle est formée dans l'ADN double brin (Tremblay et al., 1999; Wagner and Cadet, 2010).



Diols de Thymine



Diols de Cytosine

Figure 9 - Structure chimique des bases azotées : diols de Thymine & Cytosine

2.2.3. Les bases alkylées

Les acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes plasmiques peuvent être dégradés à partir de ROS ou de RNS par un processus appelé peroxydation lipidique (Lipid peroxidation : LPO). Un excès de LPO peut être induit par divers mécanismes comme l'inflammation chronique, le déséquilibre alimentaire ou par des problèmes dans le transport des métaux. La LPO est une réaction d'oxydation qui opère en trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison (Winczura et al., 2012). Ce mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras conduit à la formation de produits de LPO (Figure 10). Trois principaux produits de type aldéhydique sont formés : 4-hydroxyhydroperoxy-2-nonenal (HPNE), malonaldéhyde (MDA) et 4-hydroxynonenal (4-HNE), les deux derniers composés étant majoritaires (Bartsch and Nair, 2004). Ces produits réagissent directement avec l'ADN pour conduire à la formation de diverses bases alkylées dont la longueur des chaînes alkyles peut varier formant des adduits plus ou moins volumineux. Par exemple, le composé MDA conduit à la formation de MDA-Gua (M1G) et le composé HPNE forment des Ethénobases. Nous allons détailler la formation de ce dernier type de lésions.

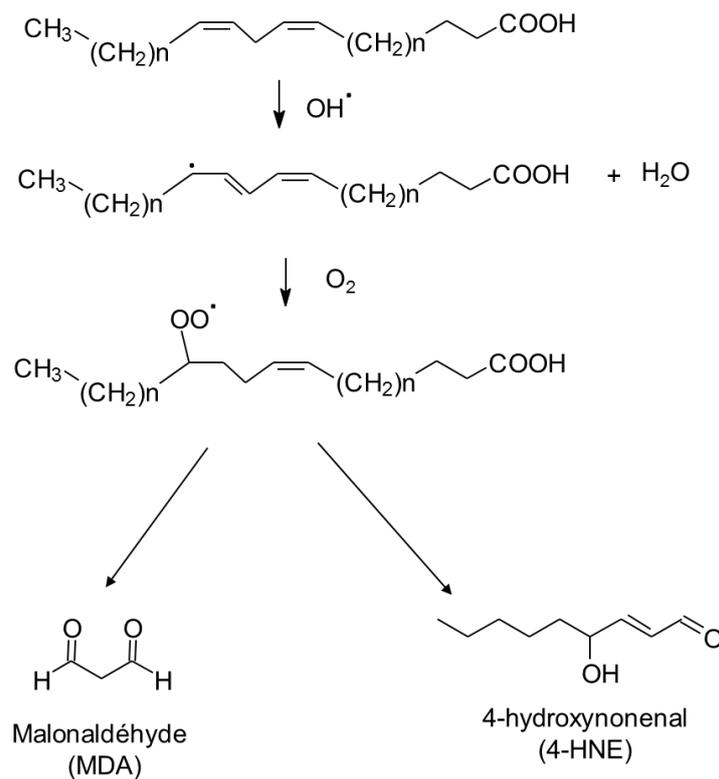


Figure 10 - Schéma de la LPO

Les Ethénobases sont formées par réaction des produits aldéhydiques conjugués avec l'atome N des bases de l'ADN pour former un exocycle (Figure 11). Ces lésions ont été identifiées non pas par l'analyse de produits issus de la LPO mais par l'analyse des conséquences de la réaction de l'ADN avec un agent exogène, le chloroacétaldéhyde (CAA) (Kochetkov et al., 1971).

Il existe un nombre important de type d'Ethénobases pouvant être formées à partir des produits de la peroxydation lipidique (M1G, 4-HNEG, ...). Cependant, dans le cadre de ce projet, nous allons nous focaliser sur les trois Ethénobases suivantes : 1,N²-EthénoGuanine (ϵ G); 1,N⁶-EthénoAdénine (ϵ A) et 1,N⁴-EthénoCytosine (ϵ C) (Cadet et al., 2010).

Ces lésions peuvent également être produites à partir d'agents exogènes comme le chlorure de vinyle (VC), le carbamate de vinyle et l'uréthane. Au cours de ces dernières années, plusieurs recherches se sont focalisées sur ces lésions qui sont considérées comme des marqueurs de LPO (Arab et al., 2008; Bartsch et al., 2011).

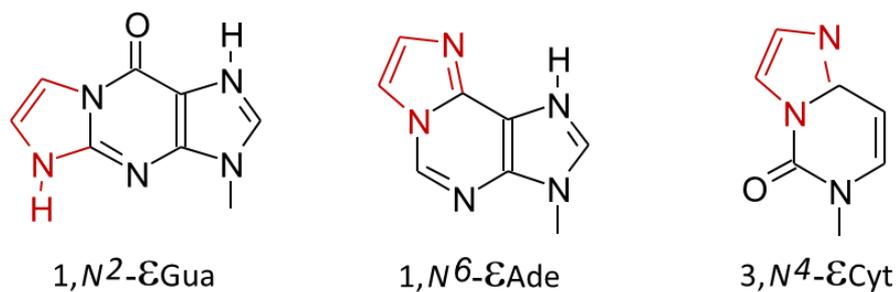


Figure 11 - Structure chimique des bases azotées : EthénoGuanine, EthénoAdénine et EthénoCytosine

2.3. Lésions formées suite à l'exposition à des agents génotoxiques (Facteurs exogènes)

Nous allons décrire dans ce paragraphe des lésions qui peuvent être formées suite à l'exposition à des agents génotoxiques de l'environnement. Nous nous concentrerons uniquement sur les lésions qui seront étudiées dans le cadre de cette étude mais il existe d'autres types de lésions (cassures double brin, pontage ADN-ADN, ...) qui peuvent être également formées. Les lésions que nous allons examiner sont très étudiées et entraînent une forte déformation de la double hélice de l'ADN.

2.3.1. Les dommages photo-induits de l'ADN

Les rayonnements UV du soleil sont divisés en trois classes suivant leur longueur d'onde : UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) et les UVC (190-290nm). L'ADN absorbe à une longueur d'onde maximum de 260 nm soit uniquement les UVC et un peu d'UVB. Cependant, le rayonnement solaire qui atteint la surface terrestre est uniquement constitué d'UVA et UVB car les UVC sont absorbés par la couche d'ozone. Il est composé plus précisément de 5% d'UV (dont 5% UVB et 95% UVA), 63% de lumière visible et 32% d'infrarouge (Sage, 1993).

Les deux types de photoproduits principalement formés suite à une exposition solaire sont les dimères de pyrimidines (bases T et C) de type cyclobutane (CPD) et les photoproduits 6-4 (6-4PP). La proportion de ces deux photoproduits dépend de la dose d'exposition ainsi que de la séquence de l'ADN.

Les CPDs sont formés par réaction de cycloaddition entraînant la formation de liaisons covalentes entre les carbones C5 et C6 de deux bases pyrimidiques (Cadet et al., 2012). Cette modification de la structure chimique des bases entraîne une faible distorsion de la double hélice.

Les 6-4PPs sont produits par une réaction de Paternò-Büchi formant deux liaisons covalentes entre la double liaison située entre les positions C5 et C6 d'une base pyrimidique et le groupe carbonyle ou amino en position C4 d'une seconde base pyrimidique (Cadet et al., 2012). Cette lésion entraîne une distorsion plus importante de la double hélice ce qui la rend plus mutagène que les CPDs. Ces lésions peuvent également être converties en leur isomère de valence Dewar par absorption des photons de longueurs d'onde comprise entre 310 et 340 nm (Taylor et al., 1990).

Les quatre CPDs et 6-4PPs majoritairement formés dans l'ADN sont TT, CT, TC et CC. Cependant, les CPDs TT et TC, et les 6-4PPs TC sont ceux qui sont principalement formés dans l'ADN cellulaire à la suite d'une irradiation aux UVB ou après irradiation avec un simulateur solaire (Cadet et al., 2005; Mouret et al., 2006).

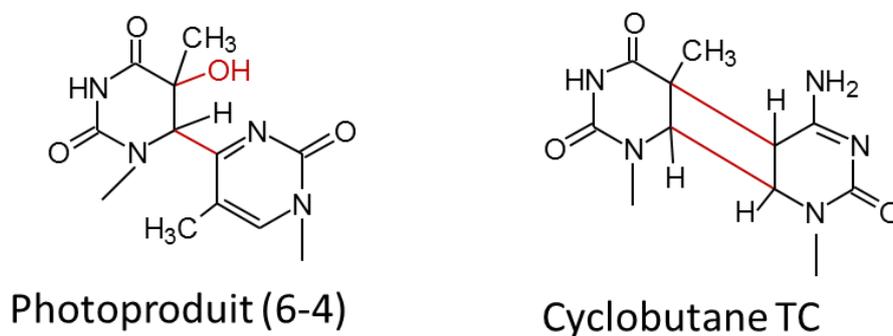


Figure 12 - Structure chimique des bases azotées : 6-4PP de type TT et CPD de type TC

Un bain de soleil d'une journée peut conduire à la formation de 100 000 photoproduits dans un kératinocyte (Hoeijmakers, 2009).

Il est important de noter que les UVB peuvent induire les deux types de photoproduits : CPDs et 6-4PPs et entraînent également la formation de lésions oxydatives 8oxoG mais dans des proportions bien moins importantes comparées aux photoproduits (Kielbassa et al., 1997). De plus, suite à une irradiation de la peau ou de kératinocytes en culture aux UVB, la proportion de CPDs formés est cinq fois plus importante que les 6-4PPs (Mouret et al., 2006).

Les UVA sont beaucoup moins absorbés par l'ADN que les UVB, on pourrait donc penser qu'ils ne peuvent pas induire de dommages. Cependant, ils entraînent la formation de CPDs par un mécanisme direct d'absorption des photons. Ils peuvent également être produits par un processus indirect de photosensibilisation suite à l'excitation de chromophores exogènes (cétone aromatiques, quinolones) qui conduit à un transfert d'énergie triplet (Ridley et al., 2009). Enfin, suite à une irradiation avec un simulateur solaire (SSL), la formation d'isomère de Dewars est détectée de manière significative et la proportion de 6-4-PPs diminue comparée à une irradiation aux UVB (Figure 13). Les UVA induisent également des lésions oxydatives par des processus de photosensibilisation par des chromophores endogènes (flavoprotéines, hémoprotéines, mélanines, ...).

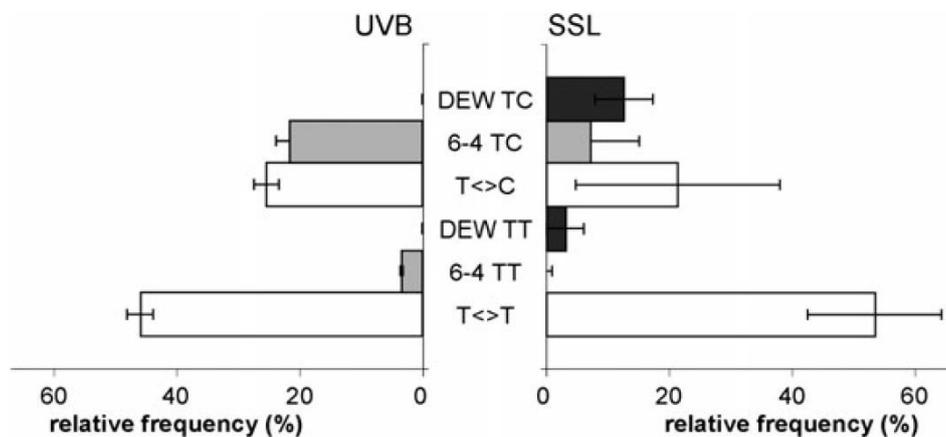


Figure 13 - Distribution relative de la formation des photoproduits dans des cellules CHO suite à une irradiation UVB ou par SSL. La quantification des photoproduits a été effectuée par HPLC-MS/MS (Cadet et al., 2012)

2.3.2. Les adduits du BPDE

Ces adduits sont formés à partir du composé Benzo[a]pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) issus de la biotransformation du Benzo[a]pyrène (B[a]P) appartenant à la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) qui sont des polluants atmosphériques ubiquitaires, issus des activités humaines ou de processus naturels que nous détaillerons plus tard (Partie 6).

Le BPDE existe sous la forme de deux diastéréoisomères : *syn* et *anti*. Chacun pouvant conduire à deux énantiomères : (+) et (-). Il y a donc quatre isomères du BPDE (Geacintov et al., 1997). Nous ne parlerons ici que de l'isomère (+)-*anti*-BPDE qui est la forme la plus réactive vis-à-vis de l'ADN et qui est la plus mutagène pour les cellules (Geacintov et al., 1997; Xue and Warshawsky, 2005). Le BPDE est caractérisé par la présence d'un diol époxyde possédant des propriétés électrophiles qui lui permettent de réagir avec les sites nucléophiles présents dans l'ADN. Il en existe quatre qui sont des groupements amines exocycliques : les positions N² et N⁷ de la base G, la position N⁶ de A et la position N⁴ de C. Cela peut donc conduire à la formation de quatre adduits du BPDE : BPDE-N²-G ; BPDE-N⁷-G ; BPDE-N⁶-A et BPDE-N⁴-C. Cependant, la localisation de la liaison conditionne la stabilité chimique de l'adduit formé. En effet, l'adduit BPDE-N⁷-G présente une forte instabilité s'accompagnant de la formation d'un site AP suite à l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique. Ces adduits formés sont volumineux comparés aux autres types de lésions que nous avons décrits jusqu'à maintenant comme nous pouvons le voir sur la Figure 14.

Parmi les agents exogènes responsables de la formation de ces adduits, le tabagisme (20 cigarettes/jour) induit la formation d'environ 100 à 200 adduits par cellule (Phillips et al., 1988).

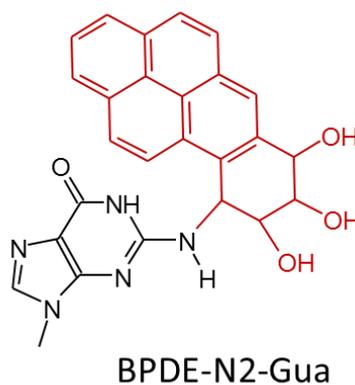


Figure 14 - Structure chimique de la base azotée : BPDE-N²-Gua

3. Les voies de réparation de l'ADN

Nous allons voir maintenant les principales voies de réparation de l'ADN chez l'Homme. Il en existe sept : la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation directe (DR), la réparation des mésappariements (MMR), la recombinaison homologue (HR), la réparation non-homologue (NHEJ) et la réparation des pontages inter-brins (ICLR). Ces mécanismes de réparation vont être adaptés à la prise en charge des différentes lésions formées dans l'ADN.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous allons détailler plus précisément deux voies de réparation : la BER et la NER puisqu'elles sont impliquées dans la réparation des lésions que nous venons de décrire. Nous introduirons seulement brièvement les autres voies de réparation.

Ces mécanismes de réparation ont des processus bien différents notamment au niveau des protéines qui interviennent dans chacune des voies. Cependant, certaines étapes sont similaires dans tous ces mécanismes (sauf la DR et la NHEJ). En effet, ces systèmes procèdent en quatre grandes étapes :

- La reconnaissance de la lésion par une protéine spécialisée,
- L'élimination de la zone lésée,
- La synthèse *de novo* d'un brin correct à partir du brin complémentaire,
- La suture du squelette phosphodiester par une ADN ligase.

Ces différentes étapes permettent un assemblage séquentiel des facteurs impliqués dans les voies de réparation autour de la lésion.

3.1. La réparation par excision de bases (BER)

La réparation par excision de bases (Base Excision Repair : BER) corrige des « petits » dommages spécifiques des bases qui n'entraînent pas de distorsion importante de la double hélice de l'ADN. Ce type de dommage est retrouvé dans les cas de dégradation spontanée de l'ADN entraînant la formation de sites AP, de cassures simple brin ou des suites de l'oxydation (8oxoG, diols de Thymine et de Cytosine), la méthylation, la désamination (C désaminé en U) ou encore la peroxydation lipidique (Ethénobases) (Lindahl, 1993). Cette voie de réparation a lieu dans deux compartiments cellulaires : le noyau et les mitochondries. Dans le noyau, la BER est active tout au long du cycle cellulaire mais elle est particulièrement active en phase G1 du cycle cellulaire (Dianov and Hübscher, 2013). Comme nous l'avons vu, elle se déroule en quatre étapes : la première est spécifique à la lésion et est initiée par une famille d'enzymes appelée ADN N-glycosylases dont la première fonction est la reconnaissance des différents dommages. Les trois prochaines étapes présentent des mécanismes différents dépendant du type d'ADN N-glycosylase prenant en charge la lésion ainsi que de l'état physiologique de la cellule. Nous allons décrire en détail les différents acteurs impliqués dans les quatre étapes de ce mécanisme de réparation.

3.1.1. Première étape : Reconnaissance du dommage

Elle consiste à reconnaître et exciser la liaison N-glycosidique entre le sucre et la base lésée par une ADN N-glycosylase (Hegde et al., 2008). Les ADN-N-glycosylases sont indispensables à ce mécanisme de réparation puisqu'elles sont capables de trouver de petites lésions cachées dans un très large excès de bases « normales ». Chez les mammifères, au moins onze ADN N-glycosylases localisées dans le noyau ont été identifiées et sont spécifiques d'un type de dommage ou d'un groupe (Krokan and Bjoras, 2013) (Tableau 1). Par exemple, la glycosylase OGG1 prend en charge deux lésions oxydatives dont la 8oxoG et SMUG1 prend en charge quatre lésions dont ϵ C. Elles viennent se lier à l'ADN dans le petit sillon et vont ensuite basculer la base endommagée dans le grand sillon (Huffman et al., 2005).

Ils existent deux types de glycosylases classés selon leur mode d'action :

- Les glycosylases dites monofonctionnelles qui ne possèdent qu'une activité glycosylasique et qui vont générer un site AP.
- Les glycosylases dites bifonctionnelles qui possèdent en plus de leur activité glycosylasique, une activité β -lyase ou β , δ -lyase qui permet d'inciser l'ADN après la formation du site AP pour former une cassure simple brin (CSB).

En général, toutes les glycosylases qui enlèvent la base U sont monofonctionnelles et la plupart des glycosylases qui sont spécialisées dans la reconnaissance des bases oxydées sont bifonctionnelles (NTHL1, NEIL).

Enzyme	Localisation	Type	Substrats théoriques
UNG2	Noyau	Monofonctionnelle	U, 5-FU, U:A, U:G
UNG1	Mitochondrie	Monofonctionnelle	U, 5-FU, U:A, U:G
SMUG1	Noyau	Monofonctionnelle	5-hmU, U:G, U:A, 5-FU, ϵ C
TDG	Noyau	Monofonctionnelle	U:G, T:G
MBD4 (MED1)	Noyau	Monofonctionnelle	U:G, T:G, 5-hmU
MPG (AAG)	Noyau	Monofonctionnelle	3meA, 7meG, 3meG, Hx, ϵ A
OGG1	Noyau	Mono & Bifonctionnelle (β)	8oxoG:C, Fapy:C
MUTYH	Noyau	Monofonctionnelle	8oxoG/C/G
NTHL1	Noyau	Bifonctionnelle (β)	Tg, FapyG, 5-hC, 5-hU
NEIL1	Noyau	Bifonctionnelle (β/δ)	Tg, FapyG, FapyA, 8oxoG, 5-hU, DHU, Sp, Gh
NEIL2	Noyau	Bifonctionnelle (β/δ)	Tg, FapyG, FapyA, 8oxoG, 5-hU, DHU, Sp, Gh
NEIL3	Noyau	Mono & Bifonctionnelle (β/δ)	FapyG, FapyA, Sp, Gh

U: Uracile; 5-FU: 5-Fluoro-Uracile; G: Guanine; A: Adénine; 5-hmU: 5-hydroxyméthyl-Uracile; ϵ C: EthénoCytosine; T: Thymine, 3meA: 3-méthyl-Adénine; 7meG: 7-méthyl-Guanine; 3meG: 3-méthyl-Guanine; Hx: HypoXanthine; ϵ A: EthénoAdénine; 8oxoG: 8oxoGuanine; Fapy: Formamidopyridine; Tg: Thymine Glycol; 5-hC: 5-hydroxyméthyl-Cytosine; 5-hU: 5-hydroxyméthyl-Uracile; DHU: DiHydroUracile; Sp: spiriminohydantoïne; Gh: Guanidinohydantoïne

Tableau 1 - ADN N-glycosylases chez les mammifères intervenant dans la voie BER (adaptée de Krokan and Bjoras, 2013)

3.1.2. Deuxième étape : Incision du brin d'ADN

Il existe deux mécanismes distincts pour cette étape d'incision de l'ADN : une effectuée par APE1 et l'autre effectuée par les glycosylases bifonctionnelles.

3.1.2.1. Par APE1

La protéine AP-Endonucléase 1 (APE1) appartient à une famille d'enzymes capable de reconnaître et de cliver les sites AP. Son activité est dépendante de Mg^{2+} , entraînant l'hydrolyse de la liaison phosphodiester en 5' du site AP. Cela conduit à la formation de deux extrémités : une extrémité 3'-OH en amont et une extrémité 5'désoxyribose phosphate (5'dRp) (Masuda et al., 1998). Chez les mammifères, il est estimé que 95% des sites AP sont pris en charge par cette enzyme (Dempsey and Harrison, 1994).

3.1.2.2. Par une glycosylase bifonctionnelle

Les glycosylases bifonctionnelles possèdent une activité AP lyase en plus de leur activité glycosylase permettant d'inciser l'ADN après la formation du site AP.

Parmi ce type de glycosylase, on distingue les glycosylases qui possèdent une activité β -élimination de celles qui possèdent une activité β , δ -élimination. Dans le premier cas, l'élimination β entraîne la formation d'une extrémité 5'P et une extrémité 3'aldéhyde insaturée α , β , 4-hydroxy-2-pentenal (ddR5p). Dans le second cas, cela conduit à une extrémité 5'P et une extrémité 3'P (Hegde et al., 2008).

Ces deux types d'élimination produisent des extrémités qui vont nécessiter un réarrangement avant de pouvoir continuer le processus de réparation (Jacobs and Schär, 2012; Svilar et al., 2011). Dans le cas de la β élimination, APE1 se charge d'éliminer l'extrémité ddR5p et dans le cas de la β , δ élimination, les extrémités 3'P et 5'P sont enlevées par une Poly Nucléotide Kinase (PNK) (Hegde et al., 2008; Svilar et al., 2011).

Ces actions permettent d'obtenir des extrémités 3'OH et 5'P qui pourront être reconnues et prises en charge par les polymérases pour les prochaines étapes de resynthèse et de ligature d'une nouvelle base non lésée selon deux sous-voies : la voie de resynthèse courte (short-patch) ou longue (long-patch).

3.1.3. Troisième et quatrième étape : Resynthèse de l'ADN & Ligature de l'ADN

3.1.3.1. La voie de resynthèse courte (short-patch)

Dans le cas de la short patch BER, un seul nucléotide va être remplacé. Généralement, cette sous voie est prédominante dans 80-90% de la voie BER. Elle nécessite des protéines qui ne sont pas impliquées dans la réplication et qui sont donc actives tout au long du cycle cellulaire.

L'extrémité 3'OH est comblée par une ADN polymérase β qui possède une activité dRpase intrinsèque qui va cliver le résidu dRP et insérer une nouvelle base complémentaire à celle se trouvant sur le brin opposé. L'étape de ligature est effectuée par la Ligase I ou III. La Ligase III est présente dans le noyau et les mitochondries de la cellule contrairement à la Ligase I qui est uniquement présente dans le noyau. Le rôle de la Ligase I dans cette sous-voie n'est pas encore totalement élucidé.

La Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1 (PARP1) et XRCC1 participent à cette sous-voie mais uniquement dans certains types de short patch (Hanssen-Bauer et al., 2011). XRCC1 est une protéine d'échafaudage qui s'associe à la polymérase afin de l'assembler avec la ligase et de stabiliser le complexe formé.

3.1.3.2. La voie de resynthèse longue (long-patch)

Dans le cas de la long patch BER, 2 à 10 nucléotides seront remplacés. Cette étape a lieu principalement dans les cellules en prolifération car elle utilise des protéines impliquées dans la réplication comme les ADN polymérases δ et ϵ , PCNA, FEN1 et l'ADN Ligase I (Svilar et al., 2011).

Cette sous-voie fait intervenir les ADN polymérases δ et ϵ pour la phase de resynthèse en coopération avec le facteur RFC (Replication Factor C) et le facteur de processivité PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Hoeijmakers, 2001). Cependant, l'incorporation du deuxième nucléotide ne dépendrait pas du statut de la cellule et utiliserait l'ADN polymérase β dans les cellules quiescentes. Dans le cas de cellules en prolifération, cette voie utiliserait préférentiellement les ADN polymérases δ et ϵ (Akbari et al., 2009). Ces polymérases n'ayant pas d'activité dRpase, les nucléotides qu'elles polymérisent provoquent une zone de recouvrement où l'ancien brin d'ADN n'est plus hybridé à son complémentaire nécessitant l'intervention de Flap endonucléase 1 (FEN1) qui possède cette activité. La ligation a ensuite lieu par l'ADN Ligase I en interaction avec PCNA.

Le choix de la sous-voie dépendrait également d'autres facteurs comme la spécificité de la glycosylase, le type cellulaire, le type de lésion, la disponibilité en ATP ainsi que des facteurs BER disponibles (Fortini et al., 1999; Narciso et al., 2007; Petermann, 2003).

De plus, PARP1 a un rôle dans la détection et le recrutement des protéines de réparation de cette voie (Gibson and Kraus, 2012). Cependant, son rôle dans la signalisation et le recrutement des protéines de la voie BER n'est pas totalement élucidé. Nous verrons plus en détail le rôle de cette protéine dans la Partie 4.

Dans le cas des cassures simple brin, l'intervention des glycosylases n'est pas nécessaire. Ce sont les protéines XRCC1 et PARP1 qui ont pour rôle de détecter la cassure (Hegde et al., 2008). Ces protéines serviraient ensuite de socle pour le recrutement des autres protéines impliquées dans la voie BER (Figure 15).

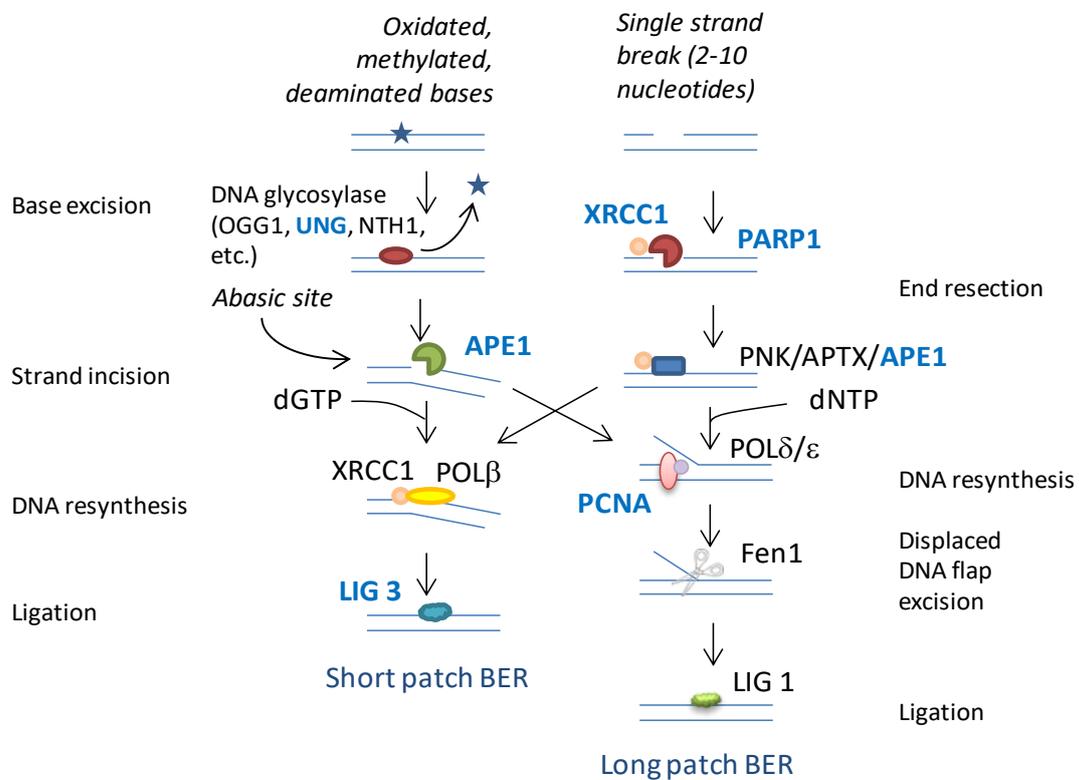


Figure 15 - Schéma de la voie de réparation BER (Biola-Clier et al., 2017)

3.2. La réparation par excision de nucléotides (NER)

La réparation par excision de nucléotide (Nucleotide Excision Repair : NER) concerne des lésions qui vont entraîner une modification de la structure de la double hélice de l'ADN. Les lésions concernées sont donc des adduits volumineux comme les adduits du BPDE, des lésions produites par certains agents anti-cancéreux ou encore les dommages photo-induits (CPD et 6-4PP). Elle représente la voie de

réparation la plus polyvalente en termes de reconnaissance des dommages. Elle est active dans le noyau des cellules et il n'y a, à ce jour, pas d'évidence de son activité dans les mitochondries (Alexeyev et al., 2013; Bauer et al., 2015). Contrairement à la voie BER, elle va conduire au remplacement d'une plus grande partie de l'ADN entre 24 et 32 nucléotides.

Comme la voie BER, elle est également divisée en deux sous-voies : la réparation globale du génome (Global Genome NER: GG-NER) et la réparation couplée à la transcription (Transcription-coupled NER: TC-NER) (Mellon et al., 1986). Ces deux voies ne diffèrent que par la première étape de reconnaissance du dommage (Kamileri et al., 2012).

3.2.1. Première étape : Reconnaissance du dommage

La première étape de reconnaissance du dommage peut se faire directement par la protéine XPC ou bien lors d'un blocage de l'ARN polymérase lors de la transcription de l'ADN.

3.2.1.1. GG-NER

La protéine XPC liée à hHR23B (ou hRAD23B) et CETN2 détecte la déformation de la structure de l'ADN qui a été engendrée par la lésion et forme un complexe. Certaines lésions comme les CPD qui ne déstabilisent pas significativement la double hélice de l'ADN sont d'abord reconnues par XPE (ou DDB2) formant un complexe avec DDB1. Ce complexe permet ainsi de créer une déformation plus importante qui va permettre à XPC de reconnaître la zone lésée (Spivak, 2015). Il a été démontré que XPC se lie au brin opposé de la lésion expliquant ainsi sa capacité universelle à reconnaître divers types de lésions (Lee et al., 2014). Le complexe XPC/hHR23B/CETN2 permet ensuite le recrutement du complexe TFIIH dont nous détaillerons la suite du mécanisme ensuite.

3.2.1.2. TC-NER

Cette sous-voie n'est pas aussi bien comprise d'un point de vue mécanistique que la sous-voie GG-NER. Elle est initiée par le blocage de l'ARN polymérase II sur le site endommagé lors de l'étape de transcription des gènes. Cela va entraîner le recrutement de CSB qui est un facteur d'élongation de la transcription qui va se fixer sur l'ARN polymérase. CSB va modifier la conformation de l'ADN en entourant l'ADN autour d'elle-même de manière ATP dépendante (Beerens et al., 2005). Elle va ensuite recruter la protéine CSA qui est nécessaire pour le recrutement de trois autres protéines XAB2 (XPA

binding protein 2), le facteur de remodelage du nucléosome HMGN1 et le facteur de transcription TFIIIS (Spivak, 2015). Ces trois protéines sont recrutées au niveau de l'ARN polymérase. Plus récemment, la protéine UVSSA et son partenaire USP7 ont été identifiés pour prévenir la dégradation de CSB. En effet, USP7 déubiquitine CSB pour permettre sa stabilisation (Schwertman et al., 2012).

3.2.2. Les trois dernières étapes communes de la voie NER

Une fois que l'étape de reconnaissance a eu lieu via la GG-NER ou la TC-NER, le facteur TFIIH est recruté. Ce complexe multi protéique est constitué de dix sous-unités et est également impliqué dans l'initiation de la transcription (Compe and Egly, 2012). Grâce aux activités ATPase et hélicase de ces 2 sous-unités XPB et XPD, le complexe TFIIH va ouvrir la double hélice au niveau de la lésion. Le complexe XPA est ensuite recruté catalysant la sous-unité CAK de TFIIH qui ne rejoindra le complexe qu'une fois que la lésion aura été réparée. XPA joue aussi un rôle essentiel dans l'assemblage correct des facteurs de la NER vraisemblablement en maintenant la structure de l'ADN ouverte. Puis, la protéine de réplication A (RPA) et l'endonucléase XPG rejoignent le site endommagé formant ainsi le complexe de pré-incision. L'arrivée de XPG entraîne le départ du complexe de reconnaissance. RPA va protéger l'ADN simple brin des attaques par les endonucléases et assure le positionnement correct de part et d'autre de la lésion de l'endonucléase XPG puis de l'endonucléase XPF/ERCC1. RPA joue également un rôle dans l'arrivée de la machinerie de resynthèse du fragment excisé. Après incision du fragment d'ADN contenant le dommage par les endonucléases XPG en 3' et XPF/ERCC1 en 5', TFIIH et XPA sont relargués. L'étape de resynthèse peut alors débuter avec le recrutement de la machinerie de réplication. Suite à la coupure réalisée par XPF/ERCC1, XPG recrute les facteurs de resynthèse PCNA et RFC. RPA va ensuite induire un réarrangement de tous ces facteurs qui provoquent d'abord le relargage de XPF/ERCC1. Les facteurs RPA, XPG, RFC et PCNA forment alors une assise structurale permettant le recrutement d'une ADN polymérase δ , κ , ϵ et le début de la phase de resynthèse du mécanisme de réparation. Le choix de la polymérase dépend du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule au moment de la réparation du dommage. En effet, la polymérase ϵ intervient dans les cellules en division alors que les polymérases δ et κ sont les principales polymérases utilisées chez les cellules quiescentes (Ogi et al., 2010). Dès lors, RPA et XPG sont alors relargués. L'ADN polymérase continue de combler la brèche en y synthétisant le fragment manquant. Chaque nucléotide inséré suivra la règle de complémentarité des bases. Enfin, une ligase procède à la dernière étape de la réaction c'est-à-dire à la ligation du brin néosynthétisé. Le choix de la Ligase dépend une nouvelle fois du statut de la cellule. En effet, il y aura intervention du complexe Ligase I/FEN1 dans les cellules en division alors que le complexe Ligase III/XRCC1 opère chez les cellules quiescentes (Moser et al., 2007).

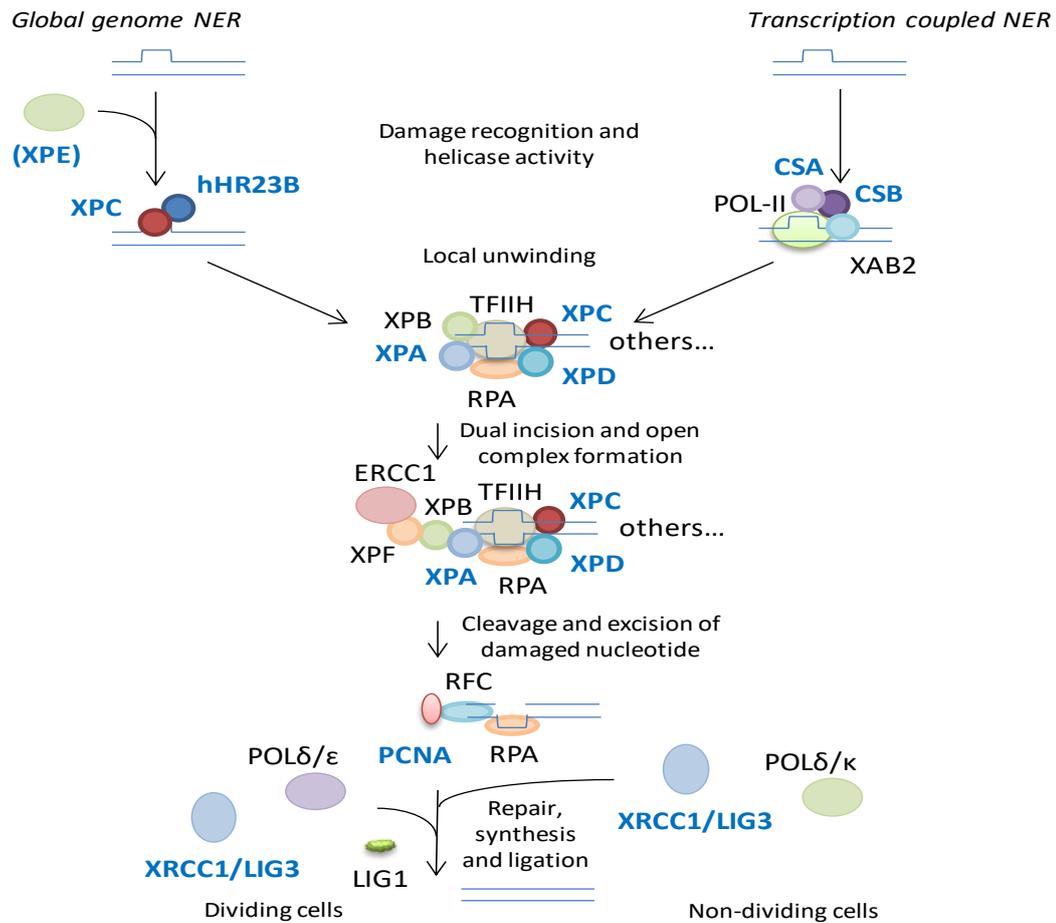


Figure 16 - Schéma de la voie de réparation NER (Biola-Clier et al., 2017)

3.3. La réparation directe (DR)

La réparation directe (Direct Reversal : DR) entraîne une réversion de la lésion et ne concerne que certaines lésions (bases alkylées et photoproduits). Cette voie ne nécessite pas d'étape d'excision de l'ADN. Contrairement aux autres voies qui utilisent des ADN polymérases pouvant entraîner des aberrations dans l'insertion des nouvelles bases, cette voie n'utilise pas de polymérases et n'est donc pas source d'erreur. Elle ne nécessite l'action que d'une seule protéine qui va basculer la base endommagée à l'extérieur des brins de l'ADN puis la réparer.

Chez l'Homme, il existe deux familles d'enzymes qui sont impliquées dans cette voie : les enzymes O₆-alkylguanine-DNA alkyltransférases (AGT ou MGMT) qui prennent en charge les lésions O-alkylés (O₆-méthyl-guanine, O₄-méthyl-thymine ...) et la famille des dioxygénases ALKBH qui répare les adduits de

bases N-alkylées (1-méthyladenine, 3-méthylcytosine, ...) (Nay and O'Connor, 2013; Yi and He, 2013). Plus récemment, il a également été montré que les protéines ALKBH sont capables de réparer les lésions Ethénobases (ϵ A et ϵ C) avec une vitesse de réparation plus rapide pour ϵ A que ϵ C (Delaney et al., 2005; Mishina et al., 2005) (Figure 17). Il existe également des photolyases qui utilisent l'énergie lumineuse pour permettre la réparation des lésions induites par les UV (CPD et 6-4PP) mais elles ne sont pas présentes chez l'Homme.

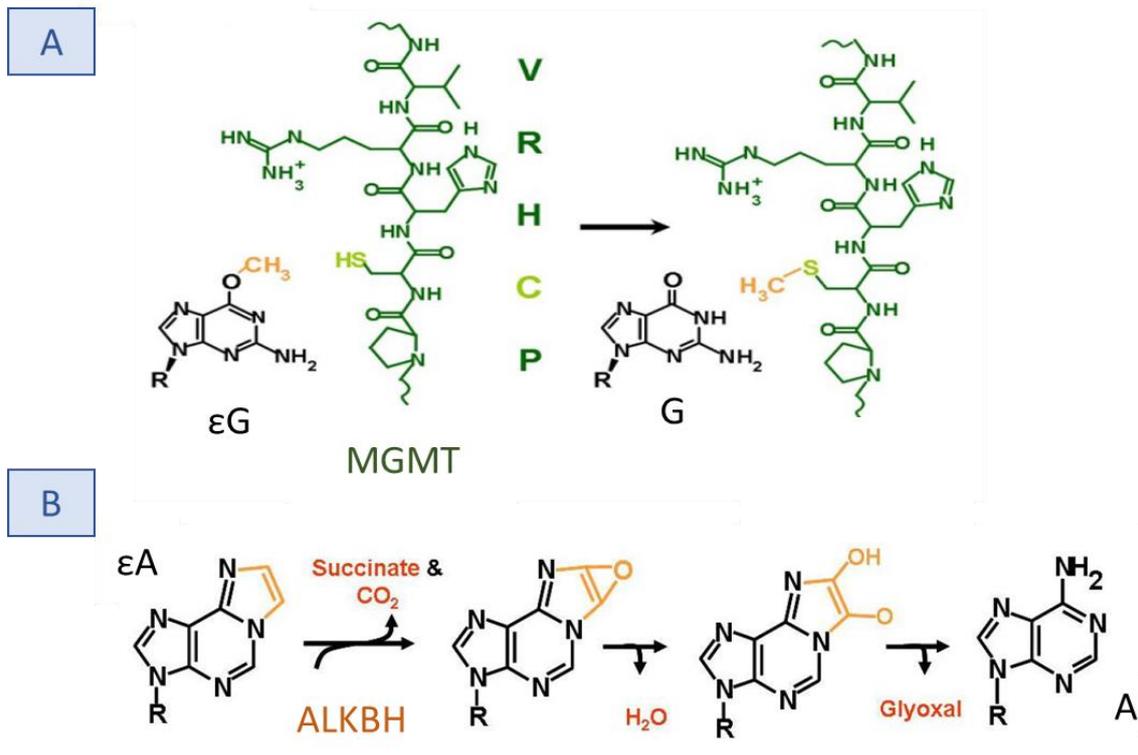


Figure 17 - Schéma de la réparation directe : A) Lésion ϵ G par l'enzyme MGMT B) ϵ A par l'enzyme ALKBH (adaptée de Nay and O'Connor, 2013)

3.4. La réparation des mésappariements (MMR)

La voie de réparation des mésappariements (Mismatch Repair : MMR) représente un système de défense contre les erreurs liées à la réplication. Comme son nom l'indique, elle concerne la réparation des mésappariements de bases c'est-à-dire lorsque la règle de complémentarité des bases (A-T ou C-G) n'est pas respectée. Dans ce cas-ci, cette voie ne traite donc pas la réparation de lésions mais un défaut de complémentarité qui induit toutefois un défaut structural au niveau de l'ADN. Elle peut également avoir comme substrats des boucles d'insertion/suppression (insertion-deletion loops : IDLs) de

nucléotides (Jiricny, 2006). Cette voie de réparation a lieu au cours de la phase S du cycle cellulaire. Cependant, certaines études ont montré qu'elle pouvait avoir lieu en dehors de cette phase (Bak et al., 2014).

Chez l'Homme, le complexe MutS α (MSH2/MSH6) reconnaît les sites de mésappariements et les IDLs d'un à deux nucléotides. Le complexe MutS β (MSH2/MSH3) lui reconnaît les IDLs d'une plus grande taille allant jusqu'à 16 nucléotides (Kunkel and Erie, 2005). Le complexe MutS se transloque ensuite le long de l'ADN de manière ATP-dépendante pour laisser la place au complexe MutL α (MLH1/PMS2) (Jiricny, 2013). Le complexe MutS-MutL a pour rôle de discerner le brin matrice du brin nouvellement synthétisé afin que l'exonucléase EXO1 puisse dégrader la partie du brin nouvellement synthétisé à remplacer. Cette étape de digestion par EXO1 est dépendante des protéines RFC et PCNA. La protéine RPA vient ensuite stabiliser le « trou » formé par EXO1 (Genschel and Modrich, 2003). L'étape de resynthèse est effectuée par la polymérase δ mais implique également la présence d'autres protéines comme RFC et HMBG1. La dernière étape de ligature est réalisée par la Ligase I (Genschel and Modrich, 2003; Longley et al., 1997).

Plusieurs études récentes montrent que les gènes impliqués dans la MMR seraient réprimés en réponse à un stress environnemental comme l'hypoxie, l'inflammation ou les HAPs (Chen et al., 2013; Edwards et al., 2009; Mihaylova et al., 2003).

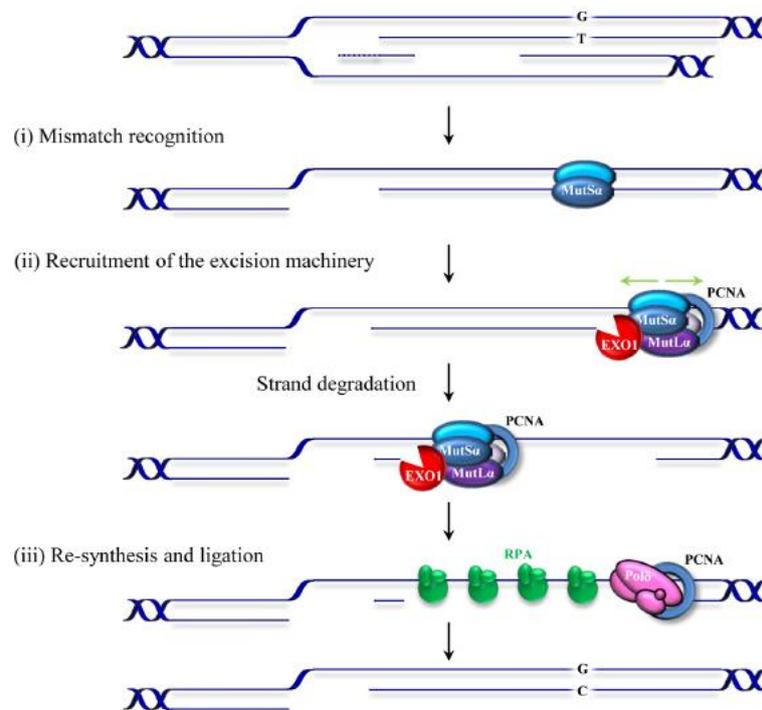


Figure 18 - Schéma de la voie MMR (Bak et al., 2014)

3.5. La réparation des cassures double brin

Les cassures double brin (CDBs) de l'ADN (Double Strand Break : DSB) sont les dommages les plus toxiques pour la cellule. Les CDBs peuvent provenir de processus endogènes comme le stress oxydatif, la méiose et la recombinaison V(D)J ; ou de facteurs exogènes comme les radiations ionisantes ou les agents génotoxiques.

Chez les mammifères, les CDBs peuvent être pris en charge par deux mécanismes distincts : la recombinaison homologue (Homologous Recombination : HR) qui nécessite des homologies de séquences et la jonction d'extrémité non homologue (Non-Homologous End Joining : NHEJ) qui ne nécessite pas de brin homologue.

Il existe une étroite compétition et collaboration entre ces deux mécanismes. A l'heure actuelle, la NHEJ est considérée comme le mécanisme de réparation prépondérant car il intervient rapidement et tout au long du cycle cellulaire alors que la HR n'intervient qu'en phase S et G2 du cycle cellulaire et possède une cinétique de réparation plus lente que la NHEJ.

Nous allons maintenant détailler ces deux mécanismes et voir les différents acteurs qui interviennent dans la prise en charge et la réparation de ces lésions.

3.5.1. La recombinaison homologue (HR)

La HR permet un échange de matériel génétique entre deux chromosomes homologues.

Cette voie de réparation est divisée en trois phases :

- La phase pré-synaptique qui correspond à la reconnaissance des CDBs
- La phase synaptique qui recherche l'homologie et permet l'invasion du brin homologue (formation du D-loop)
- La phase post-synaptique qui permet la résolution (coupure) de la structure permettant l'échange de brins entre deux brins est appelée « jonction de Holliday »

Ces trois phases font intervenir différents acteurs protéiques.

La première étape de la HR est initiée par une résection d'ADN simple brin pris en charge par le complexe MRN (composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1) et l'endonucléase CtIP qui joue un rôle essentiel dans l'activation de MRN et l'initiation de la résection. Cette étape de résection est favorisée en phase S du cycle cellulaire. La deuxième étape fait intervenir des hélicases (comme BLM) et des

nucléases dont EXO1 (appartenant à la famille des nucléases XPG) afin d'agrandir la taille de la résection (Bolderson et al., 2010). La protéine RPA vient ensuite recouvrir la zone de résection pour protéger le fragment d'ADN simple brin et s'assurer que la résection s'effectue dans la bonne direction. La protéine Rad51 intervient pour démarrer la HR en provoquant l'invasion de brin (Krejci et al., 2012). Plusieurs protéines comme BRCA2, Rad54 et Rad52 opèrent alors pour guider Rad51 devant une séquence homologue du chromatide sœur. Les extrémités 3' sont allongées par des DNA polymérases formant ainsi la « jonction de Holliday ». La dernière étape est effectuée par des hélicases et des enzymes appelées « résolvases » ainsi que par l'ADN Ligase 1. La conversion génétique est associée ou non à un crossing-over selon le sens de la coupure qui est effectué par les « résolvases » (Jasin and Rothstein, 2013; Mladenov et al., 2016).

Il est important de préciser que la protéine BRCA1 favoriserait l'initiation de la résection afin d'éliminer 53BP1 qui viendrait se fixer aux extrémités des CDBs (Bunting et al., 2010; Cao et al., 2009).

La HR assure une réparation très fidèle puisque le brin lésé recopie une séquence homologue. De plus, la réparation des CDBs n'entraînent principalement pas de crossing-over ce qui confirme le caractère conservateur de cette voie.

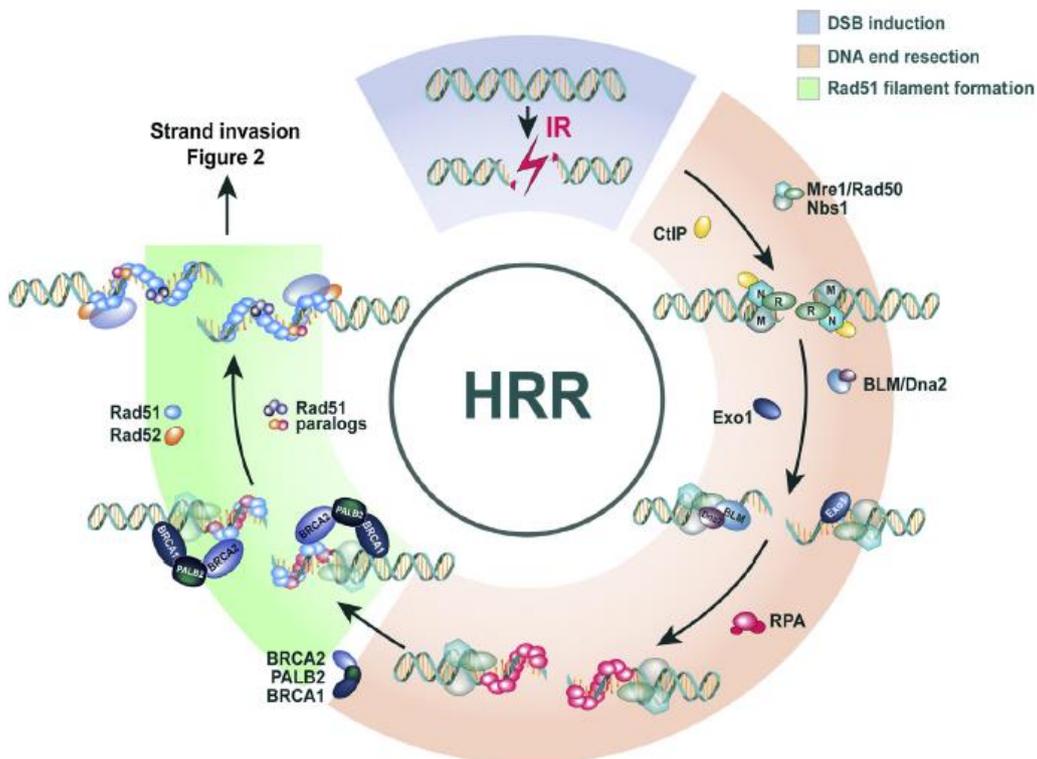


Figure 19 - Schéma de la voie HR (Mladenov et al., 2016)

3.5.2. La voie NHEJ

On distingue deux voies dans le mécanisme de réparation par NHEJ : la voie « classique » appelée jonction d'extrémités non homologues canonique (c-NHEJ) qui dépend de DNA-PK [ou encore appelée D-NHEJ] et une voie alternative appelée jonction d'extrémités non homologues alternative (a-NHEJ) [ou encore appelée B-NHEJ (back-up NHEJ) ou MMEJ (Microhomology Mediated End-Joining)].

3.5.2.1. La voie c-NHEJ

Comme cette voie est active tout au long du cycle cellulaire, elle représente la voie de réparation des CDBs par défaut.

Dorénavant, elle est admise comme étant conservatrice et fidèle. Cependant, c'est une voie qui peut s'adapter et donc ligaturer des extrémités d'ADN qui ne sont pas parfaitement complémentaires tout en limitant l'instabilité génétique. La fidélité de la réparation dépend donc des extrémités double brin de l'ADN et ce n'est donc pas le mécanisme en lui-même qui est infidèle.

Ce mécanisme de réparation débute par une reconnaissance et une protection des extrémités par l'hétérodimère Ku70/80. Il possède une très grande affinité avec l'ADN et est très abondant dans le noyau des cellules (Downs and Jackson, 2004). L'interaction entre l'ADN et Ku permet ensuite le recrutement de DNA-PK. Son rôle est fondamental puisqu'elle permet de réguler la c-NHEJ et d'activer via une phosphorylation un ensemble de protéines impliquées dans la c-NHEJ ainsi que dans la réponse au dommage de l'ADN (DDR) que nous détaillerons plus tard. L'activation de la kinase DNA-PK permet ainsi le recrutement de XRCC4 (venant stabiliser la Ligase IV) et de l'ADN Ligase IV aidé par les protéines XLF/Cernunnos. Ces protéines vont stimuler la ligature. Il a été démontré récemment *in vitro* que la protéine PAXX pourrait stabiliser DNA-PK et serait un nouvel acteur de la voie c-NHEJ (Ochi et al., 2015). Il peut également y avoir l'intervention de polymérases (μ , λ et TdT) et Artémis si cela est nécessaire pour préparer les extrémités si elles ne sont pas compatibles avant la ligature (Mladenov et al., 2016; Rass et al., 2012).

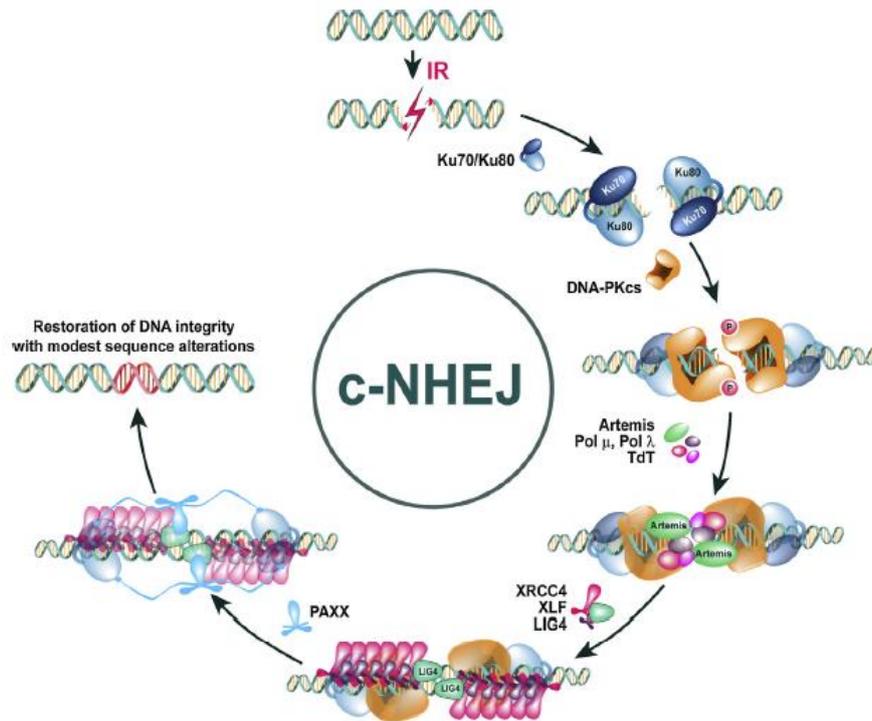


Figure 20 - Schéma des différentes étapes de la c-NHEJ (Mladenov et al., 2016)

3.5.2.2. La voie a-NHEJ

Cette voie a été découverte en réprimant des gènes fonctionnels de la voie classique (mutant Ku⁻ par exemple) ce qui entraîna son appellation « alternative ». Elle est également communément appelée back-up NHEJ car on pensait qu'elle n'était active uniquement lorsque la c-NHEJ était déficiente, or il a été démontré que cette voie est active quel que soit le fonctionnement de la c-NHEJ.

La voie a-NHEJ nécessite de petites homologies de séquences (< 20 nt) distantes de la lésion entraînant des délétions ou insertions d'une partie de l'ADN ce qui lui confère un caractère mutagène. De ce fait, on attribuait auparavant l'infidélité à la voie c-NHEJ qui est en fait dû à la découverte plus tardive de cette nouvelle voie.

Cette voie a également lieu tout au long du cycle cellulaire. Cependant, elle serait plus active en phase G2 qu'en G1 dû à une activité de résection réduite en phase G1 (Huertas, 2010).

La voie a-NHEJ n'est pas encore totalement élucidée mais certains acteurs ont pu être identifiés.

PARP1 est la première protéine impliquée dans le processus de réparation de cette voie. Certaines expériences *in vitro* ont également mis en évidence l'implication de l'Histone H1 qui favoriserait l'activité de PARP1 (Rosidi et al., 2008).

La voie a-NHEJ inclut ensuite une étape d'initiation de la résection impliquant le complexe MRN et CtIP commune à la HR détaillé précédemment. La résection s'effectue par des nucléases ou hélicases. L'hybridation des microhomologies permet l'alignement des CDBs et facilite ensuite l'étape de ligature par le complexe XRCC1/ADN Ligase III mais également la Ligase I (Audebert et al., 2004; Paul et al., 2013; Wang, 2005).

Récemment la polymérase θ a été identifiée et a pour rôle de combler les « trous » dans l'ADN (Ceccaldi et al., 2015; Wood and Doublé, 2016).

Il est important de noter que les protéines impliquées dans la a-NHEJ sont également nécessaires dans d'autres voies de réparation de l'ADN. Par exemple, PARP1, XRCC1 et l'ADN Ligase III sont 3 protéines qui opèrent dans la voie BER (Figure 21).

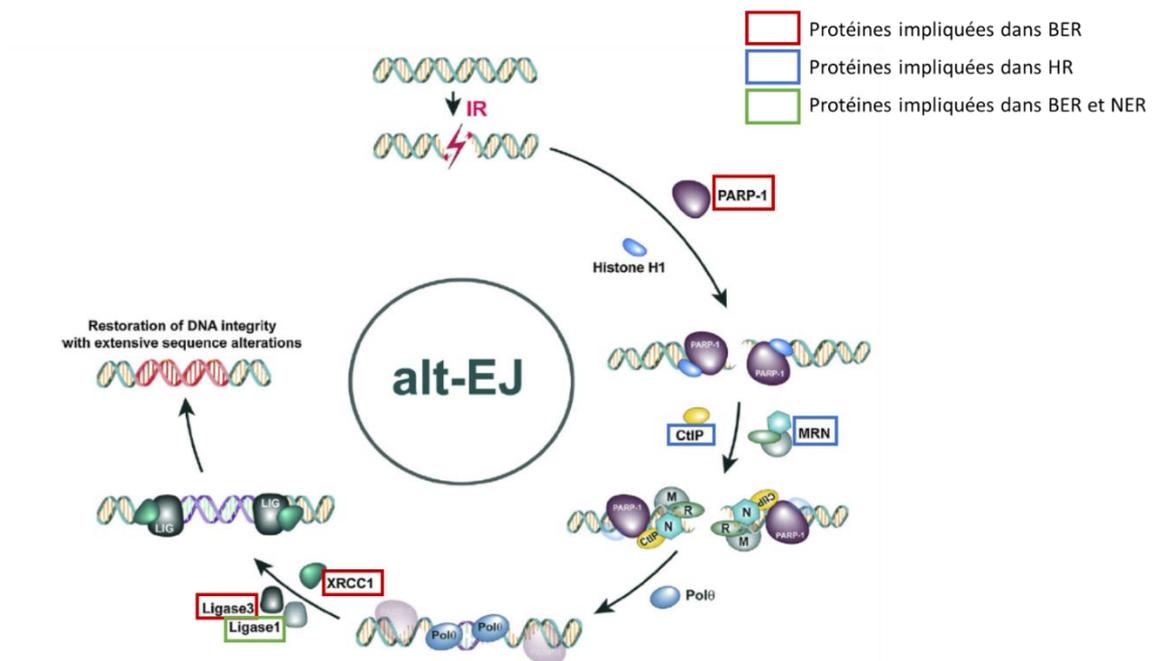


Figure 21 - Schéma des différentes étapes de la a-NHEJ (adaptée de Mladenov et al., 2016)

3.6. La réparation des pontages inter-brins (ICLR)

La voie des pontages inter-brins (Interstrand Cross Link Repair : ICLR) concerne les lésions où deux bases sont liées de manière covalente suite à l'action d'agents pontants de l'ADN. Parmi ces agents qui possèdent deux sites réactifs électrophiles, on peut citer certains agents anticancéreux comme le cisplatine, le psoralène, les moutardes azotées ou Mitomycine C (MMC) (Clauson et al., 2013). Ce système de réparation est également nommé Fanconi anemia (FA) qui fait référence à une maladie

génétique rare entraînant divers syndromes dont une prédisposition à l'apparition de cancers causée par la mutation de gènes FA.

La formation de ces lésions bloque des mécanismes cellulaires essentiels comme la réplication ou la transcription. Le trait de caractère unique à cette voie est que l'incision doit avoir lieu sur les deux brins de l'ADN contrairement aux autres voies où un seul brin est incisé.

Plusieurs mécanismes existent pour cette voie de réparation selon le cycle cellulaire. Cette voie de réparation a lieu principalement au cours de la phase S du cycle cellulaire lorsqu'une fourche de réplication est bloquée par un pontage inter-brin. Cependant, elle peut également avoir lieu en dehors de la phase S mais le mécanisme n'a pas encore été élucidé.

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, FANCM est mobilisé au site endommagé avec FAAP24 et MHF. FANCM procède au remodelage de la fourche de réplication entraînant le recrutement de RPA. RPA est nécessaire pour l'activation ATR qui va phosphoryler plusieurs cibles comme le complexe MRM associé à CtIP, FANCD2, et FANCI. Le complexe principal FA peut alors s'assembler et est constitué de plusieurs protéines FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, et FANCM, FAAP20, FAAP24 et FAAP100. L'assemblage de FA stimule la sous-unité FANCL de ce complexe pour procéder à la mono-ubiquitination de FANCD2 et FANCI qui forme le complexe ID. Ce nouveau complexe est ensuite recruté à la chromatine, condition nécessaire à une réparation efficace des dommages à l'ADN au cours de la phase S (Mi and Kupfer, 2005). La formation de ce complexe marque l'activation majeure de la voie ICLR (Wang, 2008). L'excision de l'ADN est ensuite coordonnée par un ensemble d'endonucléases qui s'associent à d'autres protéines FANC pour former le troisième complexe de cette voie constitué de MUS81-EME1, ERCC1-XPF, FAN1, SLX4-SLX1 et SNM1A/SNM1B d'une manière qui reste encore peu claire (Clauson et al., 2013). La suite de cette voie de réparation dépend du cycle cellulaire que nous ne détaillerons pas ici.

Cette voie de réparation est complexe puisqu'elle fait intervenir des protéines d'autres voies de réparation comme la NER, la NHEJ et la HR (Ceccaldi et al., 2016; Kottemann and Smogorzewska, 2013). Par exemple, on retrouve la protéine CtIP et le complexe MRN des voies de réparation HR et a-NHEJ. De plus, il y a également des coopérations entre ces systèmes de réparation. Il semblerait que le complexe FANCD2 inhiberait la NHEJ via une interaction avec les protéines Ku (Ceccaldi et al., 2016).

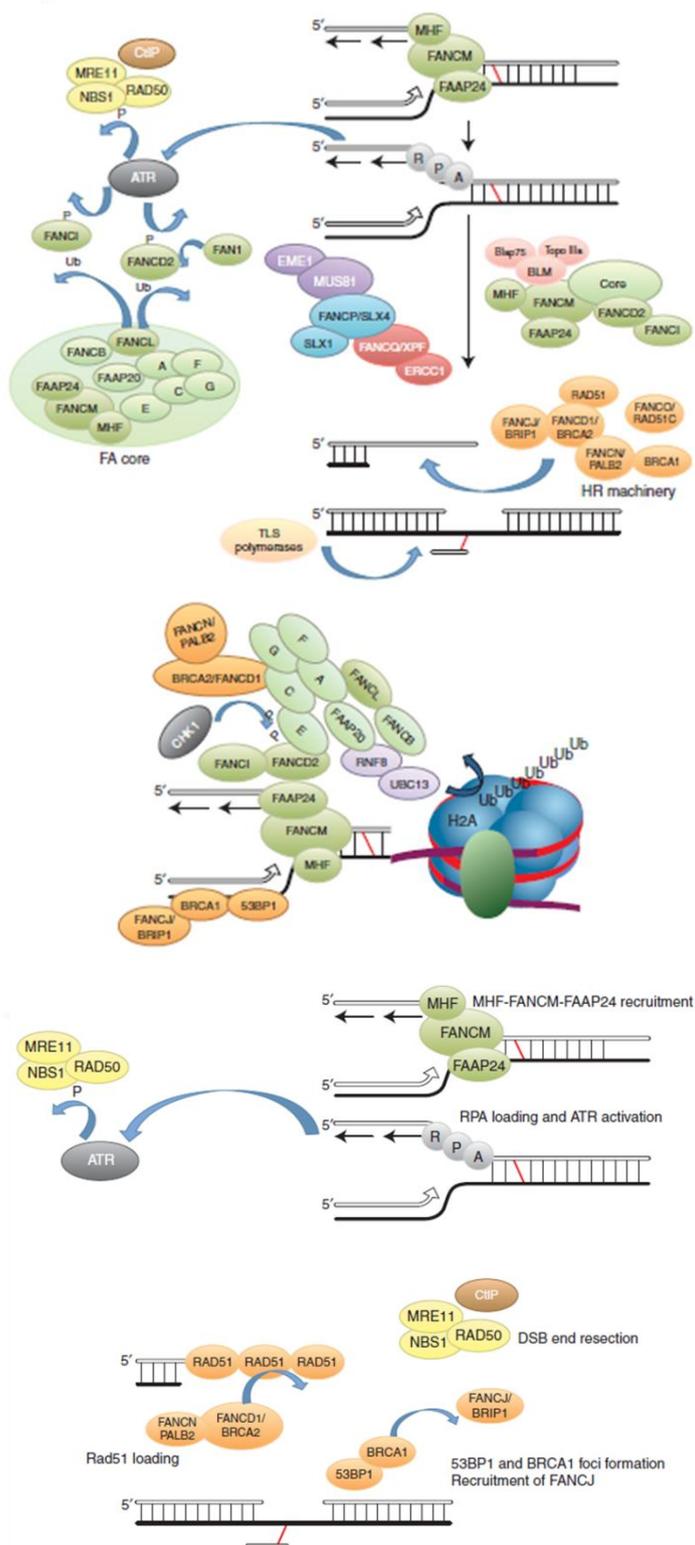


Figure 22 - Schéma de la voie ICLR (Clauson et al., 2013). La reconnaissance du dommage débute avec le recrutement de FANCM, FAAP24 et MHF. Le remodelage de la fourche de réplication par FANCM conduit au recrutement de RPA, nécessaire à l'activation de la voie ATR. ATR va ensuite phosphoryler plusieurs protéines dont le complexe MRM. Le complexe principal FA peut alors s'assembler et stimuler FANCL pour conduire à la mono ubiquitination de FANCD2 et FANCI. Plusieurs endonucléases spécifiques sont alors recrutées au niveau du site endommagé. Le complexe principal et FANCD2/FANCI sont alors mobilisés au niveau de la chromatine, condition nécessaire à une réparation efficace des dommages au cours de la phase S.

3.7. Les maladies liées à la réparation de l'ADN

Des défauts dans certains gènes impliqués dans les voies de réparation que nous venons de décrire peuvent conduire à des maladies génétiques de différents types (neurodégénérative, immunitaire, ...). Parmi ces maladies, on peut notamment citer *xeroderma pigmentosum* (XP) qui est dû à un défaut dans le mécanisme de réparation NER. Les enfants atteints sont hypersensibles à la lumière solaire, en raison de l'incapacité de leurs cellules à réparer les photoproduits. On les appelle parfois les « enfants de la lune ». Le tableau ci-dessous récapitule les principales maladies impliquées dans des défauts de ces voies de réparation :

Maladies	Gènes mutés	Voie de réparation impliquée
Syndrome de Cockayne (CS)	CSA, CSB, XPB, XPD, XPG	TC-NER
Trichothiodystrophie (TTD)	XPB, XPD, TTDA	TC-NER
xeroderma pigmentosum (XP)	XPA-G, POLH	NER
Anémie de Fanconi (FA)	FANCA-C, FANCD1, D2, FANCE-G, FANCI, J, L-N	ICLR, HR
Syndrome de Werner (WS)	WRN	HR, BER
Syndrome de Bloom (BS)	BLM	HR
Ataxie télangiectasie (A-T)	ATM	Voies des CDBs
Maladie de Huntington	HD	MMR

Tableau 2 - Principales maladies impliquant des défauts dans les voies de réparation (adaptée de Ciccia and Elledge, 2010; Hoeijmakers, 2009; Jeppesen et al., 2011)

Parmi les maladies que nous venons de citer, certaines sont également responsables d'une prédisposition importante au développement de cancers. Par exemple, les personnes atteintes de la maladie XP sont particulièrement prédisposées aux cancers cutanés. Leur risque de développer un mélanome est 2 000 fois supérieur à celle d'un individu sain et cette prédisposition se manifeste précocement en moyenne vers l'âge de 8 ans (Lehmann, 2003).

Des défauts dans les voies de réparation peuvent conduire au développement de cancers (Hoeijmakers, 2001). Des polymorphismes dans le gène ERCC1, qui est impliqué dans la voie NER, sont associés à des cancers de la peau et du poumon (Andressoo et al., 2005). Un autre exemple concerne les personnes atteintes du syndrome de Lynch ou HNPCC (cancer colorectal héréditaire sans polypose) qui possèdent des mutations au niveau des gènes MSH2 et MLH1 impliquées dans la voie MMR. Ces personnes ont une probabilité comprise entre 35 et 50% de développer un cancer avant 70 ans (Dowty et al., 2013). Plus récemment, une méta-analyse a mis en évidence deux polymorphismes dans le gène MGMT, impliqué dans la voie DR, qui sont associés avec un risque accru de développer des cancers de l'œsophage et du poumon (Du et al., 2013).

4. La réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response ou DDR)

4.1. Organisation générale de la réponse aux dommages de l'ADN

Il était important d'introduire l'ensemble des systèmes de réparation de l'ADN que nous venons de voir puisque ces voies de réparation vont être régulées de manière fine par ce qu'on appelle communément la DDR (DNA Damage Response). Cette partie va donc s'intéresser au déclenchement des mécanismes de réparation à travers les différentes voies de signalisation qui existent pour initier et activer ces mécanismes.

Au cours de ces 20 dernières années, les avancées concernant la DDR ont été profondément bouleversées en termes de concept. En effet, plusieurs facteurs clés de ce mécanisme d'initiation, de signalisation et de transduction ont pu être identifiés (Harper and Elledge, 2007). Ceci notamment grâce à l'équipe de Stephen Elledge qui a d'ailleurs reçu cette année le « Breakthrough Prize in Life Sciences » pour ces recherches sur la détection des dommages à l'ADN et la manière dont l'information est relayée dans la cellule afin d'activer les systèmes de réparation et ainsi favoriser la survie cellulaire.

Ce mécanisme fut découvert chez la levure puis les récents travaux ont permis de montrer que ces voies de régulation sont très conservées chez les mammifères.

La DDR regroupe l'ensemble des mécanismes cellulaires qui vont permettre de signaler le dommage et d'activer les différentes voies de réparation de l'ADN (Zhou and Elledge, 2000). La DDR est très complexe puisqu'elle correspond à un réseau de plusieurs voies qui interagissent ensemble pour accomplir une réponse cellulaire. Le recrutement des facteurs impliqués dans la DDR est un processus régulé de manière spatiotemporelle où les facteurs sont assemblés au dommage de façon séquentielle et coordonnée. En effet, la DDR est constituée de plusieurs niveaux qui vont faire intervenir différentes protéines : les protéines dites « senseurs », les transducteurs, les médiateurs et les effecteurs (Figure 23). Il est important de noter que toutes les protéines de ces voies sont liées et la plupart interagissent entre elles.

La DDR peut être activée suite à la présence d'un dommage mais également suite au stress réplicatif correspondant à la situation qui engendre le ralentissement ou l'arrêt de la réplication (Gelot et al., 2015). De plus, la DDR a pour but d'activer les différentes voies de réparation de l'ADN mais elle peut également entraîner d'autres types de réponses variées au niveau cellulaire que nous détaillerons plus loin.

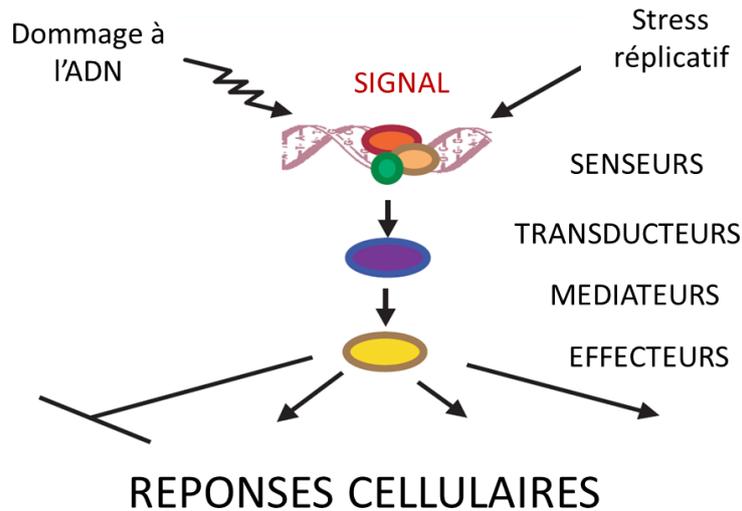


Figure 23 - La cascade de signalisation de la réponse aux dommages de l'ADN (adaptée de Zhou and Elledge, 2000)

4.2. Les Senseurs

Les senseurs correspondent aux protéines qui vont détecter les lésions de l'ADN et activer les différentes protéines impliquées dans la transduction du signal. Nous allons décrire ces senseurs en fonction des protéines qu'ils vont activer : ATM, DNA-PK ou ATR. Ces protéines sont centrales dans la DDR et ont conduit à donner leur nom aux trois voies. Nous parlerons donc de voie ATM, ATR ou DNA-PK qui correspond à la cascade d'évènements impliquant ces trois protéines. Nous détaillerons également les senseurs PARP1 et 2 qui peuvent activer ces trois protéines.

4.2.1. Activation de la voie ATM

La voie ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) est activée suite à la présence de CDBs (Paull, 2015). C'est le complexe MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) qui agit comme un senseur pour l'activation d'ATM et qui permet son recrutement aux sites endommagés via la protéine Nbs1 de MRN (Lee and Paull, 2005). Le mécanisme exact d'activation d'ATM par MRN n'est toujours pas connu. Néanmoins, la forme inactive d'ATM se présente sous la forme d'un dimère. Lorsqu'il est recruté aux sites endommagés, il va se dissocier (Bakkenist and Kastan, 2003). Deux autres protéines sont également impliquées dans l'activation d'ATM : Tip60 qui va acétyler un résidu Lysine d'ATM et la phosphatase PP5 dont les rôles exacts dans cette activation sont ignorés (Ali et al., 2004; Sun et al., 2005).

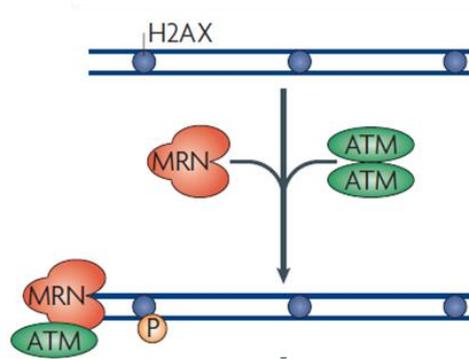


Figure 24 - Activation d'ATM (Cimprich and Cortez, 2008)

4.2.2. Activation de la voie DNA-PK

La voie DNA-PK est activée comme ATM suite à la présence de CDBs. Cependant, le senseur de cette voie est l'hétérodimère Ku70/80. Celui-ci va permettre le recrutement de DNA-PK. DNA-PK possède un double rôle : elle est impliquée dans la DDR et a également un rôle majeur dans l'activation de la voie c-NHEJ (Partie voie c-NHEJ).

4.2.3. Activation de la voie ATR

Contrairement aux voies ATM et DNA-PK, la voie ATR (Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related) est activée en réponse à une variété plus importante de types de lésions (adduits de l'ADN, pontages, CDBs de type cohésif) qui vont entraîner une CSB de l'ADN (Cimprich and Cortez, 2008) ou à la suite d'un stress répliatif (Byun, 2005). En effet, la formation d'une CSB a lieu lors des voies de réparation NER, long-patch BER et MMR. Son activation est un processus comportant de multiples étapes car l'interaction d'ATR avec l'ADN dépend de la protéine RPA (Zou and Elledge, 2003). RPA est fixée sur l'ADN simple brin et va entraîner le recrutement d'ATR via sa protéine régulatrice ATRIP. ATRIP interagit directement avec RPA permettant la formation d'un complexe ATR-ATRIP-RPA au niveau du site endommagé (Ball et al., 2005; Cortez, 2001). Le complexe interagit ensuite avec un second complexe 9-1-1 constitué de Rad9-Rad1 et Hus1. Le recrutement de ce dernier complexe 9-1-1 s'effectue via la protéine Rad17. La phosphorylation de la sous-unité Rad9 de 9-1-1 permet l'association de TopBP1 avec ATR entraînant alors son activation. TopBP1 possède un domaine qui permet la stimulation de l'activité kinase d'ATR par contact avec ATRIP et ATR. De plus, TopBP1 est également un substrat d'ATR (Partie Médiateurs et Effecteurs ci-après). En effet, ATR va phosphoryler un résidu Sérine de TopBP1 permettant une boucle d'amplification du signal induit par TopBP1 et donc l'activation d'ATR.

Plus récemment, une nouvelle protéine senseur ETAA1 a été identifiée et possède un domaine permettant également l'activation d'ATR comme TopBP1. Cette protéine est recrutée par interaction directe avec RPA contrairement à TopBP1 qui est mobilisée via Rad9 (Bass et al., 2016; Feng et al., 2016). L'hypothèse la plus probable est que TopBP1 et ETAA1 sont recrutées selon les différentes déformations de l'ADN engendrées par les dommages.

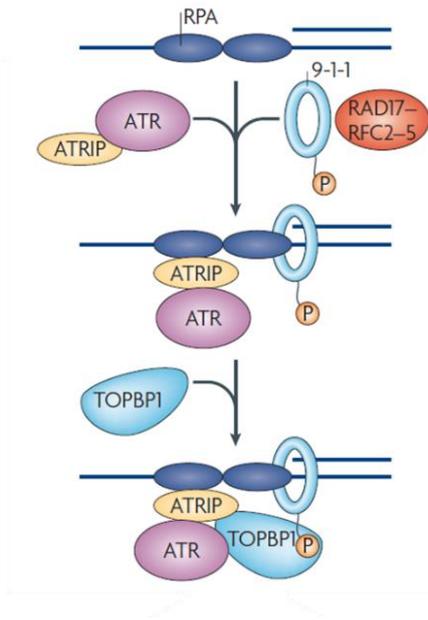


Figure 25 - Activation d'ATR (Cimprich and Cortez, 2008)

4.2.4. Activation par PARP1 et 2

Les trois voies d'activation (ATM, DNA-PK et ATR) que nous venons de décrire peuvent être également activées par la famille de protéine PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymérase). Cette famille de glycosyltransférase est constituée de 17 membres mais uniquement PARP1 et PARP2 sont impliquées dans la DDR (Schreiber et al., 2006). Elles sont activées par des CSBs ou des CDBs et catalysent l'addition de chaînes poly (ADP-ribose) par l'utilisation de NAD^+ sur les protéines afin de permettre le recrutement des transducteurs ATM, ATR et DNA-PK. PARP1 et 2 sont très efficaces dans la reconnaissance des « trous » dans l'ADN grâce à leurs deux doigts de zinc. Leur activation entraîne la synthèse des chaînes PARP (PARPylation) en quelques secondes sur des protéines cibles que sont l'histone H1 et H2B ainsi que elle-même (Schreiber et al., 2006). Cette action permet un relâchement de la chromatine pour

faciliter l'accès aux sites endommagés. La PARPylation des histones contribuerait au remodelage de la chromatine et au recrutement des protéines impliquées dans les voies de réparation.

4.3. Les Transducteurs

Les transducteurs sont les éléments centraux de la DDR puisqu'ils vont être responsables de la phosphorylation d'une multitude de protéines qui vont permettre leur activation ou leur inhibition et entraîner une réponse cellulaire.

La DDR est régulée par des PIKKs (phosphatidylinositol 3-kinase related kinase) qui appartiennent à la classe IV des PI3Ks (phosphatidylinositol 3-kinase like). Cette classe contient les protéines ATM, ATR, DNA-PK, SMG1 et mTOR. Ces kinases ont comme caractéristique biochimique de phosphoryler les résidus Sérine ou Thréonine suivi d'un résidu Glutamine (motifs S-T/Q) (Lovejoy and Cortez, 2009). Elles ont également la capacité de s'autophosphoryler. L'autophosphorylation de DNA-PK est essentielle pour son activité kinase ainsi que pour son implication dans la réparation des CDBs tandis que le rôle de l'autophosphorylation d'ATM et ATR est plus controversée (Blackford and Jackson, 2017).

Comme nous l'avons vu, elles sont recrutées aux sites endommagés par les protéines senseurs et vont être responsables de la phosphorylation de plusieurs centaines de protéines effectrices qui sont impliquées dans divers processus cellulaires que nous détaillerons dans la partie « réponses cellulaires ».

4.4. Les Médiateurs et les Effecteurs

4.4.1. Les modifications post-traductionnelles

Avant d'aborder les médiateurs et les effecteurs impliqués dans la DDR, il est important de noter que la cascade de signaux déclenchée par les transducteurs est régulée par diverses modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, on peut citer la phosphorylation, la SUMOylation, l'ubiquitination, la méthylation, la PARylation ou encore l'acétylation (Bergink and Jentsch, 2009; Liu et al., 2016; Polo and Jackson, 2011). Ces modifications sont réversibles permettant une régulation fine de la DDR ainsi que d'éviter la synthèse *de novo* de protéines. Elles ont pour rôle de favoriser le recrutement ou la dissociation des facteurs de la DDR ou encore de réguler le laps de temps que ces différentes protéines passeront au niveau du site endommagé.

L'importance de la phosphorylation et de la déphosphorylation est bien connue comme nous l'avons décrit précédemment avec les trois principaux transducteurs. Afin qu'il y ait une balance entre la

phosphorylation et la déphosphorylation, certaines phosphatases sont impliquées dans cette régulation de la DDR comme Wip1, PP2A, PP5 et PP1 (Liu et al., 2016).

Tout comme la phosphorylation, la SUMOylation et l'ubiquitination sont aussi dépendantes de l'ATP et impliquent trois types d'enzymes E1, E2 et E3 (ligase). Ces processus vont conduire à l'ajout d'une ou de plusieurs protéines d'ubiquitine (Ub) dans le cas de l'ubiquitination et l'ajout principalement d'une protéine SUMO dans le cas de la SUMOylation. L'ubiquitination est importante pour l'assemblage des protéines de la DDR. Ce mécanisme est connu pour entraîner la dégradation des protéines ubiquitinées vers le protéasome mais son implication dans la DDR a aussi pour rôle de servir de plate-forme d'accueil pour l'assemblage des protéines. Plusieurs E3 ligases s'accumulent sur les sites endommagés comme BRCA1, Mdm2, RNF8, RNF168 ou Rad18. La SUMOylation possède divers rôles dont celui d'influencer l'expression ou la stabilité de certaines protéines. Parmi les cibles de SUMOylation, on peut citer XRCC4, RPA, ATRIP, MDC1, FEN1 ou encore BRCA1. Par exemple, la SUMOylation de BRCA1 permet de favoriser son activité E3 ligase. De plus, il a été établi que l'accumulation de protéines SUMOylées sur les sites endommagés favorise les activités d'ubiquitination. Ces deux mécanismes d'ajout des protéines Ub et SUMO sont également contrebalancés par l'action d'enzymes de déubiquitination (USP) et protéases spécifiques qui sont impliquées dans la maturation de SUMO appelées SENPs (SENtrin-specific Proteases) (Liu et al., 2016).

La PARPylation est un des premiers événements dans la DDR puisqu'elle est effectuée par les protéines PARP1 et 2 que nous avons décrit précédemment. L'action des protéines PARP est rapidement contrée par l'action de glycohydrolase PARG. La PARPylation permet le recrutement de protéines impliquées dans la réparation que nous détaillerons ensuite et participe également au remodelage de la chromatine.

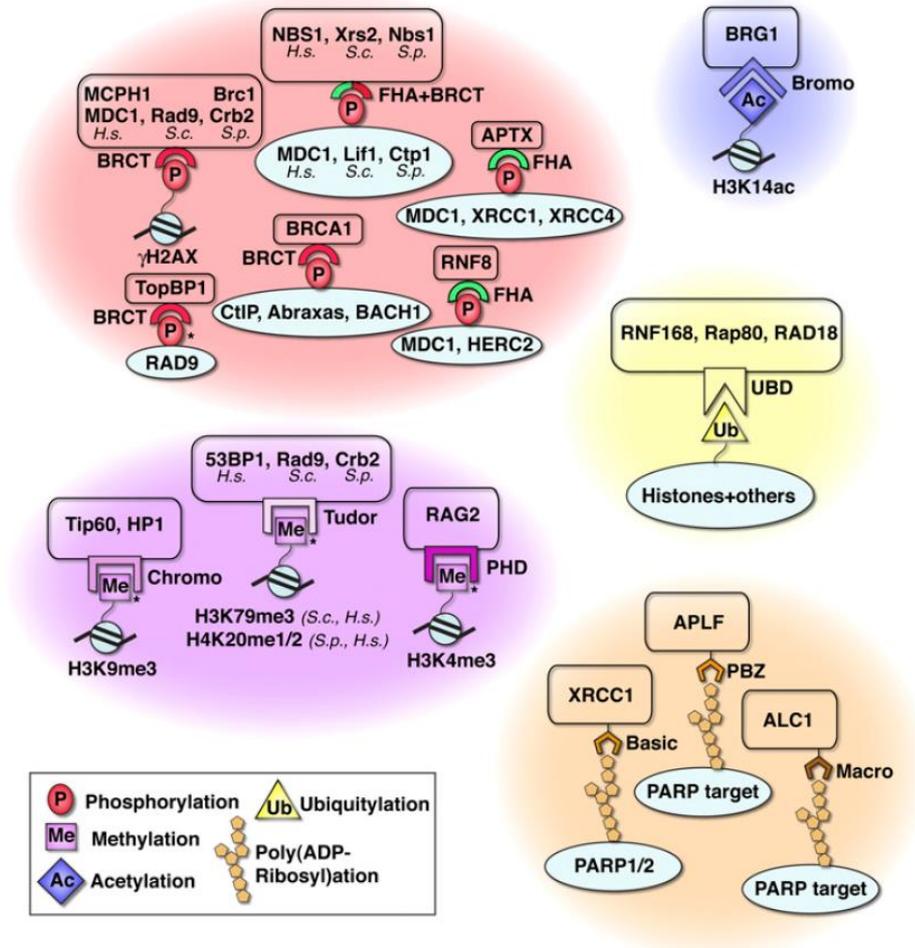


Figure 26 - Principales modifications post-traductionnelles impliquées dans la DDR (Polo and Jackson, 2011)

4.4.2. Les médiateurs

Les médiateurs sont les protéines qui agissent directement après l'action des transducteurs. Ce sont des protéines qui permettent le recrutement de protéines supplémentaires ou qui sont des protéines d'échafaudage sur lesquelles vont s'assembler des complexes afin de participer au décodage de l'information en activant une série de cascade moléculaire.

Les transducteurs ATM et ATR partagent certains substrats mais ont aussi leurs propres substrats. Ils sont responsables de l'ajout d'un groupement phosphate sur plus de 900 sites de 700 substrats protéiques impliqués dans la DDR suite à une irradiation de type IR ou UV (Matsuoka et al., 2007). Contrairement à DNA-PK qui ne régule qu'un petit groupe de protéines impliquées dans la voie NHEJ.

Le Tableau 3 présente les différents médiateurs impliqués dans la DDR en fonction des transducteurs. Le médiateur noté en rouge correspond à celui qui est commun aux trois transducteurs et ceux en gras sont communs à ATR et ATM.

Transducteurs	ATM	ATR	DNA-PK
Médiateurs	53BP1, MDC1, BRCA1 , MCPH1 , PTIP, RNF8, RNF168, MRN, H2AX	Claspin, TOPBP1, MCPH1 , BRCA1 , H2AX	MRN, H2AX

Tableau 3 - Récapitulatif des principaux médiateurs impliqués dans la DDR en fonction des transducteurs

Un des médiateurs les plus étudiés et commun aux trois transducteurs est l'histone H2AX qui, lorsqu'il est phosphorylé par les transducteurs, conduit à γ H2AX. La formation de γ H2AX s'effectue rapidement au niveau des sites endommagés et est nécessaire pour le recrutement des autres facteurs de la DDR au niveau de la chromatine. γ H2AX est reconnu par MDC1 qui est activé par ATM. Le recrutement de MDC1 par le complexe MRN permet une amplification de la phosphorylation de H2AX. En effet, le partenaire de MDC1 est RNF8 qui va être en charge d'ubiquitiner les histones H2AX permettant le recrutement de RNF168 qui effectue la seconde ubiquitination. Ceci permet une amplification du signal d'ubiquitination et permet l'accumulation des protéines de réparation BRCA1 et 53BP1 (Doil et al., 2009) qui vont former des foyers de réparation également appelés foci (Stewart et al., 2003). La fonction de γ H2AX n'est pas encore totalement élucidée mais elle joue un rôle central dans la réponse cellulaire en permettant le recrutement de protéines impliquées dans la réparation. En effet, 53BP1 favorise la voie NHEJ tandis que BRCA1 promeut la HR. Ces deux protéines sont donc en compétition et il a été montré que 53BP1 inhibe l'action de BRCA1 en phase G1 du cycle cellulaire (Bunting et al., 2010; Escibano-Díaz et al., 2013). Le mécanisme complexe par lequel ces deux protéines entrent en compétition n'est pas encore totalement compris (Hustedt and Durocher, 2017). Comme vu précédemment, PARP1 servirait également d'intermédiaire pour l'accumulation du complexe MRN au niveau des CDBs de manière dépendante de γ H2AX et contribuerait donc au remodelage de la chromatine (Haince et al., 2007).

4.4.3. Les effecteurs

Le dernier niveau de la DDR est géré par les effecteurs. Ils permettent l'exécution des fonctions de la DDR entraînant la réponse cellulaire. Nous allons détailler trois effecteurs majeurs : Chk1 et 2 ainsi que p53 mais il existe d'autres effecteurs comme CK2, p38 ou encore MK2 (Harper and Elledge, 2007).

Les deux Sérines/Théonines kinases Chk1 et Chk2 (Checkpoint kinase 1 et 2) sont les effecteurs les plus connus. Ils sont activés par phosphorylation directe par leurs transducteurs.

Chk1 est l'effecteur le mieux caractérisé d'ATR (Liu et al., 2000). Il va être phosphorylé par ATR sur deux de ses résidus Sérine. Cette réaction est stimulée par plusieurs facteurs dont la protéine Claspin (Lindsey-Boltz et al., 2009).

Chk2 est l'effecteur d'ATM (Chaturvedi et al., 1999). Il va être activé par phosphorylation d'ATM sur un résidu Thréonine.

Ces deux effecteurs sont impliqués dans plusieurs réponses cellulaires mais leurs fonctions principales concernent le cycle cellulaire que nous allons voir plus bas. De plus, ils sont capables de phosphoryler l'effecteur p53 (Shieh et al., 2000).

P53 est un autre effecteur qui est très étudié puisque cette protéine est un suppresseur de tumeur souvent nommée « gardienne du génome ». P53 peut être phosphorylée par Chk1 et 2 mais également directement par les transducteurs ATM et ATR au niveau de plusieurs sites (Zhou and Elledge, 2000). Sa phosphorylation permet de la stabiliser pour éviter la fixation de Mdm2, une E3 ligase qui entraîne sa dégradation par ubiquitination (Cheng and Chen, 2010). De plus, ATM et ATR peuvent également directement inhiber l'activité de Mdm2 par phosphorylation (Maya et al., 2001; Shinozaki et al., 2003). La régulation de p53 est très complexe due à son implication dans des processus cellulaires majeurs comme l'arrêt du cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée ou le déclenchement des voies de réparation par activation de la transcription de gènes ; mais également pour d'autres fonctions moins connues comme l'autophagie ou la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses (Biegging et al., 2014).

4.5. Les réponses au niveau cellulaire

Les réponses cellulaires dépendent de l'activation des différentes voies que nous venons de voir. Il existe une variété importante de réponses cellulaires. Nous allons décrire ici uniquement les principales réponses que sont : l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation des différentes voies de réparation, l'apoptose et la sénescence.

L'orientation de la réponse cellulaire est très complexe mais d'une manière générale, la cellule va se mettre en « pause » et empêcher le passage en phase G2/M afin de pouvoir réparer ces lésions. Cependant, si ce blocage est prolongé, les dommages sont considérés comme trop importants pour être réparés et la cellule va déclencher sa mort cellulaire par apoptose ou sénescence afin d'éviter la

transmission de mutations et donc de limiter l'instabilité génétique de l'organisme (Surova and Zhivotovsky, 2013).

4.5.1. L'arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire correspond aux différentes étapes de vie d'une cellule de la division de sa cellule mère jusqu'à sa propre division en deux cellules filles.

Chez les eucaryotes, ce cycle est constitué de quatre phases : G1, la phase S (Synthèse) permettant la réplication de l'ADN, G2 et M (Mitose) qui permet la division des chromosomes entre deux cellules filles (Figure 27). Les phases G1 et G2 sont des intervalles entre les deux phases majeures S et M du cycle cellulaire. La phase G1 est une phase de croissance cellulaire tandis que la phase G2 prépare la cellule à entrer en mitose. Il existe également une autre phase G0 qui ne fait pas partie du cycle cellulaire et qui correspond à un état de quiescence des cellules c'est-à-dire qu'elles ne sont pas en division.

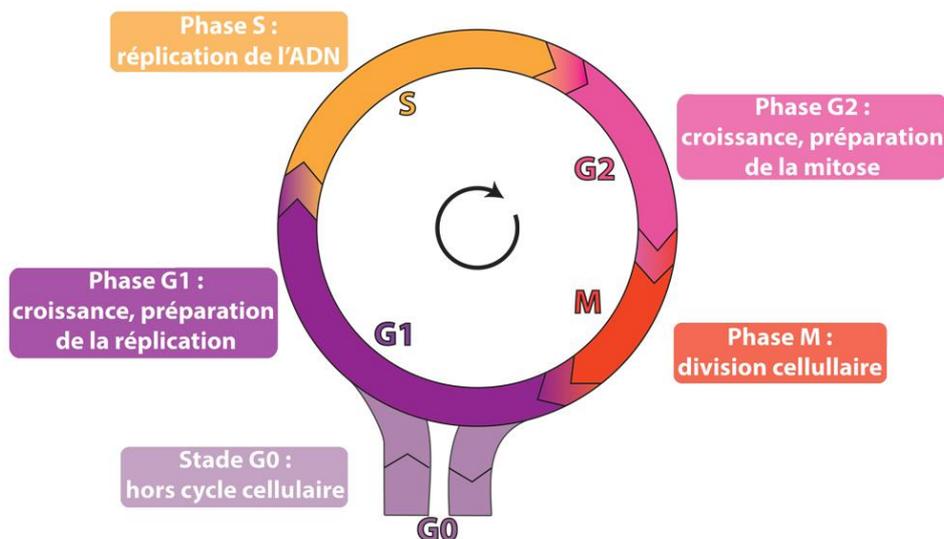


Figure 27 - Les phases du cycle cellulaire et la phase de quiescence G0 (source : site internet RNBio de l'UPMC)

Le passage d'une phase à l'autre est hautement contrôlé par des points de contrôle appelés « checkpoint ». Les checkpoints sont régulés de manière très stricte par des protéines régulatrices : les cyclines et les kinases cyclines-dépendantes (Cyclin dependant kinases : Cdk). Différents complexes composés d'une cycline et d'une Cdk se forment afin d'exécuter chaque phase mais aussi afin de contrôler les transitions entre les différentes phases. Les deux principaux points de contrôle sont en phase G1 et G2 où vont intervenir les protéines Chk1 et 2.

En effet, Chk1, activée par ATR, entraîne la phosphorylation des phosphatases Cdc25A et C ainsi que de la protéine Wee1 (Poehlmann and Roessner, 2010; Smith et al., 2010). Cdc25A va être dégradée ou exportée hors du noyau alors que Cdc25C va être séquestrée sous forme inactive par association avec les protéines 14-3-3. Ces deux phosphatases ont pour rôle de lever l'inactivation du complexe cycline B-Cdk1, permettant le passage de la phase G2 à M, en déphosphorylant Cdk1 (O'Connell et al., 2000; Poehlmann and Roessner, 2010). Lorsque Chk1 est activée, il va donc y avoir un arrêt du cycle cellulaire en phase G2.

Chk2, activée par ATM, agit sur la phosphatase Cdc25A entraînant l'inhibition de Cdk2. Cdk2 est associée aux cyclines A et E nécessaires pour le passage de la phase G1 à S ainsi que durant l'ensemble de la phase S (Smith et al., 2010).

Chk1 et 2 sont également impliquées dans d'autres processus comme la modulation de la transcription de certains gènes, l'apoptose via l'activation de p53 ou encore la réparation de l'ADN via la phosphorylation de diverses protéines (Stracker et al., 2009).

4.5.2. La réparation de l'ADN

L'activation des différents transducteurs peut favoriser différentes voies de réparation par les transducteurs eux-mêmes capables de phosphoryler des substrats protéiques directement impliqués dans la réparation ainsi que par l'intermédiaire de l'ensemble des autres niveaux de la DDR (senseurs, médiateurs ou effecteurs). De plus, ces voies de réparation peuvent également être activées par la modulation de la transcription de certains gènes des voies de réparation. L'activation de ces différentes voies de réparation est délicate étant donné le nombre d'acteurs pouvant intervenir et la variété des voies de réparation existantes. Nous ne citerons ici que quelques exemples non exhaustifs en fonction des différents niveaux de la DDR.

Concernant les senseurs, PARP1 est impliquée dans plusieurs voies de réparation (De Vos et al., 2012; Gibson and Kraus, 2012). En effet, PARP1 va permettre le recrutement de XRCC1 et la Ligase III qui sont impliquées dans la voie BER (El-Khamisy, 2003). De plus, son rôle dans la voie NER n'est pas bien établie mais au moins deux protéines CSB et XPA seraient concernées (Flohr, 2003). Enfin, PARP1 stimule la voie a-NHEJ plutôt que la voie c-NHEJ en entrant en compétition avec Ku (Wang et al., 2006). PARP1 est maintenant reconnue comme un des acteurs clés qui intervient très tôt dans la DDR et qui est impliquée dans de multiples voies de réparation mais son action exacte fait encore l'objet de nombreuses investigations.

Les trois transducteurs ATM, ATR et DNA-PK vont également activer directement certaines protéines des voies de réparation. DNA-PK est un transducteur mais est également un acteur majeur de la voie de réparation c-NHEJ comme nous l'avons décrit précédemment. Nous avons également vu qu'ATM et ATR sont responsables de la phosphorylation d'un grand nombre de protéines dont le complexe MutS α et EXO1 de la voie MMR ; XPA, XPC et CSB de la voie NER ; ou encore FANCD2, FANCI ainsi que des membres du complexe FANCM de la voie ICLR (Matsuoka et al., 2007; Sobeck et al., 2009).

A propos des effecteurs, Chk1 interagit avec Rad51 qui est impliqué dans la voie de réparation HR ainsi qu'avec des protéines impliquées dans la voie ICLR comme FANCE (Stracker et al., 2009). Par ailleurs, p53 peut activer directement la voie NER via l'activation de la transcription des gènes XPC et DDB2 (Ford, 2005).

4.5.3. L'apoptose

Si les dommages sont présents en quantité trop importante ou si la réparation est incomplète ou trop longue, la cellule peut déclencher sa mort cellulaire programmée ou apoptose (Shiloh and Ziv, 2013). Ce processus physiologique d'autodestruction permet aux organismes multicellulaires d'éliminer les cellules superflues et de garantir l'homéostasie des tissus.

Il existe deux principales voies pour le déclenchement de l'apoptose : une voie intrinsèque et une voie extrinsèque. Nous n'aborderons ici que la voie intrinsèque puisque celle-ci est activée suite à la présence de dommages. L'élément majeur de déclenchement est l'activation de p53 qui va entraîner une cascade de signalisation conduisant à l'autodestruction de la cellule. La formation des pores au niveau de la membrane des mitochondries dépend de certains membres de la famille de protéine Bcl-2 (comprenant Bax, Bak et Bcl-2) activés par p53 (Bernstein, 2002). Cette action va conduire au relargage de protéines mitochondriales dans le cytosol comme le cytochrome C. Celui-ci va s'associer avec la protéine Apaf-1 et la procaspase 9 pour former l'apoptosome. Ce complexe protéique va ensuite permettre l'activation de la caspase initiateur 9 qui va cliver la forme inactive (procaspase) de la caspase effectrice 3. Le résultat de cette cascade est donc l'activation de la caspase effectrice 3. Celle-ci va entraîner la dégradation des protéines cellulaires engendrant des modifications physiologiques conduisant à la mort de la cellule (Speidel, 2010).

De plus, p53 ayant pour rôle d'être un facteur de transcription, elle va entraîner l'activation directe de gènes pro-apoptotiques comme PUMA ou NOXA.

4.5.4. La sénescence

Comme l'apoptose, la sénescence est un autre type de programme de mort cellulaire qui peut survenir lorsque les dommages sont considérés comme irréparables par la cellule ou si la réparation est incomplète ou trop longue. Ce processus est caractérisé par un arrêt permanent en phase G1 du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule. L'entrée en sénescence suite aux dommages formés dans l'ADN dépend du type cellulaire ainsi que du contexte physiologique de la cellule.

Dans la plupart des cellules, l'activation de p53 est un facteur crucial pour initier ce mécanisme. P53 a pour cible l'inhibiteur du cycle p21 qui va entraîner l'inhibition de plusieurs Cdk qui régulent la phosphorylation de la protéine pRb. Cette protéine de séquestration bloque alors le cycle cellulaire en phase G1 via son association avec le facteur de transcription E2F (Shiloh and Ziv, 2013).

L'apoptose et la sénescence sont toutes les deux sous le contrôle de p53 mais le choix effectué par la cellule pour entrer dans l'un ou l'autre des processus est encore mal connu.

D'autres mécanismes de mort cellulaire existent suite à la présence de dommages comme la nécrose ou l'autophagie (Shiloh and Ziv, 2013). La cellule a donc plusieurs options de défense contre ces lésions et le choix dépend de la sévérité des dommages ainsi que des protéines exprimées et impliquées dans la régulation de ces programmes de mort cellulaire. Beaucoup d'études sont actuellement en cours pour comprendre les interconnexions entre ces différents modes de mort cellulaire.

4.6. DDR et Cancer

Nous avons précédemment vu que le cancer peut être causé par des facteurs professionnels ou environnementaux ; ou encore qu'il puisse apparaître suite à des défauts dans les voies de réparation. Nous allons voir ici que la DDR est également impliquée dans des dérégulations pouvant entraîner des cancers.

En effet, l'ensemble des mécanismes impliqués dans la DDR ainsi que les différentes voies de réparation sont essentiels pour le maintien de la stabilité génomique et la survie cellulaire. Cependant, certaines cellules échappent au contrôle de la division cellulaire entraînant l'accumulation de mutations dans les cellules filles. Des dérégulations dans la DDR sont associées à une instabilité génomique qui peut conduire au développement de cancer (Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009).

Le cancer résulte de l'accumulation de plusieurs altérations irréversibles et est caractérisé par une prolifération importante et incontrôlée de cellules anormales qui ont la capacité de se disséminer dans

l'organisme. La cancérogénèse désigne le processus de développement d'un cancer et est divisée en trois grandes étapes (Figure 28) :

- Initiation : un agent dit « initiateur » tel qu'un composé génotoxique endogène ou exogène va altérer l'ADN en formant des dommages. Si les lésions ne sont pas réparées alors cela entraîne des mutations qui seront transmises aux cellules filles. Ce phénomène est irréversible.
- Promotion : cette étape correspond à la prolifération d'une ou plusieurs cellules endommagées stimulées par un promoteur (non génotoxique). On assiste à une multiplication clonale qui entraîne l'accumulation de mutations. Cette étape est potentiellement réversible.
- Progression : les cellules acquièrent de nouvelles mutations en relation avec un accroissement du taux de division. Cette étape est notamment caractérisée par des mécanismes d'invasion et d'angiogenèse qui permettent d'irriguer la tumeur. C'est à partir de cette étape que la tumeur devient cliniquement détectable.

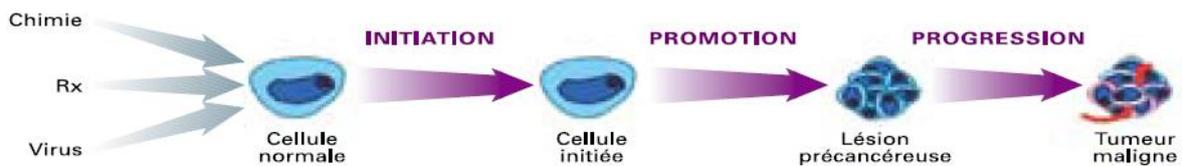


Figure 28 - Schéma du processus de cancérogénèse (source : Centre François Baclesse de lutte contre le cancer de Basse-Normandie)

Au cours de ces dernières années, l'implication de la DDR dans le développement de cancers a notamment été mise en évidence avec l'identification de mutation dans les gènes BRCA1 et 2 qui sont responsables du développement de cancers du sein et des ovaires. On appelle prédisposition génétique, une personne portant une mutation sur l'un de ses gènes se traduisant par un risque augmenté de développer un cancer. Une mutation au niveau de BRCA1 ou 2 prédispose les femmes à un risque de cancer du sein variant de 40 à 80% au cours de la vie (Fackenthal and Olopade, 2007).

Les traitements anti-cancéreux les plus couramment utilisés en dehors de la chirurgie sont les radiothérapies et les chimiothérapies. Parmi les composés utilisés en chimiothérapie, on dénombre de nombreux agents alkylants qui visent à induire un excès de dommages à l'ADN conduisant à un blocage de la réplication ou directement à la mort des cellules cancéreuses. Quant aux radiothérapies, elles consistent à irradier la tumeur pour entraîner la formation de CSBs et CDBs. Cette thérapie est utilisée

chez plus de 40% des patients atteints de cancers. L'action de ces deux types de traitement est donc commune et vise à altérer l'ADN.

Cependant, les réponses des patients aux traitements anti-cancéreux peuvent varier d'un individu à l'autre. En effet, certains vont présenter des résistances aux traitements tandis que certaines personnes vont avoir des effets secondaires bien plus importants que d'autres. Ceci peut être expliqué par la présence de variations inter-individuelles. Il est donc important de pouvoir anticiper et évaluer ces différences entre les individus par le développement de méthodes que nous allons détailler dans la partie qui suit.

5. Outils de mesure de la réparation de l'ADN

Les différentes notions que nous avons évoquées jusqu'ici montrent que la relation entre les dommages à l'ADN et la réparation est complexe. En effet, d'une part, il existe plusieurs voies de réparation et de l'autre, le mécanisme régulateur de la DDR comprend une multitude de protéines ainsi que des réponses variées. A ceci s'ajoute un dernier facteur tout aussi important qu'est la capacité de réponse aux dommages également appelée DRC (DNA Repair Capacity) (Nagel et al., 2014a). En effet, plusieurs études ont montré que chaque individu possède des capacités de réponses aux dommages à l'ADN qui sont différentes (Gaivão et al., 2009; Pons et al., 2010; Tyson et al., 2009; Wilson et al., 2011). Il existe donc des variations inter-individuelles dans la capacité de réponse aux dommages. Cette susceptibilité individuelle peut provenir de divers facteurs comme le mode de vie, l'exposition à différents agents génotoxiques ou encore des variations dans le métabolisme.

Tous ces paramètres complexes interviennent dans la réparation de l'ADN et font que toutes les personnes qui vont être exposées à un agent génotoxique de l'environnement ne vont pas répondre de la même manière. Par exemple, suite à une exposition, certaines personnes vont développer un cancer tandis que d'autres n'en développeront jamais. Il est donc important de pouvoir évaluer les capacités de réponse aux dommages de l'ADN. Pour cela, au cours des dernières années, plusieurs méthodes ont émergé et permettent d'étudier le fonctionnement des systèmes biologiques à différentes échelles cellulaires. Par exemple, le séquençage de l'ADN peut être utile pour mettre en évidence des polymorphismes dans certains gènes de la réparation. D'autres méthodes comme le Western Blot (WB) ou les analyses protéomiques vont s'intéresser au niveau d'expression et à la présence des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Figure 29).

Nous allons nous intéresser ici aux méthodes utilisées pour évaluer la fonction des protéines de réparation et qui permettent donc d'analyser les activités de réparation de l'ADN. Ainsi, nous verrons dans un premier temps deux méthodes indirectes basées sur la mesure des lésions avec le test des comètes et la chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS). Ensuite, nous détaillerons deux techniques directes que sont le test HCR (Host Cell Reactivation) et deux tests (Glyco et ExSy-SPOT) développés par LXRepair.

Nous ne présenterons que ces quatre techniques mais il en existe d'autres comme par exemple, les méthodes immunochimiques qui utilisent des anticorps dirigés contre les lésions (ELISA, dot-blot).

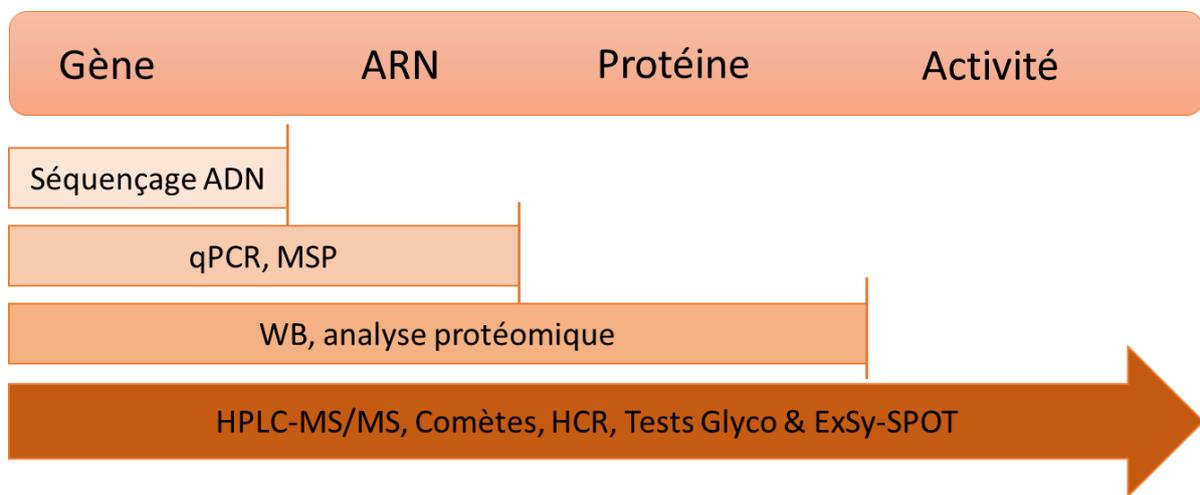


Figure 29 - Méthodes pour étudier les différents niveaux de la réparation de l'ADN (qPCR : PCR quantitative permettant l'étude de l'expression des gènes ; MSP : Méthylation specific PCR permettant l'analyse de la méthylation des sections promotrices des gènes ; WB : Western Blot permettant la détection et la quantification relative de protéines ; HCR : Host Cell Reactivation permettant l'étude des activités de réparation de l'ADN)

5.1. Méthodes indirectes basées sur la mesure des lésions

Les techniques que nous allons présenter dans cette partie permettent de quantifier les lésions présentes dans l'ADN. Ces méthodes peuvent également permettre de suivre la cinétique de réparation des lésions en observant la disparition des lésions. Pour cela, il suffit de mesurer la présence des lésions à des temps différents après une exposition aigüe.

5.1.1. Test des comètes

Le test des comètes (Single Cell Electrophoresis Assay) a été décrit pour la première fois dans les années 80 et permet de mesurer les cassures simple brin et double brin ainsi que les sites alcali-labiles (sites AP, certaines bases alkylées) de l'ADN dans des conditions alcalines. Cette technique d'électrophorèse sur gel d'agarose permet de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées. Pour cela, les cellules sont suspendues dans un gel d'agarose et un traitement à base de détergents et de sels permet de lyser les membranes. L'ADN des cellules chargé négativement va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse. Le marquage au bromure d'éthidium (BET) permet de révéler l'ADN : les noyaux intacts forment une sphère compacte contrairement à l'ADN endommagé qui, de par la présence de cassures, va migrer et ainsi prendre l'aspect d'une comète. La visualisation des fragments d'ADN s'effectue au microscope à fluorescence. La taille et l'intensité de la queue des comètes sont directement proportionnelles au nombre de cassures présentes dans l'ADN nucléaire.

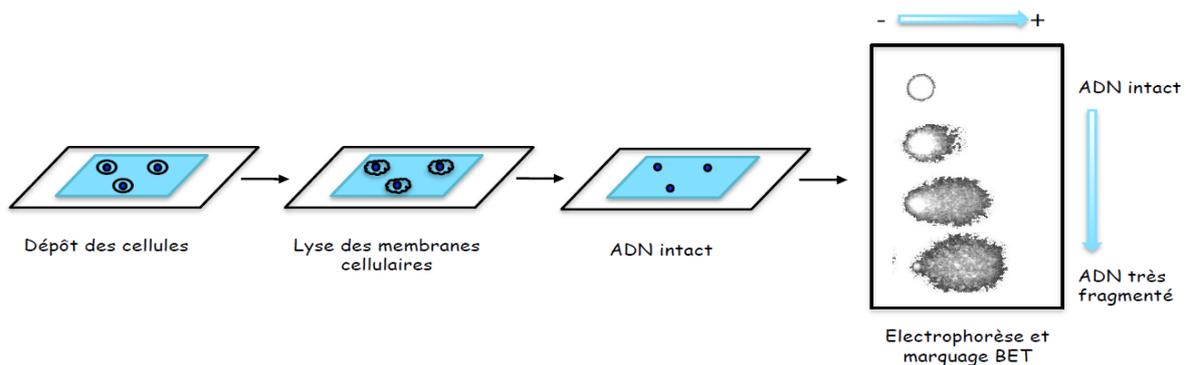


Figure 30 - Principe du test des comètes (Genies, 2013)

Il existe une version modifiée du test des comètes qui permet de déceler spécifiquement certaines lésions oxydatives par l'utilisation d'enzyme de la réparation (ADN N-glycosylases). Ces enzymes vont entraîner l'excision de la base oxydée et former une cassure simple brin (Collins, 2004). Par exemple, l'utilisation de l'enzyme Fpg permet de détecter les purines oxydées dont la 8oxoG et Endo III est utilisée pour les pyrimidines oxydées comme les diols de Thymine (Collins et al., 1993, 1996).

Cette technique est très utilisée en biosurveillance par exemple pour évaluer les capacités de réparation de l'ADN après irradiation *in vitro* de lymphocytes de sujets exposés professionnellement ou non aux IR. Elle présente de nombreux avantages et inconvénients qui sont les suivants :

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ nécessite peu de cellules (entre 400 et 2 000) ➤ peu coûteux ➤ simple à mettre en œuvre en laboratoire ➤ sensible (environ 1 cassure pour 10^8 bases) ➤ approche cellule par cellule ➤ technique applicable à un grand nombre de types cellulaires, de tissus et d'organismes 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ pas d'information relative à la quantification du nombre de dommages ➤ manque de spécificité dû à l'absence d'information sur la nature des dommages mesurés ➤ limiter à l'analyse de lésions qui génèrent des cassures simples brins ➤ l'analyse est longue et ne permet pas d'effectuer des expériences en haut débit ➤ variations inter et intra-laboratoires (Ersson et al., 2013)

Tableau 4 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test des comètes

5.1.2. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS/MS)

Cette technique permet la détection des bases modifiées par séparation des molécules après ionisation en fonction du rapport masse/charge. L'analyse par HPLC-MS/MS nécessite deux étapes préliminaires si les échantillons de départ sont des cellules : une première étape d'extraction de l'ADN puis l'hydrolyse de l'ADN en nucléosides.

L'appareil est composé de deux parties : une première comportant de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) qui permet la séparation des composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant puis introduits dans la phase mobile liquide. La phase mobile poussée par une pompe haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. La deuxième partie est constituée du spectromètre de masse (MS/MS) et permet d'ioniser les molécules qui sont éluées à la sortie de la colonne HPLC afin de pouvoir les séparer en fonction du rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre de masse est constitué de plusieurs parties (Figure 31) :

- Une **source d'ionisation** où les molécules séparées par le système HPLC sont vaporisées et passent en phase gazeuse. Il va y avoir formation de petites gouttelettes et les molécules se retrouvent alors ionisées. Cela permet également d'éliminer des molécules neutres comme les solvants. Cette étape s'effectue avec une ionisation douce à pression atmosphérique grâce à l'électrospray.
- Un **analyseur** qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z . En effet, le quadripôle va permettre de filtrer les ions en fonction du rapport m/z . Afin d'obtenir une sensibilité importante, le système est généralement composé de trois analyseurs de type quadripôle. Le premier quadripôle Q1 sélectionne l'ion d'intérêt (ion parent) de la molécule ; le deuxième correspond à la cellule de collision (Q2) qui va fragmenter cet ion par collision avec un gaz neutre (argon ou azote) ; puis le dernier (Q3) va sélectionner le ou les ions (ions fils) issus de la fragmentation de l'ion parent. C'est grâce à l'utilisation de ce mode MRM (Multiple Reactions Monitoring) que la sensibilité et la spécificité de détection sont importantes.
- Un **détecteur** qui transforme les ions en signal électrique.

Nous avons détaillé ici la source d'ionisation de type électrospray couplé à un analyseur triple quadripolaire car ceci correspond au matériel que nous avons utilisé dans le cadre de ce projet. Cependant, il existe plusieurs types de sources d'ionisation et d'analyseurs mais qui sont moins adaptés pour la quantification des lésions à de faible concentrations.

Les données sont ensuite traitées et permettent d'identifier et de quantifier le nombre de lésions présentes dans l'échantillon. La quantification est possible grâce à des standards internes (enrichis isotopiquement) et/ou externes à une concentration connue. La détection d'une lésion va nécessiter la mise au point d'une méthode qui va être propre à chaque lésion. Cette mise au point s'effectue à partir d'un standard afin d'identifier les ions fils et d'optimiser l'ionisation et la fragmentation. La limite de détection dépend de la sensibilité de détection ainsi que de la quantité d'ADN.

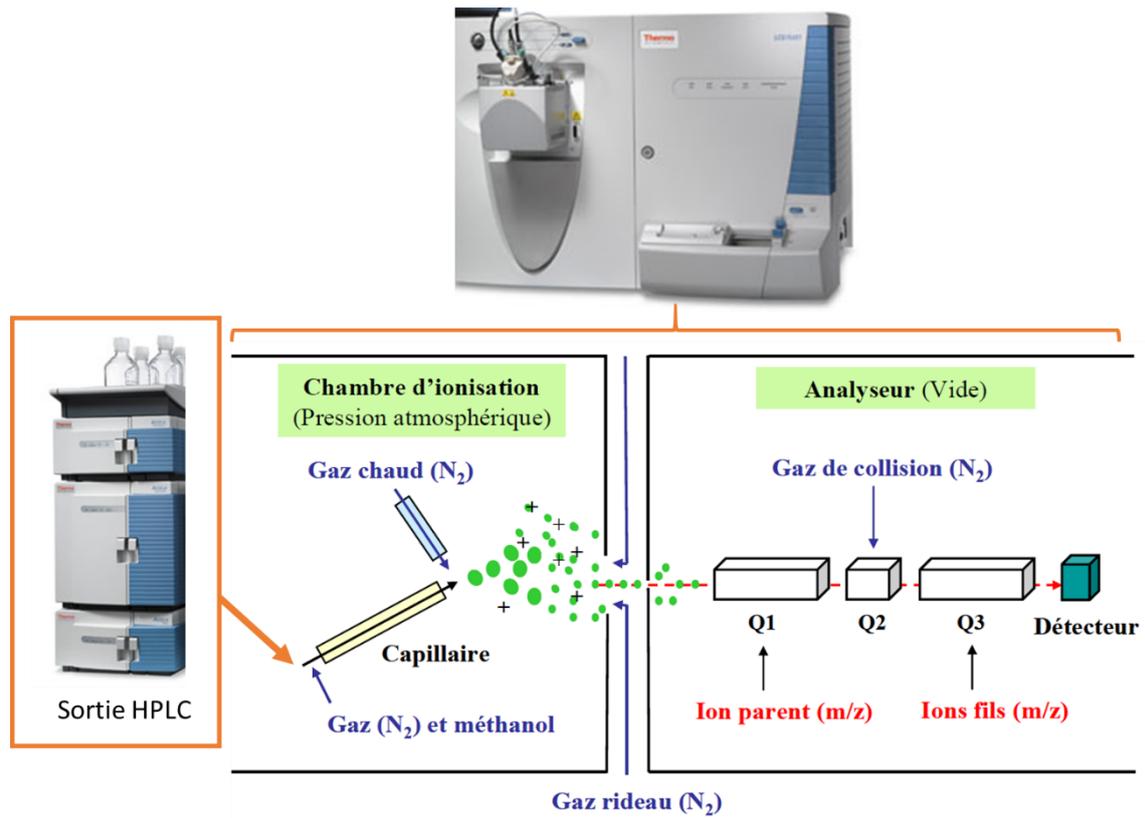


Figure 31 - Schéma d'une source d'ionisation électrospray couplée à un analyseur quadripôles (adaptée de Marie, 2007)

Comme toute technique, elle comporte des avantages et des inconvénients qui sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ grande sensibilité si l'ionisation et la fragmentation est efficace ➤ grande spécificité obtenue grâce au MS/MS en mode MRM ➤ versatilité puisqu'il peut détecter simultanément plusieurs molécules ➤ quantitative 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ coût élevé à l'achat de l'appareil estimé entre 200 000 et 300 000 euros ➤ nécessité de préparer des standards internes ou externes ce qui n'est pas toujours facile de réaliser par synthèse chimique ➤ étape d'extraction et de digestion enzymatique de l'ADN qui peut entraîner l'oxydation artéfactuelle de l'échantillon

Tableau 5 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de la technique HPLC-MS/MS

5.2. Méthodes de mesure directe des activités enzymatiques de réparation

Ces méthodes s'intéressent à l'activité des protéines/enzymes et intègrent donc les conséquences de l'ensemble des régulations pouvant avoir lieu en amont (synthèse gènes, ARN et protéines, modifications post-traductionnelles, ...). Elles caractérisent la capacité globale de réparation à travers des tests fonctionnels qui permettent d'obtenir une information directe sur les activités enzymatiques impliquées dans différentes voies de réparation.

5.2.1. Test HCR (Host Cell Reactivation)

Cette technique permet de mesurer les activités de réparation de l'ADN directement au sein des cellules vivantes. Pour cela, les cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour un gène rapporteur par des méthodes chimiques permettant de perméabiliser la membrane des cellules. Préalablement à cette étape, le plasmide a été modifié afin de contenir un type de lésion spécifique introduit par synthèse chimique dans le gène rapporteur ou par traitement *in vitro* avec des agents génotoxiques physiques ou chimiques.

Au sein de la cellule, l'expression du gène rapporteur est inactivée par la présence de lésions de deux manières possibles : soit la lésion bloque la transcription du gène, soit elle induit une mutation dans un codon entraînant la synthèse d'une protéine non fonctionnelle.

L'analyse des activités de réparation au niveau du plasmide s'effectue en observant l'expression du gène rapporteur. Si la réparation a eu lieu au niveau du plasmide et si elle est fidèle, il va y avoir expression d'une protéine comme la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), la luciférase, ou des protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescent Protein) qui sont les plus couramment utilisées pour ces tests. Le signal de fluorescence émis par les protéines est ensuite analysé au microscope à fluorescence. C'est ensuite le niveau d'expression de cette protéine et par conséquent l'intensité du signal qui va permettre de conclure sur les activités de réparation au sein de la cellule. Dans le cas où la cellule n'a pas réussi à réparer la lésion, l'expression du gène rapporteur est nulle et on n'observe pas de signal fluorescent (Qiao et al., 2002).

Cette technique a récemment été adaptée afin de pouvoir co-transfecter jusqu'à quatre plasmides qui vont porter chacun un type de lésion dans la cellule hôte (Figure 32). Cette nouvelle méthode appelée FM-HCR (Fluorescent-based Multiplexed Host Cell Reactivation) permet une analyse unique et simultanée de l'ensemble des signaux de fluorescence grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux (Nagel et al., 2014b). Un panel de plasmides a été mis au point afin de pouvoir étudier pratiquement l'ensemble

des voies de réparation : NHEJ, NER, MMR, BER, DR et HR. Ce test permet donc d'étudier jusqu'à quatre voies de réparation simultanément et a été validé sur 55 lignées cellulaires. Le format en plaque 96 puits et l'utilisation de la cytométrie en flux automatisé permettent d'optimiser le temps pour effectuer ce test qui est estimé entre 1 et 2h par lignée cellulaire.



Figure 32 - Schéma simplifié du test FM-HCR : principe de détection de la réparation par le test de réactivation (d'un gène) en cellule hôte (HCR) et de l'utilisation de la cytométrie en flux afin de pouvoir détecter simultanément plusieurs signaux de fluorescence.

Les avantages et inconvénients de cette nouvelle technique FM-HCR sont les suivants :

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ mesure <i>in cellulo</i> des activités de réparation ➤ maîtrise du type exact de dommage ainsi que du nombre de lésions introduit dans le plasmide si on utilise la synthèse chimique ➤ permet d'étudier pratiquement l'ensemble des voies de réparation ➤ ne nécessite pas la préparation d'extraits protéiques ➤ technique de haut-débit 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ nécessite la transfection de cellule or toutes les cellules ne sont pas transfectables et cela peut entrainer des modifications physiologiques de la cellule ➤ aléas liés à la transfection malgré la normalisation ➤ utilisation de plasmide circulaire qui ne reflète pas avec précision l'ADN génomique

Tableau 6 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test HCR

5.2.2. Tests *in vitro* de mesure des activités de réparation

Plusieurs tests ont été développés afin de mesurer les activités de réparation *in vitro*. Ils nécessitent tous une étape préalable de préparation d'extraits de manière à obtenir les protéines de réparation à partir d'échantillons qui peuvent être de plusieurs types (cellules, tissus, modèles 3D, ...) ou d'enzymes de réparation purifiés.

Une version dérivée du test des comètes a été développée afin d'évaluer les activités de réparation des voies NER et BER (Azqueta et al., 2014). Ce test consiste à traiter les cellules avec des agents chimiques ou à les irradier afin de former différents types de lésions dans l'ADN cellulaire. Les cellules sont ensuite intégrées dans un gel d'agarose avec une solution conduisant à une lyse des membranes dans le but d'obtenir un substrat appelé nucléoïde. Ce substrat est ensuite incubé avec un extrait protéique contenant les protéines de réparation qui vont induire des cassures au niveau des sites endommagés de l'ADN lors de la réparation des lésions. Le test des comètes que nous avons décrit précédemment est ensuite réalisé et les cassures de l'ADN formées au niveau du substrat vont permettre de quantifier les activités de réparation de l'ADN. Cette technique est notamment utilisée dans le cadre de l'exposition à des agents génotoxiques en milieu professionnel afin d'établir des biomarqueurs d'exposition (Dušinská et al., 2004; Slysokva et al., 2007).

Nous allons maintenant nous intéresser aux tests *in vitro* d'excision et/ou resynthèse qui sont couramment utilisés. Parmi ces tests, on peut différencier les tests d'excision qui s'intéressent à l'étape d'excision de la voie BER et donc principalement aux activités des glycosylases de cette voie. Pour cela, un oligonucléotide double brin portant une lésion est marqué radioactivement à une de ses extrémités (Butenandt et al., 1999). Celui-ci est ensuite incubé avec des extraits protéiques. Si, au cours de cette étape une excision a lieu, alors l'oligonucléotide portant la lésion est coupé (dans le cas des glycosylases fonctionnelles) en deux. Une électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant (PAGE) suivie d'une autoradiographie du gel permettent de conclure quant à l'incision du dommage. En effet, si une incision a eu lieu, deux bandes distinctes seront observées. Il est ensuite possible de calculer des rendements réactionnels en quantifiant la radioactivité de chaque bande (Guerniou et al., 2005).

Les oligonucléotides peuvent également être utilisés pour suivre les activités d'excision des voies NER et BER. En effet, l'équipe de N. Geacintov a mis au point une méthode permettant de mesurer les activités d'excision de plusieurs types de lésions dont l'adduit BPDE-N²-G (Hess et al., 1997). Pour cela, plusieurs oligonucléotides sont assemblés afin d'obtenir un oligonucléotide de taille suffisante pour pouvoir étudier la voie NER. Après incubation avec les extraits et en fonction de la migration des différents fragments d'oligonucléotides dans le gel, il est alors possible de pouvoir suivre simultanément l'excision obtenue par les voies BER et NER (Shafirovich et al., 2016).

Le deuxième test qui a été développé dans cette catégorie permet de mesurer quantitativement les activités de la NER et de la BER toujours à partir d'extraits protéiques. Cette méthode a été décrite pour la première fois par R. Wood en 1988 (Wood et al., 1988) et tire profit de l'étape de resynthèse de l'ADN des voies BER et NER. Dans ce cas-ci, l'extrait protéique est mis en présence d'un plasmide contenant une lésion et d'un nucléotide marqué radioactivement. Les plasmides sont ensuite précipités et

linéarisés par l'action d'enzyme de restriction, puis une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les différents fragments d'ADN générés par l'action des protéines de réparation présentes dans les extraits. Enfin, comme précédemment, une autoradiographie est réalisée permettant ainsi de quantifier la radioactivité incorporée lors de la réparation des plasmides.

Tous les tests que nous venons de décrire sont particulièrement sensibles mais ont pour principaux inconvénients d'utiliser la radioactivité d'être monoparamétriques. En effet, ils ne permettent d'étudier qu'un seul type de lésion à la fois. Nous allons maintenant voir l'intérêt des tests développés par LXRepair comparés à ceux-ci.

5.2.3. Tests développés par LXRepair

LXRepair est une start-up qui a été créée en 2013 dirigée par Sylvie Sauvaigo. La start-up est spécialisée dans la conception et la fabrication de puces comportant des ADN modifiés permettant la caractérisation multiplexe des voies de réparation de l'ADN. LXRepair possède une licence exclusive mondiale du CEA sur trois brevets de concept concernant deux tests qu'elle a développés et que nous allons détailler ci-dessous. Un des atouts majeurs de ces deux tests est qu'il permet de réaliser la mesure des activités de réparation de plusieurs dommages en une seule réaction et ainsi obtenir ce qu'on appelle une signature enzymatique de réparation.

Ces deux tests ont été développés à partir de tests *in vitro* existants que nous venons de décrire précédemment. Ils ont ensuite été adaptés au multiplexage et à un format miniaturisé sur biopuce. Ces tests utilisent également des extraits protéiques.

5.2.3.1. Test Glyco-SPOT

Depuis 2015, ce test est commercialisé par LXRepair via Bertin Pharma sous forme de kit de type RUO (Research Use Only).

Ce test correspond à une version multiplexée des tests *in vitro* permettant de mesurer uniquement l'étape d'excision à partir de l'utilisation d'oligonucléotides.

Ces tests ont été adaptés sur puce pour créer le test Glyco-SPOT. La première étape de ce test consiste à fabriquer les biopuces en déposant des oligonucléotides « support » sur une lame. Une étape d'hybridation avec les oligonucléotides « lésions » a ensuite lieu. Ces oligonucléotides (ODN) portent chacun une lésion spécifique et sont couplés à un fluorochrome. La réaction d'excision s'effectue en

déposant les échantillons (extraits nucléaires par exemple) sur la biopuce. Si, lors de la réaction, une excision a lieu, alors l'oligonucléotide portant la lésion sera coupé en deux entraînant une perte du signal de fluorescence. L'intensité de fluorescence est quantifiée à l'aide d'un scanner. Les résultats sont exprimés en % de taux de coupure au niveau de chacune des lésions (Sauvaigo et al., 2004). Ce test permet de quantifier simultanément l'activité de 8 ADN-N-Glycosylases et endonucléases impliquées dans la voie de réparation BER (Figure 33).

Lésions	Glycosylases ou endonucléases humaines
8oxoG-C	hOGG1
A-8oxoG	hMYH
Tg-A	NTH1, hNEIL1
U-G	UDG
U-A	UDG, SMUG1
Hx-T	MPG (AAG)
εA-T	MPG (AAG)
Site AP (THF)-A	APE1

Figure 33 - Liste des lésions présentes sur le test Glyco-SPOT et des glycosylases et endonucléases correspondantes prenant en charge chaque lésion

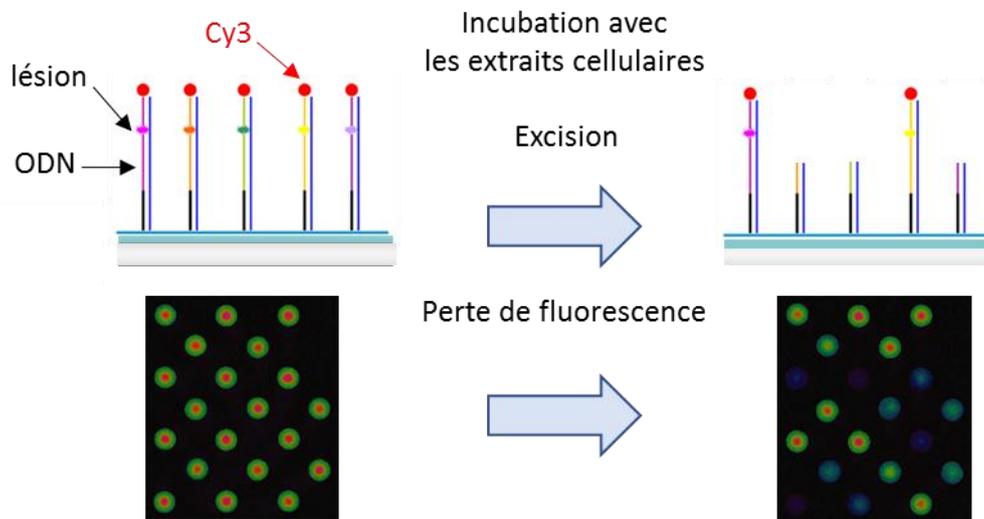


Figure 34 - Schéma simplifié du test Glyco-SPOT

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ test fonctionnel, multiplexé et quantitatif ➤ utilisation d'oligonucléotides de synthèse qui permettent de maîtriser parfaitement le nombre de lésions et assurer une bonne reproductibilité ➤ format multipuits ➤ forte sensibilité (utilisation de très peu de matériel biologique) ➤ automatisable ➤ commercialisé ➤ utilisation de fluorochrome ➤ obtention des résultats en moins 4h 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ permet d'étudier uniquement les capacités d'excision de la voie BER ➤ l'environnement de travail nécessite une salle grise ou blanche (afin de limiter les poussières) ➤ nécessite une étape préalable de préparation des extraits

Tableau 7 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test Glyco-SPOT

5.2.3.2. Test ExSy-SPOT

Ce test est une transposition du test *in vitro* d'excision/resynthèse décrit précédemment. Il permet de mieux caractériser les mécanismes d'excision/resynthèse comparé au test Glyco-SPOT puisqu'il permet d'observer les capacités d'excision et de resynthèse de deux voies de réparation BER et NER. Pour cela, des substrats plasmidiques sont déposés sur une lame hydrogel. Chaque plasmide possède un type de lésions qui est produit par l'utilisation d'agents chimiques ou physiques. Un mélange réactionnel est ensuite préparé en rajoutant l'extrait à caractériser, des dNTPs et un marqueur fluorescent. Pendant la réaction d'excision/resynthèse, les enzymes de réparation de l'extrait vont reconnaître, couper et éliminer les lésions et resynthétiser le fragment d'ADN manquant. Le marqueur fluorescent (dCTP-Cy3) est incorporé pendant l'étape de resynthèse. La fluorescence est ensuite quantifiée à l'aide d'un scanner. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence incorporée pour chaque lésion (Figure 36). La fluorescence est proportionnelle au nombre de lésions par plasmide et à l'efficacité de réparation vis-à-vis de chaque lésion (Millau et al., 2008). Ce test permet de quantifier la réparation de 8 types de dommages de l'ADN présentés sur la Figure 35.

Nom du plasmide	Type de lésions
CisP	Adduits cisplatine
CPD-64	CPD et 6-4PP
AbaS	Sites abasiques (AP)
Ethéno	Ethénobase: εA, εG et εC
8oxoG	Lésion oxydative 8oxoG
Glycols	Lésions oxydatives: Diols de Thymine et Cytosine
BPDE	Adduit BPDE-N ² -G
Pso	Adduits psoralène

Figure 35 - Liste des lésions disponibles pour le test ExSy-SPOT

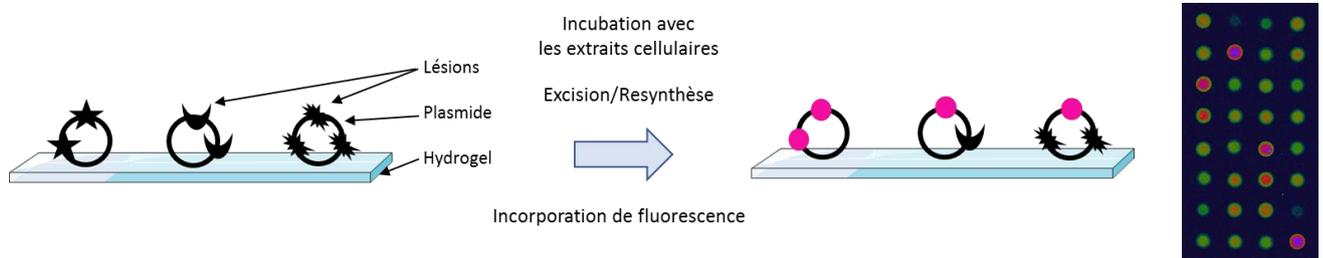


Figure 36 - Schéma simplifié du test ExSy-SPOT

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> ➤ test fonctionnel, multiplexé et quantitatif ➤ possibilité d'utiliser plusieurs dNTPs couplés à un fluorochrome ce qui permet d'augmenter la sensibilité du test ➤ utilisation de peu de matériel biologique (Minimum : 2 millions de cellules) ➤ quantification simultanée de plusieurs voies de réparation de l'ADN ➤ obtention des résultats en moins 4h 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ l'étape de préparation des plasmides lésés peut poser des problèmes de reproductibilité ➤ utilisation de plasmide circulaire qui ne reflète pas avec précision l'ADN génomique ➤ l'environnement de travail nécessite une salle grise ou blanche (afin de limiter les poussières) ➤ nécessite une étape préalable de préparation des extraits

Tableau 8 - Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients du test ExSy-SPOT

6. Exposition des populations aux agents génotoxiques

Dans le cadre de ce projet, nous avons sélectionné deux agents génotoxiques ainsi que leurs métabolites qui sont ou ont été au cœur des préoccupations des effets sanitaires. En effet, ces agents sont très étudiés au niveau des populations pour leurs expositions environnementales et professionnelles.

Le premier agent génotoxique que nous avons choisi est le Benzo[a]pyrène (B[a]P) qui appartient à une famille de polluants atmosphériques, ainsi qu'un de ses principaux métabolites le BPDE dont nous avons vu qu'il était hautement réactif avec l'ADN pour conduire à la formation d'adduits. Ce premier agent génotoxique est retrouvé dans l'environnement ainsi qu'en milieu professionnel.

Le deuxième agent est l'Ifosfamide (IFO) qui est un agent anti-cancéreux utilisé en chimiothérapie ainsi que son métabolite le Chloroacétaldéhyde (CAA). Notre choix s'est porté sur cet agent car nous souhaitions idéalement étudier l'impact du Chlorure de Vinyle monomère (VC) qui est notamment utilisé dans les industries fabriquant du plastique (PVC). Suite à un scandale sanitaire, le niveau d'exposition au VC est dorénavant très contrôlé. Les sources d'exposition au VC sont professionnelles mais également environnementales. Lorsque le VC est métabolisé dans l'organisme, il forme le composé CAA qui est, lui aussi, très réactif vis-à-vis de l'ADN et qui conduit à la formation d'Éthénobases. Le VC se présente sous la forme de gaz ce qui rend son utilisation en laboratoire compliqué. Pour cela, nous avons donc dû trouver une alternative à l'utilisation de ce gaz et nous avons sélectionné l'IFO qui conduit au même métabolite, le CAA.

6.1. Un exemple d'agent génotoxique de l'environnement et de l'industrie : le benzo[a]pyrène

6.1.1. Généralités sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) sont une famille de plus d'une centaine de composés organiques neutres et apolaires de 2 à n cycles aromatiques présents de manière ubiquitaire dans l'environnement général, domestique et professionnel. En effet, ce sont des constituants naturels du charbon et du pétrole, ou qui proviennent de la combustion incomplète de matières organiques comme le bois ou le tabac, de certains aliments ou encore des gaz d'échappement des moteurs à explosion.

La plupart des composés à plus de 4 noyaux aromatiques présentent un caractère mutagène et/ou cancérigène. La structure aromatique de ces HAPs leur confère un caractère très lipophile ce qui facilite

leur pénétration et leur diffusion à travers les membranes cellulaires de l'organisme. Ces polluants sont retrouvés sous forme de mélanges complexes qui varient en proportion selon la source d'émission.

Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est une molécule de référence de cette famille, que l'on retrouve en proportion relativement constante (environ 10%) dans un bon nombre de mélanges de HAPs. De plus, c'est le seul composé qui soit classé comme cancérigène avéré. En effet, depuis 2005, le CIRC a classé le B[a]P dans le groupe 1 suite à des données épidémiologiques obtenues chez l'Homme (Straif et al., 2005) qui ont montré que le B[a]P était responsable de différents types de cancers : cutanés, broncho-pulmonaires, des voies urinaires.

Le CIRC possède une classification des substances cancérigènes pour les humains qui est la suivante :

- Groupe 1 : agent cancérigène (parfois appelé cancérigène avéré ou cancérigène certain)
- Groupe 2A : agent probablement cancérigène
- Groupe 2B : agent peut être cancérigène (parfois appelé cancérigène possible)
- Groupe 3 : agent inclassable quant à sa cancérigénicité
- Groupe 4 : agent probablement pas cancérigène

Le B[a]P est également classé CMR de catégorie 2 par l'Union Européenne (fortes présomptions d'effet cancérigène, mutagène et toxique pour la reproduction), tératogène et est un perturbateur endocrinien.

Le B[a]P est un des HAPs les plus connus car il est très étudié et est également utilisé comme indicateur de la contamination par les HAPs dans les échantillons environnementaux.

Il est composé de cinq cycles aromatiques dont la structure chimique est représentée sur la Figure 37.

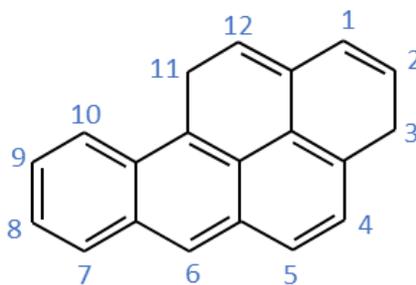


Figure 37 - Structure chimique du B[a]P et numérotation des carbones

Notre choix s'est donc rapidement porté vers cet agent génotoxique pour ce projet de recherche dont nous allons voir plus en détail les différentes sources et voies d'exposition.

6.1.2. Sources et voies d'exposition au B[a]P

Les sources d'exposition au B[a]P sont nombreuses et variées, nous allons les classer en deux catégories : environnementale impactant la population générale et professionnelle.

Au niveau de la population générale, les sources d'exposition au B[a]P dans l'environnement peuvent provenir à la fois des eaux, des sols ou de l'air ambiant avec les incendies de forêts, les volcans, les rejets industriels, les transports (gaz d'échappement automobile), la fumée de cigarette, le chauffage urbain. On retrouve également du B[a]P dans les aliments grillés ou fumés, les légumes, les céréales, les produits de la mer ou encore le café. Les aliments constituent la principale source d'exposition pour la population générale. Pour un non-fumeur, l'absorption quotidienne de HAPs est estimée à 1.6 µg par l'alimentation (Jan et al., 2008). Il est important pour les études épidémiologiques menées de distinguer les fumeurs des non-fumeurs puisque qu'une cigarette contient 10 à 40 ng de B[a]P (Ding et al., 2008).

Concernant les expositions professionnelles, il est estimé qu'environ 1.6 millions de salariés en France seraient concernés par une exposition aux HAPs (Ministère de l'emploi, 2005). Ces expositions proviennent de cokeries produisant du coke à partir de la distillation de la houille, de la production d'aluminium et de silicium, de la fabrication d'électrodes de carbone, des raffineries de pétrole, des usines à gaz, ou encore des fonderies. Le niveau d'exposition n'est pas le même selon le type d'industrie, cependant, celui-ci est nettement plus élevé qu'en environnement général. En France, la Caisse primaire d'assurance maladie (CPAM) recommande de maintenir la teneur en B[a]P à une valeur inférieure à 150 ng/m³ en milieu professionnel.

Le B[a]P est émis dans l'atmosphère sous forme particulaire. Du fait de sa propriété lipophile, il peut facilement traverser les membranes cellulaires par diffusion passive et peut donc ainsi être absorbé par trois voies : respiratoire, digestive et cutanée.

Dans l'atmosphère, le B[a]P est adsorbé sur des particules qui en fonction de leur taille vont pouvoir se retrouver dans des parties plus ou moins profondes du poumon. En effet, des particules fines de diamètre inférieur à 0.5 µm vont pouvoir pénétrer jusqu'au poumon profond. Il a été montré que la moitié des HAPs présents dans l'atmosphère sont adsorbés par ces particules fines (Rehwagen et al., 2005).

Pour la voie cutanée, il a été estimé qu'environ 20% de la dose de B[a]P déposée chaque jour sur la peau des salariés est absorbée (Rooij, 1994).

Pour la voie digestive, l'absorption a lieu dans l'ensemble de l'intestin grêle (Ramesh et al., 2004). La pénétration se fait au niveau des entérocytes par diffusion passive.

Après pénétration du B[a]P par les différentes voies, celui-ci est rapidement et largement distribué dans tout l'organisme. De plus, du fait de son caractère lipophile, il a tendance à se stocker dans les tissus adipeux et mammaires.

Malgré sa distribution importante dans l'organisme, celui-ci est rapidement éliminé de l'organisme due principalement à son métabolisme hépatique que nous allons détailler ci-dessous.

6.1.3. Métabolisme et mécanisme d'action du B[a]P

La plupart des substances exogènes qui arrivent dans l'organisme sont métabolisées par ce qu'on appelle la voie des xénobiotiques afin de protéger l'organisme. Ce métabolisme est complexe et a lieu dans différents tissus de l'organisme (poumons, peau, tube digestif, ...) mais le foie joue un rôle important dans ce processus de biotransformation du B[a]P.

Ce processus de biotransformation constitué de plusieurs phases qui va transformer le B[a]P en plusieurs composés plus hydrophiles appelés métabolites facilitant ainsi son élimination.

Cependant, nous allons voir que ce système n'est pas parfait puisque paradoxalement à son rôle de détoxification, il peut se révéler source de toxicité. En effet, la métabolisation du B[a]P va engendrer la production d'une vingtaine de métabolites dont certains sont toxiques pour l'organisme. Ces métabolites s'intercalent dans l'ADN avec lequel ils forment des adduits covalents pouvant être à l'origine de mutations. La cancérogénicité du B[a]P est due à plusieurs mécanismes dont la formation de ces métabolites mutagènes.

Le processus de métabolisation des xénobiotiques est divisé en trois grandes phases (Figure 38) :

- Phase I de fonctionnalisation ou biotransformation : permettant la transformation du B[a]P en métabolites fonctionnalisés.
- Phase II de conjugaison : conduisant à la modification des métabolites fonctionnalisés en métabolites conjugués plus hydrophiles facilitant leur élimination.
- Phase III d'élimination des métabolites conjugués par des protéines d'efflux.

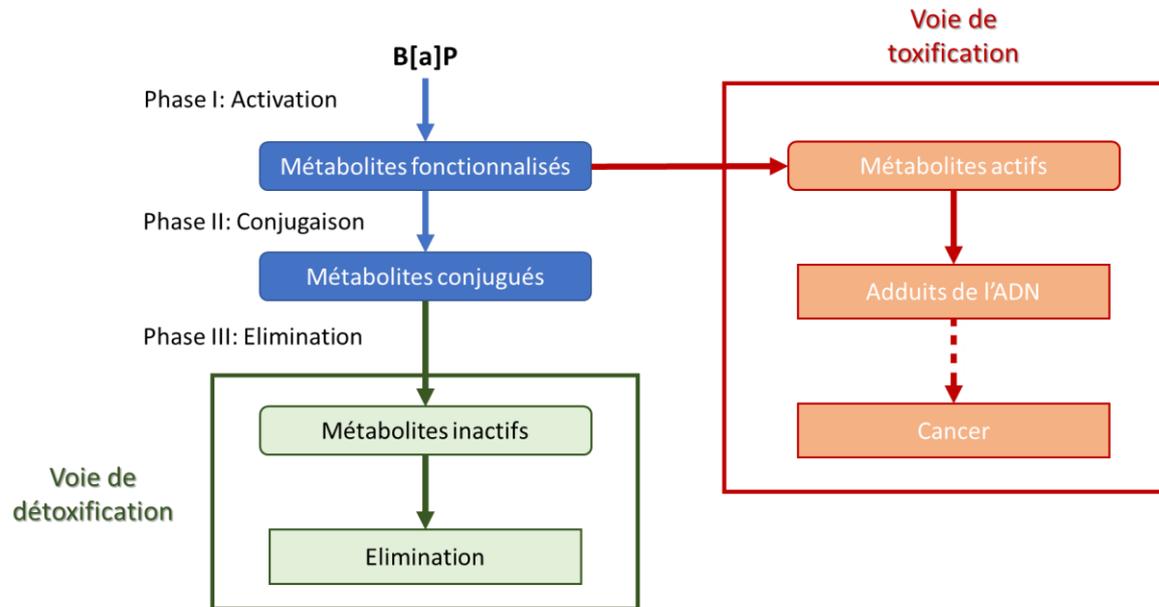


Figure 38 - Schéma simplifié de biotransformation du B[a]P

6.1.3.1. La Phase I d'activation du B[a]P

La phase de biotransformation aboutit à la formation d'un grand nombre de métabolites suite à deux réactions d'oxydation. La première oxydation va conduire à des métabolites dits primaires (époxyde, phénol et dihydrodiol), puis dans un second temps à des métabolites secondaires (quinone, diol-époxyde, tétraol) après la deuxième réaction d'oxydation. Ces métabolites traversent plus difficilement la membrane lipidique car ils sont plus hydrophiles mais peuvent être réactifs avec l'ADN et donc toxiques pour la cellule.

Cette phase I comprend quatre voies plus ou moins distinctes de métabolisation du B[a]P dans la cellule :

- La voie des diol-époxydes (en rouge sur la Figure 39)
- La voie du radical cation (en vert sur la Figure 39)
- La voie des o-quinones (en bleu sur la Figure 39)
- La voie des métabolites hydroxylés (en jaune sur la Figure 39)

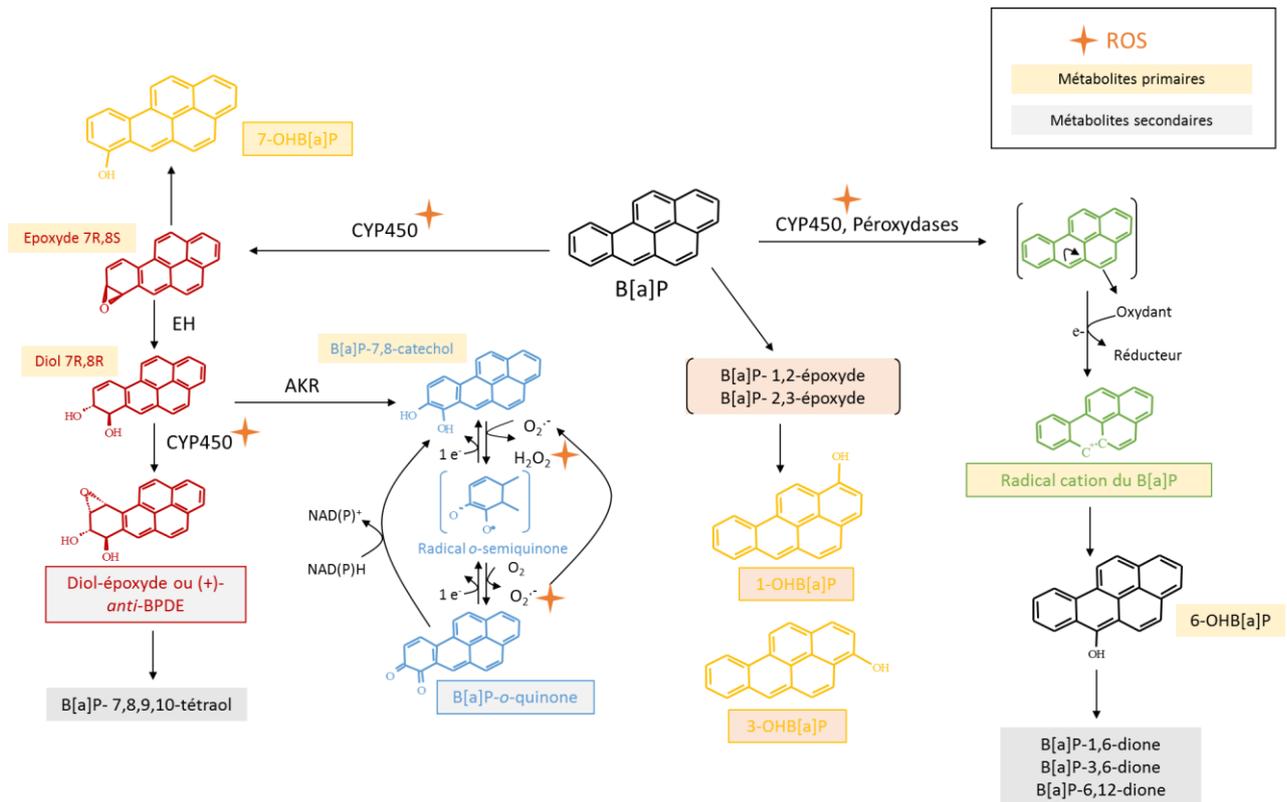


Figure 39 - Voie d'activation métabolique du B[a]P. Les ROS peuvent être générés via l'étape d'oxydation par l'enzyme AKR ou encore suite à l'activité catalytique des enzymes P450.

a) La voie des diol-époxydes

Cette voie résulte de l'action de deux types d'enzymes : les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450) et l'époxyde hydrolase (EH).

Les CYP450 sont des enzymes d'oxydation présentes dans divers tissus de l'organisme au niveau du réticulum endoplasmique des cellules. Elles sont notamment fortement exprimées dans le foie ainsi que dans d'autres organes comme les poumons, les intestins, les reins, la peau. Il existe diverses isoformes mais seulement trois sont principalement impliquées dans cette voie : CYP1A1 et 1B1 qui sont les plus efficaces ; puis de façon plus modeste CYP1A2 (Guengerich, 2008; Zanger and Schwab, 2013). CYP1A2 est localisée uniquement dans le foie contrairement aux deux autres CYP450 que l'on retrouve dans d'autres tissus comme le poumon.

L'EH est exprimée dans la plupart des tissus avec une quantité plus importante au niveau du foie que dans les poumons (Hassett et al., 1994).

Les CYP450 sont les premières à intervenir dans la réaction métabolique et vont catalyser des réactions de monooxygénation sur la double liaison entre les carbones C7 et C8 du B[a]P suivant un cycle

catalytique complexe qui nécessite la présence du cofacteur NAD(P)H et qui conduit à la formation de dihydro-époxydes instables. L'EH transforme ensuite l'époxyde en diol dont le composé majoritairement formé est le 7,8-dihydrodiol-B[a]P. Celui-ci est alors de nouveau pris en charge par les CYP450 qui génèrent le métabolite secondaire, BPDE. Nous avons vu précédemment que le BPDE existe sous la forme de 4 isomères mais que la forme (+)-anti-BPDE est celle qui est la plus retrouvée *in vivo*. Le BPDE peut s'hydrolyser pour former le 7,8,9,10-tetrahydroxy-tetrahydrobenzo[a]pyrène (7,8,9,10-tétraol-B[a]P) (Simpson et al., 2000).

b) La voie des o-quinones

Cette voie est commune à celle que nous venons de décrire jusqu'à l'action de l'EH formant le 7,8-dihydrodiol-B[a]P. Les dihydrodiol déhydrogénases appartenant à la famille des aldo-kéto réductases (AKR) vont transformer ce composé en un catéchol qui est très instable. Il va ensuite subir deux oxydations successives aboutissant à la formation d'une quinone : le 7,8-dione- B[a]P. Ces cycles d'oxydoréduction sont dépendants du substrat cellulaire NAD(P)H.

Il y a une compétition qui se met en place à partir du 7,8-dihydrodiol-B[a]P entre ces deux voies et notamment entre les CYP450 et AKR. La quantité des métabolites produits par ces voies dépend du niveau d'expression de ces enzymes ainsi que de l'état redox de la cellule (Jiang et al., 2005; Quinn and Penning, 2008; Zhang et al., 2012).

c) La voie du radical cation

On retrouve une nouvelle fois l'implication des CYP450 dans cette dernière voie d'activation. Ils vont conduire à la formation d'un radical cation généré par une réaction d'oxydation sur le carbone le plus électrophile soit le carbone C6 du B[a]P. Son hydrolyse spontanée conduit à la formation du phénol 6-OHB[a]P qui peut être oxydé ou métabolisé par les CYP450 en trois types de quinones (1,6- ; 3,6- ; 6,12-dione-B[a]P).

d) la voie des métabolites hydroxylés

Le B[a]P peut subir une monooxygénation conduisant à des époxydes dont le devenir dépend de leur stabilité. Les plus stables comme le 7,8-époxyde-B[a]P seront pris en charge par les EH pour être hydratés en 7,8-dihydrodiol-B[a]P. Tandis que les plus instables comme le 1,2-époxyde-B[a]P ou le 2,3-

époxyde-B[a]P seront spontanément hydrolysés en dérivés phénoliques respectivement : 1-hydroxyB[a]P (1-OHB[a]P) et 3-OHB[a]P.

6.1.3.2. Les Phases II et III

La phase I d'activation entraîne la formation de nombreux métabolites de différents types (diol-époxyde, quinone, phénol, ...) par les différentes voies que nous venons de décrire. La phase II est effectuée par différentes transférases qui vont ajouter des groupements hydrophiles aux métabolites fonctionnalisés. Les différentes transférases sont les suivantes :

- Les glutathion-S-transférases (GST) qui vont conjuguer le glutathion (GSH) sur les diols épodydes, les quinones et les dihydrodiols. Ces métabolites conjugués seront ensuite dégradés en acides mercapturiques.
- Les UDP-glucuronyltransférases (UGT) qui vont ajouter un acide glucuronique sur les phénols, les quinones, les hydroquinones et les catéchols.
- Les Sulfotransférases (SULT) qui vont conjuguer un groupement sulfate sur les catéchols et les phénols.

Un autre type d'enzyme, la NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 (NQO1), peut également prendre en charge les quinones pour les catalyser en hydroquinones qui seront ensuite conjuguées par UGT ou SULT.

La phase III va permettre l'élimination de l'organisme des métabolites conjugués formés par la phase II. Pour cela, des protéines transmembranaires d'efflux de la famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) vont prendre en charge ces métabolites hydrosolubles, trop hydrophiles pour traverser passivement la membrane cellulaire, pour les transporter au travers des membranes biologiques. Ces transporteurs utilisent l'ATP (Figure 40). Par exemple, parmi ces transporteurs, les protéines MRP1 et 2 (MultiDrug Resistance Proteins) éliminent les métabolites conjugués au GSH comme le BPDE-GSH (Srivastava et al., 2002). Les métabolites conjugués sont alors de nouveau distribués dans tout l'organisme pour être éliminés en grande majorité par voie fécale mais aussi par les urines et la bile.

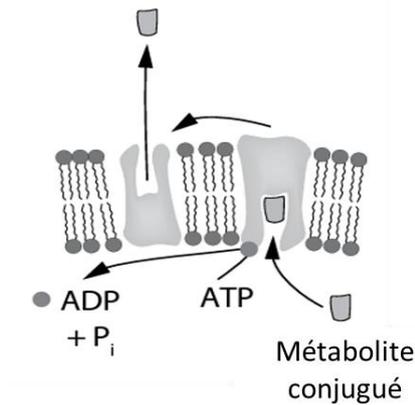


Figure 40 - Schéma d'un transporteur ABC utilisant l'ATP

6.1.3.3. L'induction des gènes du métabolisme par le B[a]P

La présence de B[a]P dans le cytoplasme va entraîner une induction spécifique de gènes codants pour les enzymes de phase I et II via la liaison au récepteur Ah (AhR : Aryl hydrocarbon Receptor). Ce récepteur est un régulateur de la transcription très spécifique des HAPs qui est retrouvé de manière ubiquitaire dans le cytoplasme des cellules. Chez l'Homme, on le retrouve à des niveaux variables selon les tissus et est notamment présent en forte quantité dans les poumons, les reins, le foie ou le thymus (Puga et al., 2009).

Dans le cytoplasme, le récepteur AhR est présent sous la forme d'un complexe avec deux protéines chaperonnes Hsp90 (Heat shock protein 90) et AIP (AhR interacting protein). Hsp90 interagit également avec p23 et XAP2. L'association de ces différentes protéines confère à AhR une reconnaissance spécifique et optimale vis-à-vis du ligand B[a]P. La fixation du B[a]P sur AhR entraîne la dissociation de AhR des autres protéines Hsp90 et AIP. AhR-B[a]P est ensuite transloqué dans le noyau pour se fixer à une protéine nucléaire Arnt (AhR translocator). Arnt est un facteur de transcription qui reconnaît des séquences XRE (Xenobiotic Response Elements) de l'ADN. La fixation de AhR-Arnt entraîne l'activation de la transcription de gènes cibles impliqués dans le métabolisme des enzymes de phase I (CYP1A1, 1A2, 1B1 et AKR) et de phase II (GST, UGT, NQO1, ...) ainsi que des protéines d'efflux MRP (Figure 41). Cette activation n'est pas uniquement médiée par le B[a]P mais l'est également par certains de ses métabolites comme les quinones.

L'induction des gènes de phase II par AhR peut également être indirecte via l'activation du gène Nrf2 (NF-E2 related factor 2) qui est impliqué dans la protection contre le stress oxydant. Nrf2 est un gène cible d'AhR et peut être également activé indirectement par les ROS générées lors de la métabolisation.

Ce facteur de transcription reconnaît des éléments de réponse aux antioxydants ARE dans certains gènes de phase II (NQO1, GST et EH).

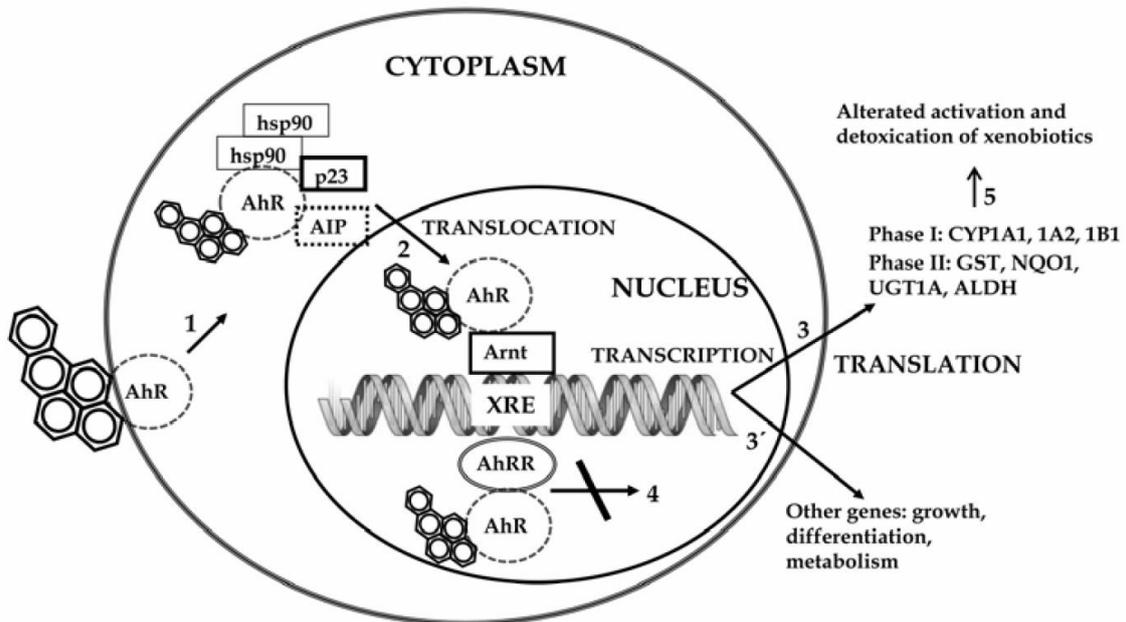


Figure 41 - Schéma simplifié de l'interaction du B[a]P avec le récepteur AhR (Arenas-Huertero et al., 2011)

6.1.3.4. Toxicité des métabolites activés

Nous venons de voir que la métabolisation du B[a]P est complexe : la phase I produit différents métabolites qui, s'ils ne sont pas rapidement hydrolysés ou conjugués, peuvent réagir avec des macromolécules comme les protéines, l'ARN ou l'ADN et être source de toxicité pour la cellule. La phase II vient bloquer la toxicité de ces métabolites en les conjuguant et en permettant leur élimination lors de la dernière phase III.

La toxicité du B[a]P provient donc de la phase I lors de la formation des métabolites fonctionnalisés par les différentes voies.

La production de BPDE via la voie des diol-époxydes va entraîner la formation de liaisons covalentes avec l'ADN. La formation de l'époxyde en position 9 et 10 entraîne une gêne stérique qui empêche la conjugaison de ce métabolite. Nous avons vu au cours de la partie sur les lésions que quatre adduits sont formés sur les bases A, C et G de l'ADN. Cependant, l'adduit majoritairement formé *in vivo* est le BPDE-N²-G (Geacintov, 1984; Jeffrey et al., 1977).

Les voies du radical-cation et o-quinone peuvent également générer des adduits instables qui conduisent à la formation de sites abasiques (IARC, 2010; McCoull et al., 1999).

Cependant, la toxicité de la voie o-quinone provient majoritairement de la formation de ROS lors de l'étape d'oxydation par AKR qui entraîne un cycle de production de ROS (H_2O_2 et $O_2^{\cdot -}$) (Zhang et al., 2012). Ces ROS entraînent la formation de lésions oxydatives de type 8oxoG ainsi que des cassures simple et double brin. Cette voie est également responsable d'une augmentation de la peroxydation lipidique des membranes (Kim et al., 2000).

Par ailleurs, les ROS peuvent également être générées par l'activité catalytique des enzymes CYP450 (Xue and Warshawsky, 2005).

6.1.4. La surveillance biologique de l'exposition au B[a]P

Afin d'évaluer les risques sanitaires, il était important de présenter les différentes connaissances du métabolisme du B[a]P décrit précédemment puisque le développement de biomarqueurs est principalement basé sur le dosage de ces métabolites. Toutefois, les nombreux métabolites formés rendent le développement de BM difficile. Aujourd'hui aucun BM n'est encore utilisé en routine dans le cadre de la biosurveillance mais de nombreuses études visent à en caractériser.

Afin d'évaluer l'exposition biologique d'un individu, il n'est pas possible de doser le B[a]P dans les urines car les concentrations y sont trop faibles. De plus, la mesure du B[a]P est trop éloignée du risque sanitaire puisqu'elle correspond à la quantité qui n'a pas réagi avec l'organisme (Campo et al., 2007).

Le développement de BM s'est donc orienté vers le dosage des métabolites qui constitue une meilleure alternative.

Nous allons décrire les différents BM qui sont développés selon leur type comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre :

Les BM d'exposition :

- BM d'exposition de dose interne du B[a]P

Le dosage du 7,8,9,10-tétraol-B[a]P qui correspond au métabolite ultime de la voie toxique des diols époxydes fait de lui un BM attrayant. Néanmoins, le dosage nécessite des étapes pré-analytiques complexes ainsi que des équipements lourds disponibles dans peu de laboratoires de recherche afin

d'obtenir une sensibilité suffisante. Jusqu'à maintenant, seuls les salariés travaillant en cokeries et donc fortement exposés aux HAPs ont présenté des concentrations très élevées de ce métabolite urinaire contrairement aux témoins (Simpson et al., 2000).

Les métabolites issus de la détoxification du B[a]P comme les phénols semblent être les métabolites les mieux adaptés à la biosurveillance car ils sont produits en plus grande quantité lors de la métabolisation du B[a]P. Parmi les phénols, le 3-OHB[a]P est le plus représentatif d'une exposition au B[a]P. Il peut être détecté par HPLC-MS/MS mais nécessite une méthode très sensible car il est retrouvé en quantité faible dans l'urine (Barbeau et al., 2011; Forster et al., 2008). Ce BM nécessite donc des améliorations au niveau pré analytique et analytique pour qu'il puisse être utilisé en biosurveillance.

- BM d'exposition de dose efficace du B[a]P

Cette partie va concerner le dosage des adduits puisque ce type de BM correspond à la substance exogène qui va entrer en contact avec une cible de l'organisme comme l'ADN ou les protéines.

Le dosage des adduits à l'ADN comme le BPDE-N²-dG peut être effectué par HPLC-MS/MS sans exiger d'étape pré analytique difficile à effectuer. Comme nous l'avons vu précédemment, cette méthode à l'avantage d'être d'une grande spécificité mais sa sensibilité n'est pas toujours suffisante pour le dosage de ces adduits chez l'Homme. De plus, les échantillons doivent être des organes cibles donc au minimum un prélèvement sanguin ce qui est plus invasif que les échantillons urinaires. Ce BM reste encore du domaine de la recherche.

Le dosage des adduits aux protéines comme l'albumine ou l'hémoglobine peut être effectué par des méthodes d'immunologiques (ELISA). Cependant, cette méthode manque de spécificité.

Les BM que nous venons de présenter sont intéressants car ils sont plus proches du risque sanitaire que le dosage du B[a]P. Cependant, toutes les techniques de dosage sont complexes et coûteuses et restent donc encore du domaine de la recherche. Pour terminer, il y a un manque de connaissances scientifiques qui ne permet pas de les utiliser en tant que prédicteurs du risque d'apparition de cancers.

Les BM d'effet :

Pour rappel, dans ce cas, les BM d'effet vont témoigner d'une interaction entre le B[a]P et la cellule reflétant un changement biologique.

La mesure des cassures simple et double brin par le test des comètes peut représenter un BM d'effet mais celui-ci ne va pas être spécifique d'une exposition au B[a]P et il existe une forte variabilité intra et interindividuelle. De plus, comme nous l'avons vu, cette méthode doit faire face à de fortes variations inter et intra laboratoires.

Les BM d'effet peuvent également être représentés par la recherche de dommages chromosomiques comme par exemple, les aberrations chromosomiques au niveau des lymphocytes circulants. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence avec l'utilisation de cette méthode sur des sujets exposés au B[a]P comparés à des témoins (Brandt and Watson, 2003).

Les BM d'effet sont utilisés uniquement en recherche car leur interprétation est difficile due à leur manque de spécificité. En revanche, il présente un intérêt majeur dans la validation d'IBE.

6.2. Un exemple d'agent génotoxique de l'industrie chimique : le Chlorure de Vinyle

6.2.1. Généralités sur le chlorure de vinyle

Le chlorure de vinyle (VC) est un composé chimique de synthèse qui se présente sous la forme d'un gaz incolore et inodore à faible concentration. Ce gaz extrêmement volatile est principalement utilisé comme monomère dans la fabrication d'une des matières plastiques les plus employées dans le monde actuellement, le polychlorure de vinyle communément appelé PVC (Poly Vinyl Chloride). Le VC est un hydrocarbure aliphatique qui a été synthétisé pour la première fois au 19^{ème} siècle, cette molécule n'existe donc pas dans la nature (Figure 42).

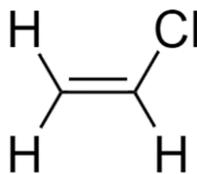


Figure 42 - Structure chimique du chlorure de vinyle

L'effet cancérigène du VC a été mis en évidence dans les années 80 chez des travailleurs fortement exposés dans l'industrie du PVC. L'exposition au VC est à l'origine de plusieurs types de cancers chez l'Homme comme les angiocarcinomes hépatiques, les carcinomes hépatocellulaires et les sarcomes des tissus mous (IARC, 2008). D'autres types de cancers (tumeur du cerveau, du poumon et du système

hématolymphopoiétique) ont été décrits chez les travailleurs exposés au VC, mais l'association entre ces cancers et le VC n'est à ce jour pas établie. De plus, l'angiocarcinome hépatique est le seul type de cancer qui est reconnu comme maladie professionnelle par le Régime général de Sécurité Sociale pour les travailleurs dans les ateliers de polymérisation. Le VC est classé dans le groupe 1 par le CIRC depuis 1987 et en catégorie 1A (agent cancérigène) par l'UE depuis 1993.

6.2.2. Source et voies d'exposition au VC

Le VC est majoritairement utilisé dans l'industrie du PVC mais il existe d'autres sources d'exposition que nous allons détailler selon le type d'exposition professionnelle ou environnementale.

Concernant les expositions professionnelles, il est estimé que 3 550 à 7 100 hommes et 1 450 à 2 900 femmes sont exposés au VC dans les usines en Europe (Cherrie et al., 2011). Dans le milieu professionnel, le VC est également utilisé dans les synthèses organiques et comme réfrigérant dans l'industrie du caoutchouc, du papier, du verre, de l'automobile ou des câbles. Depuis que le risque cancérigène du VC a été mis en évidence, des règles de prévention plus strictes ont été mises en place. En France, une valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) contraignante dans l'air des locaux de travail a été établie à 1 ppm soit 2.59 mg/m³ pour 8h. Cette valeur est inscrite dans le code du travail et est entrée en vigueur en 1993. L'UE a également fixé une limite mais celle-ci est plus élevée à 3 ppm. De plus, les entreprises ont désormais des obligations d'épuration des rejets atmosphériques et liquides. Du fait de la mise en place de la réglementation, l'exposition professionnelle au VC aurait quasiment disparu en France depuis les années 1970 (InVS, 2010).

Au niveau des expositions environnementales, la population générale est très peu exposée au VC (IARC, 2008) notamment depuis que son emploi comme agent propulseur d'aérosols (bombes insecticides et de peintures, laques en coiffure, ...) ou dans des aérosols en contenant (médicaments, cosmétiques) a été interdit en France en 1976. Cependant, on retrouve tout de même du VC dans les rejets industriels, la fumée des cigarettes (1.3 à 16 ng/cigarette) et cigares (14 à 27 ng/cigare) et l'eau de distribution (IARC, 2008). En effet, un rapport récent de l'InVS a fait part de ses préoccupations concernant les teneurs élevées en VC dans l'eau qui pourrait être à l'origine d'un relargage de VC provenant de canalisations en PVC posées avant 1980 (InVS, 2010).

La principale voie d'exposition est respiratoire par inhalation du gaz. La distribution du VC est rapide et étendue puisque 30 à 40 % du VC est absorbé dans les premières minutes d'inhalation et son absorption est ensuite proche de 100%. L'exposition peut également avoir lieu par la voie cutanée mais celle-ci reste faible.

Son accumulation dans l'organisme est limitée par un métabolisme et une excrétion rapide (Bolt et al., 1977). En effet, le VC est un xénobiotique qui va être pris en charge par la voie des xénobiotiques tout comme le B[a]P. Le VC se distribue essentiellement dans le foie où il est métabolisé par les enzymes du cytochrome P450. A faibles concentrations en VC, le CYP2E1 est responsable de l'essentiel de la métabolisation du chlorure de vinyle (Guengerich et al., 1991). A fortes concentrations, la métabolisation du VC provoque une destruction des enzymes P450 par les métabolites formées (Guengerich and Strickland, 1977). Les CYP450 oxydent le VC en un intermédiaire réactif instable, l'oxyde de 2-chloroéthylène (CEO) qui peut également, spontanément ou sous l'action d'une époxyde hydrolase (EH), se transformer en chloroacétaldéhyde (CAA) (Figure 43). Ce sont ces deux réactifs qui sont responsables de la toxicité du VC car ils ont la capacité de se fixer aux macromolécules (ADN, ARN et protéines) (Zielinski and Hergenbahn, 2001). En effet, par exemple, le CAA conduit à la formation de lésions Ethénobases. Ces deux composés sont ensuite principalement détoxifiés par conjugaison au glutathion via la GST (Laib, 1986) qui entraîne la formation de trois métabolites : l'acide thiodiglycolique, le 5-formylméthylcystéine et le N-acétyl-(2-hydroxyéthyl)cystéine. Ces métabolites sont excrétés par voie urinaire ; lorsque l'exposition au VC est très importante et que les mécanismes de métabolisation sont saturés, alors l'élimination du VC non métabolisé s'effectue également par l'air expiré.

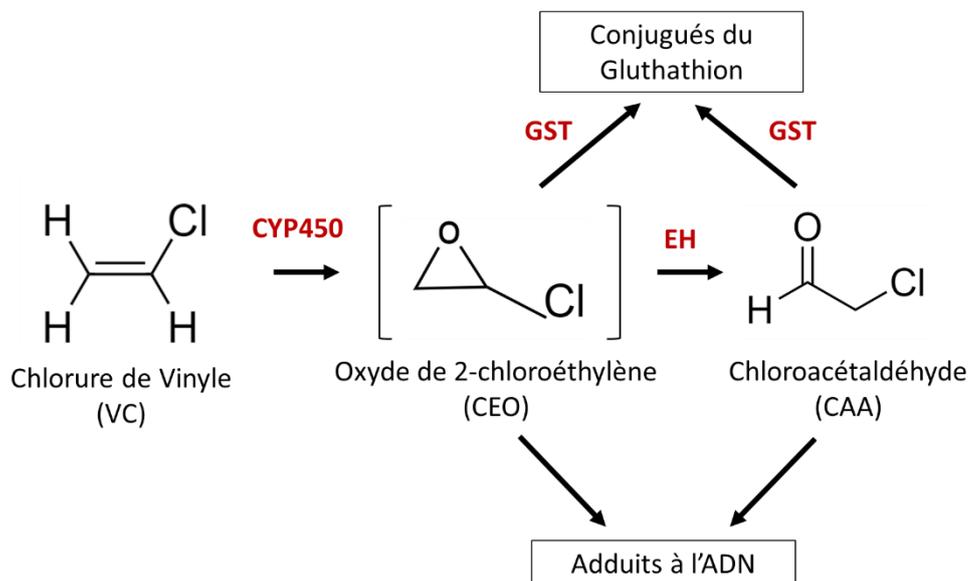


Figure 43 - Schéma simplifié de la métabolisation du chlorure de vinyle

6.2.3. La surveillance biologique de l'exposition au VC

La surveillance biologique de l'exposition au VC utilise la même stratégie que pour celle du B[a]P c'est-à-dire qu'elle cherche à développer des BM afin de pouvoir évaluer le risque sanitaire.

BM d'exposition :

Parmi les trois métabolites excrétés dans l'urine, l'acide thiodiglycolique est le métabolite majeur du VC (ATSDR, 2005). Il a été démontré que le taux urinaire d'acide triodiglycolique est corrélé avec la concentration de VC de l'air au-delà de 5 ppm. Ainsi, en France, son intérêt dans la surveillance médicale de l'exposition est très limité puisque la valeur limite d'exposition professionnelle est de 1 ppm (Cheng et al., 2001). Cependant, des indices biologiques d'exposition propres au VC ont été proposés. Par exemple, pour une valeur dans l'air de 1 ppm, la quantité d'acide thiodiglycolique dans les urines ne doit pas dépasser 1,8 mg/24 heures (Forlini et al., 2012). Il est également important de noter que la concentration urinaire de ce métabolite est un indicateur non spécifique. Ce métabolite est un BM d'exposition récente donc le prélèvement urinaire doit avoir lieu tout de suite après l'exposition (Laplanche et al., 1992).

BM d'effet :

A ce jour, il n'existe pas de BM d'effet spécifique à une exposition au VC. Les seuls marqueurs qui sont employés concernent le dépistage précoce des lésions hépatiques secondaires suite à l'exposition au VC. En effet, par exemple, l'activité gamma-glutamine-transférase (GGT) est considérée comme le test le plus utile pour détecter les anomalies hépatiques. D'autres marqueurs comme les alanine aminotransférases (ALAT) ou les phosphatases alcalines sont également utilisés comme indicateurs mais ne sont pas spécifiques d'une atteinte hépatique due au VC (Forlini et al., 2012).

Notre objectif initial était de s'intéresser à la réponse cellulaire du VC et son métabolite, le CAA, afin d'étudier l'impact au niveau des voies de réparation avec ou sans étape de métabolisation. Cependant, comme nous l'avons déjà indiqué l'utilisation du VC n'est pas compatible avec les installations de nos laboratoires. Nous avons dû trouver une alternative au VC et notre choix s'est porté vers l'IFO dont nous allons voir le métabolisme plus en détail justifiant son utilisation.

6.2.4. Métabolisme et mécanisme d'action de l'Ifosfamide

6.2.4.1. Généralités sur l'IFO

L'IFO est une des molécules les plus connues et les plus utilisées appartenant à la famille des oxazaphosphorines. Cette famille regroupe des agents ayant une activité antinéoplasique (destinée à bloquer la prolifération des cellules cancéreuses) et immuno modulatrice. Depuis la fin des années 1970, l'IFO est utilisé dans de nombreux protocoles de chimiothérapies chez les adultes et les enfants atteints de diverses formes de cancers (sarcomes des tissus mous, sarcomes ostéogéniques, lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens, cancers bronchiques, cancers du col utérin métastatiques, cancers du sein métastatiques). Il est généralement utilisé en association avec d'autres agents anticancéreux. En France, deux formes pharmaceutiques d'IFO sont commercialisées : Holoxan® et Ifosfamide EG®.

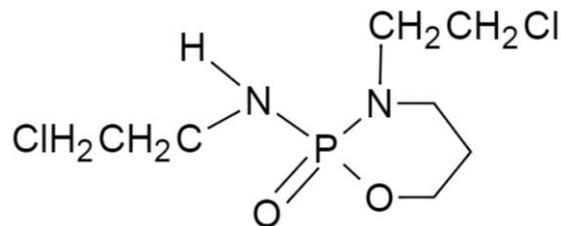


Figure 44 - Structure chimique de l'Ifosfamide

L'IFO est une « prodrug » c'est-à-dire que l'agent administré nécessite une étape de métabolisation par l'organisme pour conduire à la substance active. L'IFO va donc utiliser la voie des xénobiotiques afin de former son métabolite actif, une moutarde azotée, responsable de l'activité anticancéreuse due à sa capacité d'alkylation de l'ADN.

6.2.4.2. Phase I de biotransformation

Cette phase implique les enzymes CYP450 et comporte deux voies distinctes : la 4-hydroxylation (activation) et la N-déchloroéthylation (désactivation) (Figure 45).

En ce qui concerne la voie d'activation, l'IFO est hydroxylé au niveau du carbone en position 4 conduisant à un intermédiaire instable la 4-hydroxyifosfamide (4-OHIFO). Cette réaction est majoritairement catalysée par les CYP3A4 et 2B6 mais également dans des contributions plus faibles par les CYP3A5, 2A6, 2C8, 2C9 et 2C19 (Chugh et al., 2007; Huang et al., 2000; Lowenberg et al., 2014;

Zhang et al., 2005). La 4-OHIFO se trouve en équilibre avec l'aldoIFO qui se décompose spontanément par β -élimination en Ifosforamide moutarde (IPM), métabolite alkylant actif, avec libération équimolaire de l'acroléine, un aldéhyde hautement réactif. L'aldoIFO peut être également catalysée par une aldéhyde déshydrogénase (ALDH) en carboxyIFO. De plus, la 4-OHIFO peut être métabolisée en 4-kétoIFO par une alcool déshydrogénase (ADH). Les deux métabolites produits par l'ADH et l'ALDH sont inactifs (Zhang et al., 2006).

La voie de N-déchloroéthylation conduit à l'inactivation de l'IFO par enlèvement d'un des deux groupes chloroéthyle pour former la 2 ou 3-déchloroéthylIFO (métabolites non toxiques) avec production équimolaire de CAA. Cette réaction est notamment catalysée par les CYP3A4, 3A5 et 2B6 (Chugh et al., 2007; Huang et al., 2000).

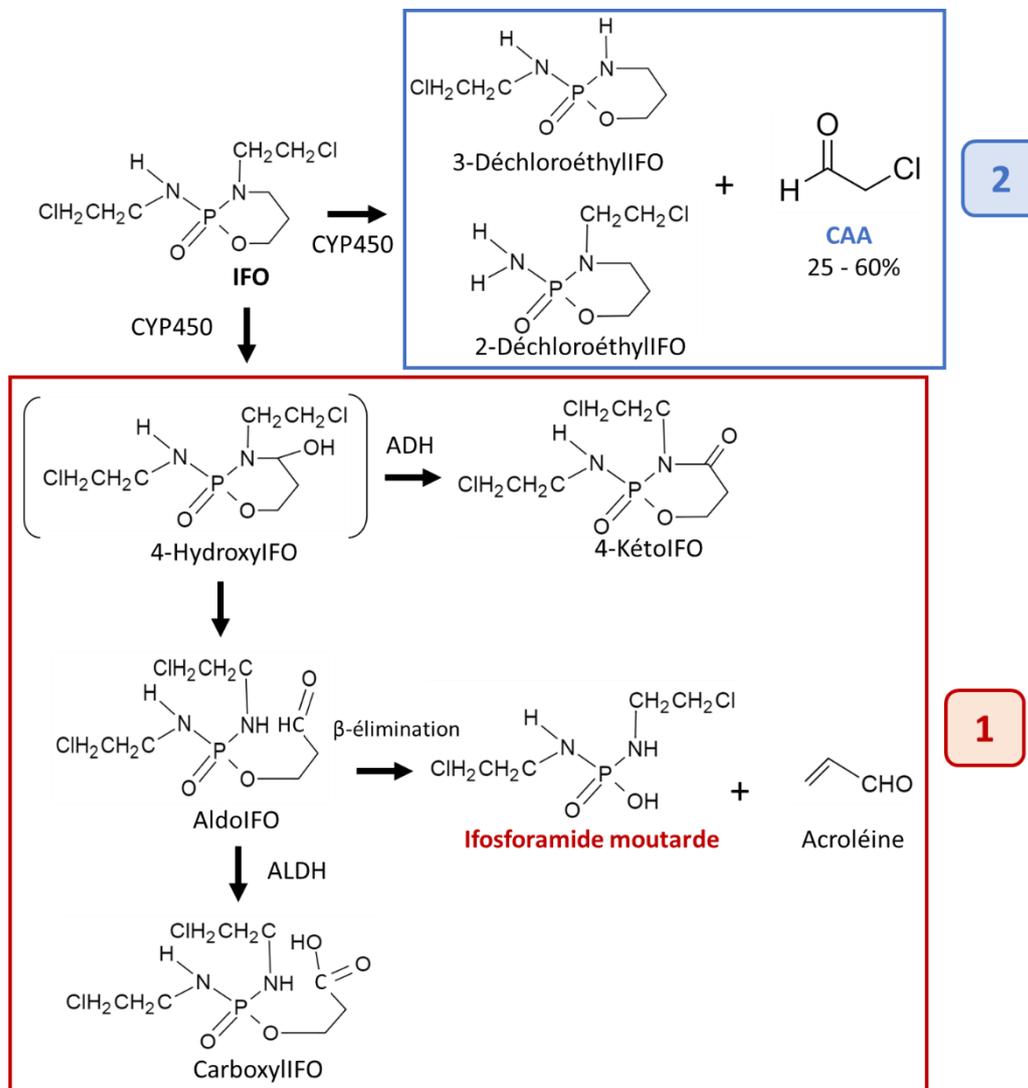


Figure 45 - Schéma simplifié du métabolisme hépatique de l'IFO : 1) La voie d'activation : 4-hydroxylation 2) La voie de désactivation : N-déchloroéthylation.

Cette phase de fonctionnalisation de l'IFO a principalement lieu au niveau du foie mais peut également avoir lieu au niveau d'autres organes comme les reins, les poumons, les intestins, ...

6.2.4.3. Les phases II et III

Les différents métabolites formés par les enzymes de phase I vont ensuite être pris en charge majoritairement par la transférase GST qui va conduire à des métabolites conjugués facilitant leur élimination. Par exemple, la GST va conjuguer le GSH sur l'IPM, l'acroléine ou encore la 4-OHIFO.

Une fois que ces métabolites conjugués ont été formés, la phase III va permettre leur élimination hors de l'organisme par les protéines d'efflux MRP avec notamment MRP1 et 2 (Frei et al., 1993).

L'IFO est ensuite principalement excrété dans l'urine (70%) et dans une moindre mesure, par les voies fécales et la bile (Boddy and Yule, 2000). Cependant, 10 à 20% d'IFO sous forme inchangée est excrété dans les urines (Zhang et al., 2006).

6.2.4.4. L'induction des gènes du métabolisme par l'IFO

Le mécanisme d'auto-induction de la métabolisation de l'IFO est encore mal connu. Cependant, deux récepteurs ont pu être identifiés comme étant probablement impliqués dans cette auto-induction. Tout d'abord, l'IFO induit sa biotransformation en activant le récepteur pregnane X (PXR). En effet, dans les hépatocytes, l'IFO va se lier au récepteur PXR entraînant la formation d'un complexe avec d'autres protéines fonctionnelles du cytosol. Ce complexe est ensuite transloqué dans le noyau pour se fixer à des séquences de l'ADN et activer la transcription de certaines enzymes de phase I comme CYP3A4 et 2B6 (Harmsen et al., 2009) (Figure 46). Il a été montré *in vitro* que l'augmentation d'ARNm CYP2B6 est plus importante que pour CYP3A4 (Wang et al., 2011). Un autre récepteur semble également impliqué dans cette auto-induction : le récepteur constitutif des androstanes (CAR) qui appartient à une famille de récepteur à ce jour orphelin et qui possède des fonctions similaires au récepteur PXR (Wang et al., 2011).

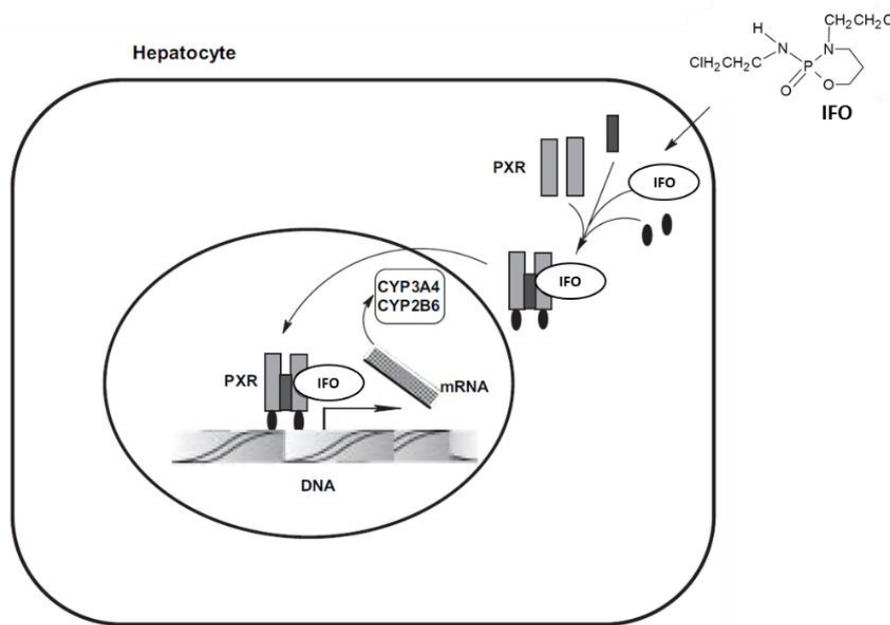


Figure 46 - Schéma simplifié de l'induction des gènes par l'IFO (adaptée de Zhang et al., 2005)

6.2.4.5. Toxicité des métabolites activés

L'administration d'IFO peut être accompagnée d'effets toxiques aigus. En effet, le métabolisme de l'IFO peut être associé à une urotoxicité, une néphrotoxicité, une neurotoxicité ainsi qu'à une toxicité cardiaque.

Le CAA serait responsable de la neurotoxicité et néphrotoxicité tandis que l'acroléine serait responsable de l'urotoxicité (Knouzy et al., 2010; Zhang et al., 2005). Nous allons voir plus en détail comment ces deux molécules engendrent les différents types de toxicité observée.

Il est estimé que 25 à 60% de la dose administrée d'IFO est métabolisée en CAA par N-déchloroéthylation (Börner et al., 2000; Lowenberg et al., 2014). Cette production plus ou moins importante du CAA peut être expliquée par des variations interindividuelles importantes du métabolisme de l'IFO. Le mode d'action du CAA n'est pas encore totalement élucidé mais il a été montré qu'il induit plusieurs changements au niveau cellulaire :

- il supprime l'activation du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale amenant à une déplétion en GSH et en ATP ce qui peut entraîner la mort des cellules (Brüggemann et al., 2006; Knouzy et al., 2010). Nous avons vu que la GSH est un acteur dans la voie de xénobiotique pour la détoxification mais il joue également des rôles importants dans d'autres fonctions biologiques comme dans la protection du stress oxydatif et la maintenance du potentiel redox.

- il induit un processus de peroxydation lipidique conduisant entre autres à la formation de dommages à l'ADN comme les Ethénobases (Sood and O'Brien, 1993).
- il est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et de s'accumuler dans le système nerveux central (SNC) (Cheung et al., 2011; MacAllister et al., 2013; Park et al., 2005). Le CAA est également capable de s'accumuler dans le cortex rénal (Nissim et al., 2006).

Tous ces éléments impliqueraient que le CAA soit responsable de la toxicité rénale et neurologique observées chez certains patients traités à l'IFO.

L'acroléine est un métabolite réactif dû à la présence de groupements alkyles. Son entrée dans les cellules uroépithéliales active des gènes du stress oxydant conduisant à une production de peroxyde d'azote (ONOO⁻) qui entraîne des dommages à l'ADN (comme des CSB), aux lipides et aux protéines (MacAllister et al., 2013).

Un dernier métabolite important dans la métabolisation de l'IFO est l'IPM puisque celui-ci est considéré comme le métabolite actif responsable de l'activité anti-cancéreuse de cet agent. C'est un agent alkylant capable d'ajouter des groupes alkyles aux groupements nucléophiles de l'ADN formant des pontages inter ou intra-brin conduisant à une mort cellulaire par apoptose, une modulation du cycle cellulaire et d'autres effets antiprolifératifs (O'Connor et al., 1991). L'IPM est tout d'abord transloqué dans le noyau par transports actifs ou passifs où il est ensuite converti en carbocation. Celui-ci va réagir avec l'atome N7 de la Guanine pour former une liaison covalente, puis, par réaction avec une deuxième base G sur le brin opposé ou le même brin, cela conduit à un pontage inter ou intra-brin (Figure 47). C'est la formation de ces pontages qui serait responsable de l'effet anticancéreux de cette prodrogue car ils bloquent la séparation des deux brins de l'ADN lors de la réplication de l'ADN et entraîneraient donc la mort cellulaire. De plus, rapidement après le traitement à l'IFO, on observe une activation des caspases 3, 8 et 9 tandis que l'expression de Bcl-2 (inhibiteur de caspases) diminue entraînant une mort cellulaire par apoptose (Sayed-Ahmed et al., 2012).

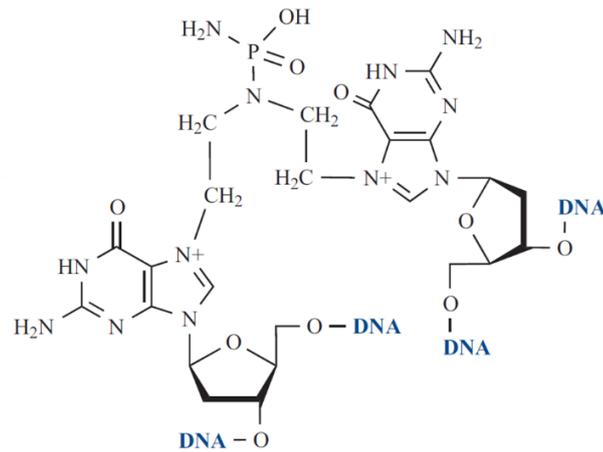


Figure 47 - Structure chimique d'un pontage inter ou intra-brin par réaction de l'IPM sur les bases G de l'ADN.

Si nous comparons le mécanisme de métabolisation de l'IFO au VC, nous remarquons que celui-ci est plus complexe puisqu'il conduit à un nombre plus important de métabolites réagissant avec l'ADN. Cependant, cet agent anti-cancéreux conduit à la formation d'une part importante de CAA capable de former des lésions Ethénobases. De plus, parmi la famille des oxazaphosphorines, l'IFO est celui qui conduit à la production la plus importante de CAA. Cette molécule s'est donc révélée comme un choix attrayant dans le cadre de notre étude où nous cherchions un composé capable d'être métabolisé pour former du CAA.

Cette dernière partie nous a permis de voir l'intérêt de développer des BM pour les agents que nous avons sélectionnés puisqu'aucun BM n'a à ce jour été validé. Par ailleurs, cela nous a permis d'examiner les différentes caractéristiques des agents pro et génotoxiques utilisés pour cette étude.

Nous allons maintenant exposer les différents objectifs de cette étude et décrire ensuite les deux outils que nous avons choisis pour sa réalisation.

OBJECTIFS

Objectifs

Au cours de ce premier chapitre, nous avons pu constater que l'exposition environnementale ou professionnelle au B[a]P et au chlorure de vinyle est incontestablement reconnue comme une cause de survenue de cancers chez l'Homme. En effet, ces agents génotoxiques ont la capacité d'altérer de manière directe le matériel génétique en formant différents types de lésions. Selon leur nature, ces lésions sont prises en charge par des voies de réparation spécifiques, elles-mêmes régulées par le mécanisme complexe de la DDR. Il apparaît donc primordial d'évaluer l'exposition des individus à ces agents afin de prévenir et d'estimer les risques pour la santé des personnes exposées. La biosurveillance cherche à établir des indicateurs biologiques de l'exposition notamment à travers le développement de biomarqueurs. Bien qu'à ce jour ces agents soient très étudiés et que leur voie de métabolisation soit bien connue, il n'existe pas de biomarqueur validé. Le développement de biomarqueurs reste aujourd'hui du domaine de la recherche et les méthodes actuelles utilisent majoritairement le dosage par spectrométrie de masse, très coûteux. Par ailleurs, les étapes pré analytiques sont souvent complexes et manquent de spécificité. Il est donc important d'identifier de nouveaux outils qui permettront d'élaborer ces biomarqueurs. Parmi ces outils, nous avons vu que de récentes méthodes permettent de mesurer directement les activités enzymatiques de réparation de l'ADN. Elles permettent également d'apprécier la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer l'impact de ces deux agents progénotoxiques (B[a]P et IFO) et de leurs métabolites les plus mutagènes (BPDE et CAA) sur la formation des dommages et la réparation de l'ADN.

Pour cela, nous avons exploré la réponse cellulaire à ces composés sur deux lignées cellulaires humaines. La première lignée A549 est issue d'un adénocarcinome de poumon. Or, cet organe est l'une des principales cibles des agents génotoxiques que nous avons sélectionné. Cette lignée constitue donc un modèle d'exposition approprié pour ce projet de recherche. La seconde, HepG2, est une lignée d'hépatocytes. Elle présente un intérêt majeur pour l'évaluation des agents progénotoxiques grâce à ses fortes capacités de métabolisation. Deux méthodes ont été utilisées :

- Une méthode de référence : le dosage HPLC-MS/MS. Cette technique de choix est couramment utilisée pour les études de suivi de l'exposition chez l'Homme. Elle permet de quantifier l'apparition des lésions formées au cours de l'exposition et nous apporte également des informations sur la réparation de ces dommages au cours du temps.

- Une nouvelle méthode reposant sur un test de caractérisation des activités enzymatiques de réparation de l'ADN, le test ExSy-SPOT développé par la société LXRepair.

Dans un premier temps, le test de réparation a dû être adapté à ce que nous souhaitons observer. Nous avons enrichi ce test en préparant de nouveaux substrats plasmidiques contenant des lésions spécifiquement liées aux agents génotoxiques auxquels nous nous intéressons ici. Ceci nous a permis d'obtenir une biopuce dédiée à des applications liées aux expositions environnementales et industrielles. L'optimisation de ces substrats a notamment nécessité la quantification du nombre de lésions formées par HPLC-MS/MS.

Dans un second temps, afin d'étudier les conséquences de l'exposition aux agents génotoxiques, nous avons utilisé trois doses de traitement par composé dans le but d'analyser plusieurs paramètres :

- La variabilité de la réponse cellulaire,
- Le seuil de la réponse cellulaire,
- La spécificité de la réponse cellulaire.

Ces trois paramètres ont été examinés et comparés pour les deux méthodes utilisées. Nous décrirons plus en détail ces paramètres au cours du Chapitre 3.

Les résultats présentés dans ce manuscrit s'articulent en deux parties, directement en lien avec les agents génotoxiques utilisés. La première partie est dédiée à l'IFO et à son métabolite le CAA. La seconde concerne le B[a]P et son métabolite le BPDE.

Nous discuterons ensuite des résultats obtenus et nous déterminerons si ce nouvel outil peut être utile pour l'identification de nouveaux biomarqueurs sur le long terme au niveau des individus.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Traitement cellulaire et test de cytotoxicité

1.1. Culture cellulaire des lignées cellulaires A549 et HepG2

1.1.1. Agents génotoxiques utilisés

Le composé BPDE (0477, MRI Global) est solubilisé dans 5% de triéthylamine (TEA) et 95% de tétrahydrofurane (THF) à une concentration stock de 7.36 mM. Il est conservé à -20°C en aliquots.

Le B[a]P (B1760, Sigma) est dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration stock de 40 mM. Il est conservé à -20°C en aliquots à l'abri de la lumière.

Le CAA (31727, Sigma) est reçu en solution à une concentration de 6.4 M. Il est conservé à +4°C.

L'IFO (I4909, Sigma) est mis en suspension dans H₂O MilliQ à une concentration stock de 192 mM. Il est conservé à -20°C en aliquots.

1.1.2. Culture cellulaire

Nous avons sélectionné deux modèles cellulaires qui nous ont semblé pertinents pour étudier l'exposition à ces quatre agents génotoxiques.

La première lignée cellulaire est la lignée HepG2 (HB-8065, ATCC) qui est issue d'un hépatocarcinome humain. Rappelons que le foie joue un rôle primordial dans la métabolisation des xénobiotiques dû à la présence de nombreuses enzymes de phase I (CYP1A1, 1A2, 2B6, 2E1) et II (GST, SULT, UGT, ...) (Wilkening et al., 2003). Cette lignée est donc très souvent utilisée pour ses bonnes capacités de métabolisation des pro-génotoxiques.

La deuxième lignée cellulaire est la lignée A549 (300 114, Cell Line Service) qui provient d'un adénocarcinome pulmonaire. Cette lignée exprime certaines enzymes du métabolisme de phase I (CYP1A1, 1B1, 2B6) et II (GST) (Hukkanen et al., 2000) nécessaires à la métabolisation des pro-génotoxiques. De plus, une des voies principales d'exposition au B[a]P et au VC est la voie respiratoire. Cette lignée cellulaire représente donc un bon modèle d'exposition pour cette étude.

Nous détaillerons également une troisième lignée cellulaire, la lignée Huh7 fournie par le Pr Janet HALL, CRCL Lyon. Cette lignée a été utilisée pour l'optimisation de la conception de la puce.

1.1.2.1. Lignée cellulaire HepG2

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 (21331-020, Gibco) dans lequel sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (SVF) non décomplémenté (10270-106, Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (11140-035, Gibco), 2% de GlutaMAX™ (35050-038, Gibco), 1% de sodium pyruvate à 100 mM (11360-039, Gibco) et 0.02% d'antibiotique contenant de la pénicilline à 5 000 unités/mL et de la streptomycine à 5 000 µg/mL (15070-063, Gibco). Ces cellules adhérentes sont cultivées en monocouche grâce à un traitement préalable des flasques et pétris avec du collagène de type I (A10483-01, Gibco) dilué au 1/50^e dans un mélange stérile NaOH 1N/D-PBS/H₂O (2.5/10/87.5%). Pour leur entretien, les cellules sont repiquées deux fois par semaine au 1/5^e à l'aide de 0.01% de Trypsine-EDTA (25300-062, Gibco) dans des flasques de 75 cm². Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

1.1.2.2. Lignée cellulaire A549

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 dans lequel sont ajoutés 10% de SVF non décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de L-Glutamine à 200 mM (25030-024, Gibco) et 0.02% d'antibiotique contenant de la pénicilline à 5 000 unités/mL et de la streptomycine à 5 000 µg/mL. Pour leur entretien, les cellules sont repiquées deux fois par semaine au 1/10^e à l'aide de 0,01% de Trypsine-EDTA dans des flasques de 75 cm². Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

1.1.2.3. Lignée cellulaire Huh7

Les cellules sont cultivées dans le milieu DMEM/F12 dans lequel sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (SVF) non décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de GlutaMAX™, 1% de sodium pyruvate à 100 mM et 0.02% d'antibiotique contenant de la pénicilline à 5 000 unités/mL et de la streptomycine à 5 000 µg/mL. Pour leur entretien, les cellules sont repiquées deux fois par semaine au 1/10^e à l'aide de 0,01% de Trypsine-EDTA dans des flasques de 75 cm². Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂.

1.1.3. Congélation et décongélation des cellules

Les cellules sont congelées en cryotubes par culot de 1 million de cellules dans 1 mL de milieu de cryoconservation (SVF avec 10% de DMSO). Les cryotubes sont placés dans un Bicell pendant 24h à -80°C avant d'être conservés dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation. Lors de la décongélation, les aliquots sont rapidement décongelés et centrifugés pendant 3 min, à 1 500 g afin d'éliminer le DMSO.

Les cellules sont ensuite ensemencées dans des flasques de 75 cm² contenant 15 mL de milieu complet qui sera renouvelé le lendemain, une fois que les cellules auront adhéré.

1.1.4. Détection de mycoplasme

Après chaque décongélation, et pour les deux lignées cellulaires utilisées, la recherche de mycoplasme est réalisée via le kit de détection MycoAlert™ (LT07-318, Lonza). Il n'a jamais été détecté de mycoplasmes pour ces deux lignées cellulaires au cours de notre étude.

1.2. Test de cytotoxicité MTT

Les sels de tétrazolium MTT (bromure de 3- [4,5-diméthyl-2-thiazolyl] -2,5 diphényltétrazolium) permettent d'évaluer la cytotoxicité des composés génotoxiques. En effet, les déshydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules vivantes et actives vont entraîner la précipitation des sels en formazan sous forme de cristaux bleus-violet. Ces cristaux de formazan sont ensuite dissous dans du DMSO qui donne une coloration violette analysable par spectrophotométrie. L'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Afin d'effectuer ce test, les cellules sont ensemencées en plaque de 96 puits à 2 000 ou 4 000 cellules par puits. Les traitements avec les différents agents génotoxiques sont effectués 24h après l'ensemencement. Une solution de MTT (M5655, Sigma) à 5 mg/mL est préparée dans du D-PBS (14200-094, Gibco) puis aliquotée et conservée à -20°C à l'abri de la lumière. A la fin du traitement avec les agents génotoxiques, 10 µL de solution de MTT sont ajoutés par puits contenant 100 µL de milieu complet. Les cellules sont incubées pendant 2h à 37°C sous 5% CO₂. La plaque est ensuite centrifugée à 200 g, pendant 5 min. Les puits sont vidés et rincés avec 200 µL de D-PBS, puis 100 µL de DMSO sont ajoutés par puits. La plaque est placée dans un agitateur pour microplaques à 700 rpm pendant 15 min avant d'être lue au spectrophotomètre à 560 nm.

L'absorbance témoin correspond à un échantillon cellulaire non traité. Le blanc de lecture correspond au test réalisé sur les puits contenant du milieu complet seul. Le pourcentage de viabilité cellulaire est exprimé par la formule suivante :

$$viabilité\ cellulaire\ (\%) = \frac{(DO_e - DO_b)}{(DO_t - DO_b)} \times 100$$

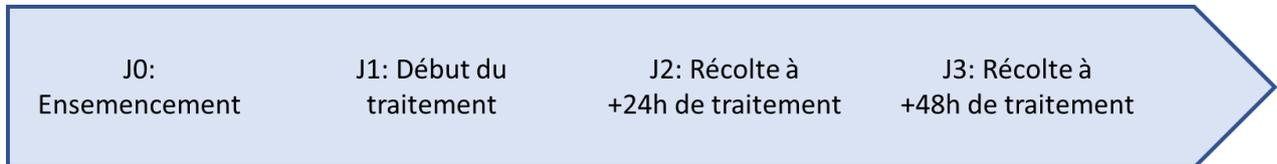
DO_e : absorbance de l'échantillon

DO_t : absorbance du témoin

DO_b : absorbance du blanc de lecture

1.3. Traitement cellulaire avec les différents agents génotoxiques

Les deux lignées cellulaires sont traitées avec les quatre agents génotoxiques (B[a]P, BPDE, IFO et CAA) pendant 24 ou 48h de traitement. Le déroulement des expériences cellulaires est décrit dans le schéma suivant :



Les cellules sont ensemencées à une densité adaptée au temps de traitement de manière à ce qu'au moment de la récolte, elles soient confluentes à 80%.

Lignées cellulaires	Ensemencement en Pétris 100 mm (en millions de cellules) pour	
	24h de traitement	48h de traitement
HepG2	1	0,75
A549	1	0,5

Lors de l'ensemencement, les cellules sont placées dans 9 mL de milieu complet dans des pétris de 100 mm. Le traitement débute 24h après l'ensemencement en ajoutant, dans chaque pétri, 1 mL de milieu de culture dans lesquels les différents agents génotoxiques ont été dissous à la concentration souhaitée. Etant donné que les composés BPDE et B[a]P sont très peu solubles dans l'eau, ils sont préalablement dilués dans du DMSO. La concentration finale en DMSO est de 0.5% pour le B[a]P et 0.2% pour le BPDE.

Chaque expérience inclut un ou deux contrôles en fonction des agents génotoxiques utilisés :

- Les expériences comprenant les traitements au CAA et à l'IFO ne possèdent qu'un seul contrôle non traité correspondant aux cellules placées dans du milieu de culture complet
- Celles incluant les traitements au B[a]P et au BPDE comprennent deux contrôles : un contrôle non traité (milieu de culture complet) et un contrôle DMSO correspondant aux cellules avec du milieu complet et une concentration en DMSO de 0.5 ou 0.2% selon l'agent génotoxique utilisé

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicats indépendants pour chaque condition.

1.4. Récolte cellulaire

Après 24 ou 48h de traitement avec les composés, les cellules sont rincées deux fois avec 5 mL de D-PBS puis décollées avec 1 mL de 0.01% Trypsine/EDTA. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 5 mL de milieu de culture. Les cellules sont récoltées en tube Falcon de 15 mL puis centrifugées pendant 5 min, à 1 500 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par 1 mL de SVF. La viabilité cellulaire ainsi que le nombre de cellules sont comptabilisés à l'aide du compteur automatique (Countess automated cell counter, Invitrogen). Le volume de SVF est ensuite ajusté afin de permettre la préparation de deux aliquots par condition : un contenant 2.5 millions de cellules, destiné à la préparation d'extraits protéiques pour le test ExSy-SPOT et un autre avec 5 millions de cellules, destiné à l'extraction de l'ADN pour le dosage par HPLC-MS/MS. Les cellules sont congelées comme décrit précédemment par ajout de 10% de DMSO et conservées dans l'azote liquide jusqu'à leur utilisation.

2. Dosage des lésions par HPLC-MS/MS

2.1. Extraction de l'ADN cellulaire

Tous les produits composant les tampons A et B ainsi que la solution de NaI proviennent de Sigma.

Les échantillons préparés lors de la récolte cellulaire sont décongelés et centrifugés 5 min à 1 500 g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans 1 mL de PBS. Une nouvelle centrifugation est effectuée ; puis le culot est repris et homogénéisé dans 0.75 mL de tampon A afin de procéder à la lyse des membranes plasmiques (Tableau 9 pour la composition). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 1 500 g. Cette étape d'ajout de tampon A et de centrifugation est répétée une seconde fois.

Le culot nucléaire est remis en suspension dans 0.3 mL de tampon B afin de lyser les membranes nucléaires (Tableau 9 pour la composition).

Après homogénéisation, 18 μ L de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10 % sont ajoutés puis les échantillons sont homogénéisés par vortex. Dans chaque tube, 1.5 μ L de RNase A à 100 mg/mL (R5125, Sigma), 3.5 μ L de RNase T1 à 1 U/mL (R1003, Sigma) sont ajoutés afin d'éliminer l'ARN. Les échantillons sont incubés pendant 15 min à 50°C ; puis pendant 1h à 37°C après addition de 15 μ L de protéase (19157, Qiagen) de manière à supprimer les protéines.

L'ADN est précipité par ajout de 0.5 mL de solution de NaI (Tableau 9 pour la composition) et de 1 mL d'isopropanol 100%. Après agitation douce par retournement et centrifugation de 5 min à 5 000 g, les culots sont repris dans 0.5 mL d'éthanol 70%. Une dernière centrifugation est effectuée puis l'éthanol est éliminé avant de dissoudre l'ADN dans 50 µL de déféroxamine à 0.1 mM. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à la prochaine étape de digestion.

Tampon A (pH 7,5)	Tampon B (pH 8)	Solution NaI (pH 8)
Lyse de la membrane plasmique	Lyse de la membrane nucléaire	Précipitation de l'ADN
320 mM Sucrose 5 mM MgCl ₂ 10 mM Trizma® base 0,1 mM Déféroxamine 1% Triton 100X	5 mM EDTA-Na ₂ 10 mM Trizma® base 0,15 mM Déféroxamine	20 mM EDTA-Na ₂ 7,6 M NaI 40 mM Trizma® base 0,3 mM Déféroxamine

Tableau 9 - Composition des tampons de lyse A et B et de la solution de NaI utilisés pour l'extraction d'ADN

2.2. Digestion enzymatique de l'ADN

Tous les produits composant les tampons proviennent de Sigma.

L'ADN cellulaire ou les substrats plasmidiques (utilisés pour le test ExSy-SPOT que nous détaillerons plus bas) sont digérés enzymatiquement en nucléosides selon un protocole commun divisé en deux étapes.

Pour cela, un premier mélange d'enzyme est préparé contenant 0.025 U de Phosphodiesterase II (P9041, Sigma), 2.5 U de DNase II (D4138, Sigma), 0.5 U de Nucléase P1 (N8630, Sigma) et 2.5 µL de tampon MNSPDE 10X (200 mM d'acide succinique, 100 mM CaCl₂, pH 6). Celui-ci est ensuite ajouté à chaque échantillon suivi d'une incubation de 2h à 37°C.

Un nouveau mix est ajouté constitué de 0.015 U de Phosphodiesterase I (P3243, Sigma), 2 U de Phosphatase alcaline (P6774, Sigma) et 6 µL de tampon (500 mM Trizma® base, 1 mM EDTA, pH 8). Après 2h d'incubation à 37°C, 3.5 µL d'HCl à 0.1N sont ajoutés afin de neutraliser la solution. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 5 000 g pendant 5 min puis ils sont placés pendant 10 min au speed-vac à trompe à eau (SPD 111V, Thermo Scientific) pour éliminer toutes traces d'éthanol. L'ADN hydrolysé est conservé à -20°C jusqu'à l'analyse HPLC-MS/MS.

2.3. Analyse HPLC-MS/MS

2.3.1. Solvants

Les solvants utilisés pour l'analyse HPLC-MS/MS sont l'acétonitrile (83639.320, VWR), le méthanol (34860, Sigma), le formiate d'ammonium à 10 M (78314, Sigma) ainsi que l'acide formique (85175, Thermo Scientific). Les solutions de formiate d'ammonium sont préparées à 2 mM et celles d'acide formique à 0.1%. Elles sont ensuite filtrées sur membrane 0.45 µm.

2.3.2. Synthèse des adduits et appareils utilisés

Afin de pouvoir quantifier le nombre de lésions formées dans l'ADN, nous procédons à une calibration externe, il est donc nécessaire d'analyser des standards à une concentration connue. Ces différents types de standards correspondent d'une part, à un mélange équimolaire de nucléosides non modifiés (dA, dG, dT et dC) et d'autre part, aux différentes lésions que nous souhaitons doser sous forme de nucléosides. La synthèse des différents adduits (8oxodGuo, BPDE-N²-dGuo, εdA, εdC et εdG) est effectuée par le laboratoire SyMMES selon différents protocoles comme décrits précédemment par Marie et al., (Marie et al., 2008), Stadler et al. (Stadler et al., 1994), Badouard et al. (Badouard et al., 2008). Les trois Ethénonucléosides sont analysés en mélange équimolaire.

Deux systèmes sont disponibles au laboratoire pour le dosage de ces différents adduits. Ils sont composés d'une chaîne HPLC couplée en ligne à un spectrophotomètre de masse en mode tandem (MS/MS). La source d'ionisation est de type électrospray et l'analyseur est constitué d'un triquadripôle utilisé en mode MRM. Pour les deux appareils, la séparation HPLC est réalisée sur une colonne de silice greffée en phase inverse C18 (UP3ODB-150/021, Interchim).

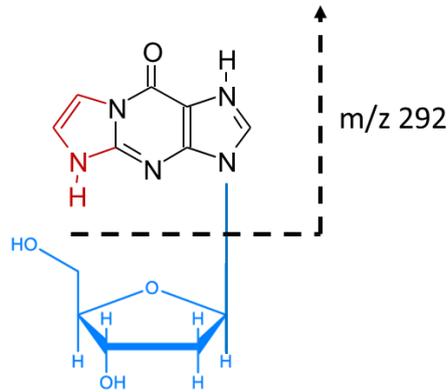
2.3.3. Analyse des lésions Ethénonucléosides et 8oxodGuo

Le premier appareil (Accela couplé à TSQ Quantum Ultra, Thermo Scientific) permet les dosages des lésions Ethénonucléosides et 8oxodGuo.

Le dosage des Ethénonucléosides est effectué par calibration externe dans les divers échantillons. La séparation est réalisée avec un gradient de méthanol de 0 à 25% en 30 min dans du formiate d'ammonium 2 mM. Trois transitions spécifiques à chaque Ethénonucléosides sont suivies :

- εdG avec la transition MRM : 292 → 176

- ϵ dA avec la transition MRM : 276 \rightarrow 160
- ϵ dC avec la transition MRM : 252 \rightarrow 136

Figure 48 - Fragmentation de l' ϵ dG

Le temps de rétention est compris entre 13 et 14 min selon le type d'Ethénonucléosides. La quantification des nucléosides non modifiés est réalisée en UV à 280 nm. La calibration externe basée sur l'injection du standard composé du mélange de ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG à une concentration connue permet d'effectuer la quantification et d'exprimer les résultats en nombre d'Ethénonucléosides (ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG)/ 10^6 nucléosides normaux.

Le dosage de la 8oxodGuo est effectué par étalonnage interne en ajoutant un standard de 8oxodGuo $^{15}\text{N}_5$, c'est-à-dire enrichi isotopiquement en azote 15, dans chaque échantillon. Cet enrichissement permet de s'affranchir de toute perte de sensibilité qui pourrait advenir au cours de l'analyse. La séparation est réalisée avec un gradient de méthanol de 0 à 15% en 25 min dans de l'acide formique 0.1%. Deux transitions sont simultanément suivies :

- 8oxodGuo avec la transition MRM : 284 \rightarrow 168
- 8oxodGuo $^{15}\text{N}_5$ avec la transition MRM : 289 \rightarrow 173

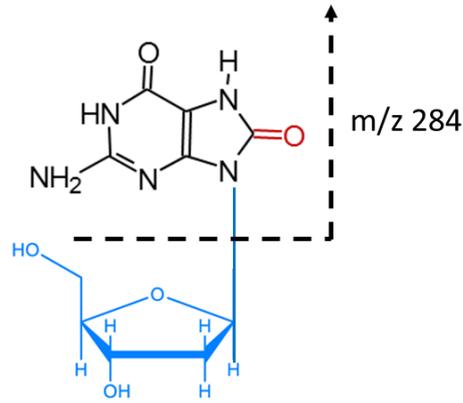


Figure 49 - Fragmentation de la 8oxodG

Le temps de rétention est de 24 min pour la 8oxodGuo et l'étalon interne. La quantification des nucléosides non modifiés est réalisée par détection UV à 280 nm. Les résultats sont exprimés en nombre de 8oxodGuo/ 10^6 nucléosides normaux.

Pour cet appareil, toutes les données sont traitées grâce au logiciel Xcalibur.

2.3.4. Analyse des adduits BPDE-N²-dGuo

Le deuxième dispositif (Agilent couplé à API300, SCIEX) permet le dosage des adduits BPDE-N²-dGuo.

La séparation est réalisée avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100% dans du formiate d'ammonium 2 mM. Trois transitions correspondant à des fragmentations spécifiques de l'adduit BPDE-N²-dGuo ont été sélectionnées (Figure 50) et sont simultanément suivies avec les transitions MRM : 570 → 454 ; 570 → 285 et 570 → 257.

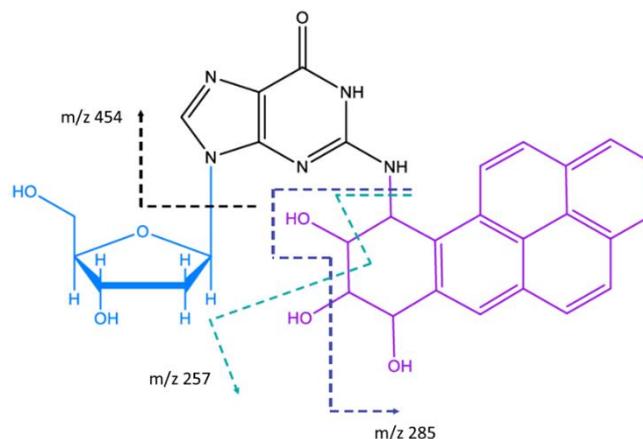


Figure 50 - Fragmentation de l'adduit BPDE-N²-dGuo

Le temps de rétention des adduits BPDE-N²-dGuo est de 21 min. La quantification des nucléosides non modifiés est réalisée en UV à 280 nm. La calibration externe basée sur l'injection du standard à une concentration connue permet d'effectuer la quantification et d'exprimer les résultats en nombre d'adduits BPDE-N²-dGuo/10⁶ nucléosides normaux.

Toutes les données sont traitées grâce au logiciel Analyst.

3. Test ExSy-SPOT

Comme vu dans le chapitre I, le test ExSy-SPOT a pour but de mesurer les activités d'excision et de resynthèse par incorporation de dNTPs couplé à un fluorochrome permettant ainsi de quantifier les activités de réparation de l'ADN des voies BER et NER. Trois étapes sont nécessaires pour réaliser ce test :

- préparation des substrats plasmidiques contenant un type de lésion,
- fonctionnalisation de la lame par dépôt des ADN substrats,
- mesure des activités de réparation de l'ADN par réaction *in vitro* d'excision/resynthèse avec l'utilisation d'extraits protéiques.

3.1. Préparation des substrats plasmidiques contenant une lésion spécifique

Le substrat plasmidique utilisé pour le test est le plasmide pBlueScript II SK (+/-) qui est produit par transformation des cellules « XL1-Blue MRF supercompetent cells » (Stratagène) selon le protocole du fournisseur. Ce plasmide contient 2961 paires de bases soit environ 3 kB.

Les bactéries *Escherichia coli* transformées par le plasmide pBlueScript sont cultivées dans du milieu LB1X, en présence d'ampicilline à 20 µg/mL, la nuit sous agitation à 250 rpm à 37°C.

Le plasmide est ensuite purifié en utilisant le Kit Plasmid Purification Maxi (12163, Qiagen).

Une étape supplémentaire de purification du plasmide est ajoutée au moment de l'élution du plasmide afin de ne conserver que la forme super enroulée du plasmide (>90%). Pour cela, la première fraction d'élution de 500 µL est éliminée.

En fonction du type de traitement appliqué par la suite, le plasmide est dilué dans PBS 1X ou H₂O MilliQ à une concentration de 1 mg/mL déterminée à l'aide du spectrophotomètre (ND-1000, Nanodrop), qui permet de quantifier l'ADN en mesurant l'absorption à 260 nm. Le plasmide est aliquoté par 100 µL et conservé à -80°C.

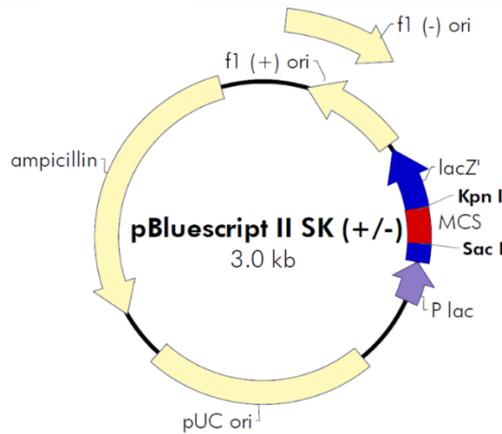


Figure 51 - Schéma du plasmide pBlueScript II SK (+/-)

Les plasmides sont ensuite traités avec des agents chimiques ou physiques afin de créer les différents types de lésions de l'ADN que nous souhaitons étudier. Le test ExSy-SPOT utilisé pour ce projet de recherche contient 7 plasmides différents. Ci-dessous la nomenclature utilisée pour les différents plasmides :

- « Control » : plasmide non traité qui ne contient pas de lésions
- « 8oxoG » : plasmide contenant des lésions oxydatives de type 8oxoG
- « AbaS » : plasmide contenant des sites abasiques
- « Glycols » : plasmide contenant des diols de Thymine et Cytosine
- « CPD-64 » : plasmide contenant des dommages photoinduits de type CPD et 6-4PP
- « Etheno » : plasmide contenant des Ethénobases : εA, εG et εC
- « BPDE » : plasmide contenant des adduits dG-BPDE

Les plasmides 8oxoG, AbaS, Glycols et CPD-64 sont formés selon le protocole décrit par Millau *et al.* (Millau *et al.*, 2008).

Les plasmides Etheno et BPDE sont formés par réaction chimique à partir d'une solution de CAA ou de BPDE respectivement au cours d'une incubation à 37°C. Les conditions de traitement et d'optimisation utilisées pour concevoir ces deux types de lésions seront décrites plus en détail dans le prochain chapitre.

A la fin du traitement, les plasmides sont ensuite précipités par ajout d'un volume d'isopropanol (I9516, Sigma) et 1/10^e de volume de sodium acétate 3N (71196, Sigma). Les échantillons sont centrifugés pendant 30 min à 15 000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et remplacé par 100 µL d'éthanol 70% (4146072, Carlo Erba). Une nouvelle centrifugation de 5 min à 15 000 g est effectuée. Ces deux étapes sont répétées. Le culot est ensuite repris dans un volume adéquat de PBS 1X afin d'obtenir une concentration proche de 1 mg/mL déterminée à l'aide du spectrophotomètre. Les plasmides sont aliquotés par 5 µL et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Avant d'être immobilisés sur puce, nous quantifions les lésions d'intérêt formées dans chaque plasmide par dosage HPLC-MS/MS comme décrit précédemment.

Dans un second temps, nous nous assurons de la spécificité des dommages formés en évaluant la formation d'autres types de dommages. Pour cela, nous vérifions l'absence d'autres types de dommages comme des lésions oxydatives de type 8oxoG toujours en utilisant le dosage par HPLC-MS/MS. Puis, nous vérifions également l'absence de cassures simple et double brin en contrôlant par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% contenant du BET l'intégrité des plasmides. En effet, la conformation superenroulée du plasmide doit être supérieure à 85% puisqu'une présence trop importante de formes relaxées du plasmide est révélatrice de cassures (CDBs et CSBs) pouvant induire des réactions de réparation non désirées sur la puce (Figure 52).

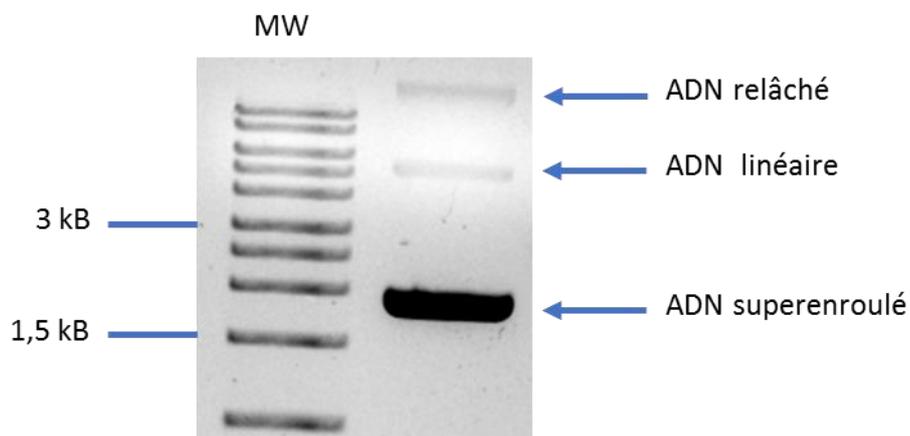


Figure 52 - Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% : la forme superenroulée du plasmide est de 92%

3.2. Fonctionnalisation de la lame

La deuxième étape consiste à fabriquer la biopuce en immobilisant les plasmides contenant les lésions sur le support. Ce support est une lame de verre commerciale recouverte d'un hydrogel de polyacrylamide (625-2002A, BMT Biosystems). Il contient 14 zones (A1 à A14) appelées « pavés » identiques selon le schéma ci-dessous :

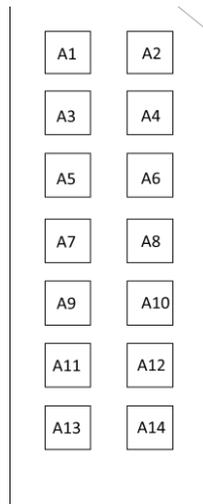


Figure 53 - Schéma des zones de dépôt des plasmides sur la puce

Les différents plasmides sont dilués dans du PBS 1X à 40 µg/mL (ratio C) puis déposés en plaque 96 puits. Une seconde dilution des différents plasmides lésés est effectuée au ½ dans du plasmide contrôle à 40 µg/mL (ratio A). La quantité de plasmide reste donc identique dans les deux cas, seul le ratio quantité de lésions/quantité ADN est modifié.

Chaque plasmide est déposé en duplicats et à 2 ratios (A et C) soit un total de 4 spots pour un type de plasmide par pavé excepté pour le plasmide contrôle qui est déposé à 4 emplacements. Le dépôt des plasmides est effectué à l'aide d'un robot de dispense (sciFLEXARRAYER S5, Scienion) et d'une buse de 60 µm de diamètre (Scienion). Cet automate nous permet de déposer des gouttes de très petits volumes environ 900 picoL grâce à un système piézoélectrique sans contact avec le support. Dans chaque zone, les plasmides sont déposés conformément à la Figure 54 qui illustre par exemple la zone A1.

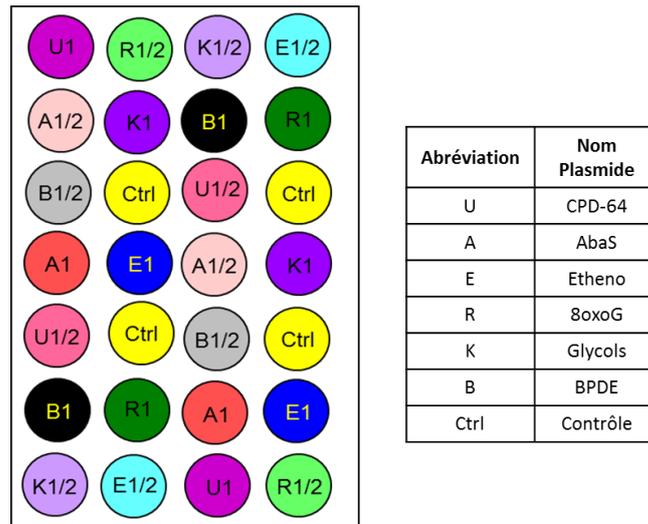


Figure 54 - Schéma du dépôt des substrats plasmidiques sur la lame hydrogel : le chiffre 1 correspond au ratio C et 1/2 au ratio A

Le contrôle du dépôt des gouttes sur la lame hydrogel est effectué à l'aide d'une lame contrôle recouverte d'un papier pH « water sensitive paper » (3100-0011, Quantifoil Instruments) nous permettant de visualiser la qualité des gouttes tout au long du spotting.

Après dépôt, les lames sont conservées à température ambiante sous argon pendant 15 jours avant de pouvoir être fonctionnelles. Ce délai permet aux plasmides de s'ancrer correctement dans l'hydrogel.

3.3. Mesure des activités de réparation par réaction *in vitro* d'excision/resynthèse

Pour quantifier les activités de réparation de l'ADN, le support fonctionnalisé est incubé avec l'extrait protéique d'intérêt, en présence de réactifs favorisant la réaction de réparation par excision/resynthèse.

3.3.1. Préparation des extraits protéiques nucléaires

Pour réaliser le test ExSy-SPOT, nous devons en amont préparer les extraits afin d'obtenir les protéines nucléaires de chaque échantillon. Pour cela, nous utilisons les culots cellulaires préparés et conservés dans les conditions décrites précédemment.

L'ensemble des étapes de la lyse est réalisé à 4°C. Les cellules sont centrifugées à 500 g pendant 5 min puis lavées au PBS 1X avant d'être incubées 20 min dans le tampon A afin de lyser la membrane plasmique (Tableau 10 pour la composition). A la fin de l'incubation, les cellules sont agitées pendant

30 sec pour faciliter la lyse membranaire ; puis centrifugées à 2 300 g pendant 5 min afin de culotter les noyaux intègres et d'éliminer les protéines cytoplasmiques situées dans le surnageant. Le culot est ensuite repris dans le tampon B (Tableau 10 pour la composition) pendant 20 min permettant de procéder à la lyse de la membrane nucléaire. La lyse des noyaux est complétée par deux cycles congélation/décongélation, 30 sec dans l'azote liquide puis à 4°C pendant 2 min. Les tubes sont centrifugés 10 min à 16 000 g afin de séparer les débris membranaires, des protéines nucléaires localisées dans le surnageant. L'extrait protéique est ensuite aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

Tampon A	Tampon B
Lyse de la membrane plasmique	Lyse de la membrane nucléaire
10 mM HEPES-KOH 1.5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0.02% Triton X-100 0.5 mM DTT 103,3 mM PMSF	10 mM HEPES-KOH 1.5 mM MgCl ₂ 400 mM KCl 0.2 mM EDTA-NaOH 25% Glycérol 0.5 mM DTT 103,3 mM PMSF 0.7X antiprotéases (11836170001, Roche)

Tableau 10 - Composition des tampons de lyse A et B pour la préparation des extraits protéiques nucléaires

3.3.2. Dosage de protéines dans les extraits

La concentration en protéine des extraits est déterminée par dosage BCA à l'aide du kit Uptima MicroBC Protein Quantification Assay (UP75860A, Interchim) en plaque 96 puits. La méthode BC Assay est un dosage colorimétrique des protéines basé sur l'utilisation d'acide bicinchoninique (BC). Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu²⁺ en Cu⁺ en milieu alcalin. Or, l'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu⁺, qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines.

Une gamme étalon est donc préparée à partir d'une solution de BSA à 2 mg/mL ainsi que 3 dilutions en cascade de chaque extrait à doser. 100 µL de réactif MicroBC assay sont ensuite ajoutés dans chaque puit. La plaque est incubée 1h à 60°C. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (SpectraMax M2, Molecular Devices). La concentration en protéines de chaque extrait est déterminée à partir de la courbe étalon.

3.3.3. Réaction *in vitro* d'Excision/Resynthèse à partir de l'extrait protéique

Lors de l'expérience de réparation sur la puce, un cache en plastique (HBW14FL-2L, Grace Biolabs) est collé sur chaque lame (Figure 55). Ce cache permet de délimiter des chambres réactionnelles où un extrait protéique peut réagir avec l'ensemble des plasmides déposés dans un pavé. Un mix réactionnel de 12 μL est déposé dans chaque chambre réactionnelle grâce à des orifices présents sur le cache au niveau des extrémités de chaque pavé.

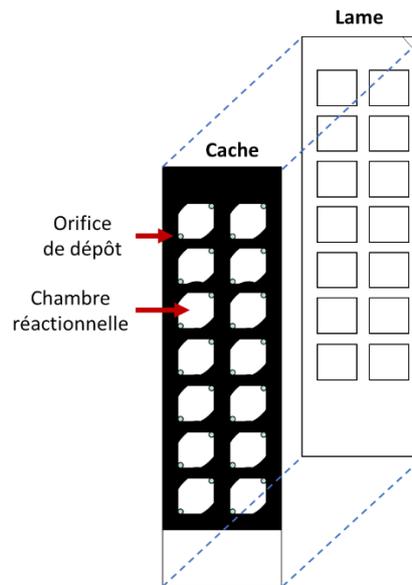


Figure 55 - Schéma de la préparation de la biopuce pour la réalisation de la réaction *in vitro* d'excision/resynthèse

Le test ExSy-SPOT impose certains paramètres expérimentaux qui ont été établis lors des précédents travaux de J.F Millau (Millau, 2006). Par exemple la dernière étape de lyse des membranes nucléaires pour la préparation des extraits nécessite une forte concentration en KCl (400 mM). Les protéines se retrouvent alors dans un tampon avec une forte concentration saline. Or, pour que la réaction d'excision/resynthèse soit optimale, la concentration en KCl doit être de 80 mM ce qui nous contraint à diluer par 5 tous les extraits et ce qui a également des conséquences sur les concentrations finales en protéines.

Chaque échantillon est déposé en duplicats sur la puce, nous préparons donc un mix réactionnel de 30 μL contenant :

- 6 μL d'extraits protéiques nucléaires à la concentration finale comprise entre 0.1 et 0.6 mg/mL dilué dans le tampon B ayant servi pour la préparation des extraits,

- 6 μL de tampon ATG 5X (220 mM HEPES-KOH, 35 mM MgCl_2 , 2.5 mM DTT, 1.25 μM dATP, 1.25 μM dGTP, 1.25 μM dTTP, 17% Glycérol, 50 mM Phosphocréatine, 10 mM EDTA-NaOH, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Créatine Phosphokinase, 0.5 mg/mL BSA),
- 0.75 μL dCTP-Cy3 à 10 μM ,
- 0.3 μL ATP 100 mM,
- qsq H_2O MilliQ.

Les concentrations finales de chaque réactif sont présentées dans le tableau suivant :

Espèce chimique	Concentration finale
HEPES-KOH	46 mM
KCl	80 mM
MgCl_2	7,3 mM
EDTA-NaOH	2,04 mM
DTT	0,6 mM
Glycérol	8,4%
dATP	0,25 μM
dTTP	0,25 μM
dGTP	0,25 μM
Phosphocréatine	10 mM
Créatine Phosphokinase	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Antiprotéases	0,14 X
PMSF	20 μM
BSA	0,1 mg/mL
ATP	1 mM
dCTP-Cy3	0,25 μM

Tableau 11 - Concentration finale en réactifs lors du test ExSy-SPOT

Dans les conditions classiques du test ExSy-SPOT, nous utilisons du dCTP-Cy3 (PA53021, GE Healthcare) mais il est également possible en fonction des besoins de l'étude d'utiliser les trois autres dNTPs marqués (dGTP, dATP et/ou dUTP).

Après avoir déposé le mix réactionnel sur chaque pavé, un film autocollant de protection est collé sur le cache afin de boucher les orifices et éviter ainsi toute évaporation. La lame est incubée pendant 3h à 30°C en chambre humide.

A la fin de l'incubation, la lame est rincée 2 fois 3 min dans du PBS/Tween 0.05% ; puis 2 autres fois dans H_2O MilliQ. Afin d'éliminer l'eau résiduelle, la lame est centrifugée pendant 30 sec à 800 g puis séchée pendant 10 min à 30°C.

La fluorescence incorporée au niveau de chaque dépôt de plasmide (spot) est quantifiée en utilisant un scanner (Innoscan 710 AL, Innopsys).

La lecture de l'intensité de fluorescence nécessite le réglage de plusieurs paramètres que nous pouvons contrôler et ajuster en fonction des besoins :

- la puissance du laser peut être définie indépendamment. Le scanner que nous utilisons possède un laser à 532 nm pour la mesure du Cy3.
- le réglage du gain de détection c'est-à-dire la puissance du photomultiplicateur du scanner détermine le pourcentage de gain de chaque longueur d'onde. La modification de ce paramètre permet d'éviter la saturation des pixels. Nous l'utilisons à gain 15 pour chaque lecture de lame.
- le contrôle du focus : nous l'utilisons en mode « autofocus » ce qui permet de réduire très fortement le bruit de fond et d'être insensible aux possibles déformations de la lame.

Tous ces paramètres sont réglables grâce au logiciel Mapix (version 6.5) et il nous permet d'obtenir les intensités de fluorescence totale de chaque spot, en unités arbitraires (A.U.).

3.4. Normalisation des données

Chaque échantillon est déposé en duplicats sur deux pavés indépendants au sein d'une lame et chaque pavé contient deux dépôts d'un même type de lésions. Par conséquent, pour chaque échantillon, nous avons deux types de répliquats :

- Les répliquats intra-pavés correspondants aux deux dépôts identiques d'un même pavé,
- Les répliquats inter-pavés qui correspondent au même type de plasmide sur deux pavés distincts.

Toutes les valeurs d'un même type de lésion sont ensuite normalisées grâce à l'application Normalizelt qui est un algorithme spécifiquement développé pour traiter ce type de données. Cette étape de normalisation est indispensable pour l'exploitation des données et est effectuée via le logiciel TransfertGPR (LXRepair).

La première étape de normalisation consiste à centrer et à normer les données sur tous les couples de répliquats afin d'imposer un même écart type et une moyenne identique à tous les répliquats. Une régression linéaire, pondérée et récursive est ensuite effectuée sur tous ces couples permettant de calculer un facteur de reproductibilité entre 0 et 1. Plus le facteur est proche de 1 et plus les valeurs sont similaires et dans l'idéal identiques. A l'inverse, proche de 0, les valeurs sont trop éloignées pour que l'expérience ait bien fonctionné sur l'un des deux dépôts. L'étape finale de normalisation consiste

à regrouper l'ensemble des données de chaque duplicats et de les pondérer par leur facteur de reproductibilité respectif (Millau et al., 2008).

Cette méthode de normalisation permet donc de réduire au maximum la variabilité intra et inter pavé en corrigeant le biais de chacun des réplicats.

3.5. Interprétation des données

3.5.1. Intensité de fluorescence

Le signal de fluorescence quantifié correspond à l'incorporation de dCTP-Cy3 dans l'ADN fixé sur le support.

Afin de mieux comprendre comment s'effectue l'interprétation des données, nous allons présenter ci-dessous un exemple avec l'utilisation de deux extraits que nous allons appeler « Non Traité (NT) » et « Traité (T) ».

La Figure 56 présente deux images en fausses couleurs obtenues après la lecture du signal fluorescent de deux pavés de la lame après 3h de réaction avec 0.15 mg/mL de protéines nucléaires.

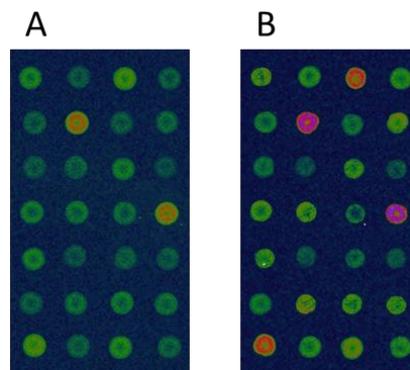


Figure 56 - Images en fausses couleurs obtenues après lecture du signal fluorescent à 532 nm. Chaque disque (« spot ») correspond à un type de plasmide. Plus le disque est rouge, plus l'incorporation de dCTP-Cy3 a été importante. A) Extrait nucléaire « NT » B) Extrait nucléaire « T »

Chaque plasmide comportant un type de lésions est déposé sur le support à deux ratios lésions/ADN (A et C). Tous les dépôts contiennent la même quantité d'ADN, seule la quantité de lésions change : le ratio A correspond à la plus faible quantité de lésions (dilution $\frac{1}{2}$ des plasmides lésions dans du plasmide témoin) et le ratio C correspond à la plus forte quantité de lésions.

L'intensité de fluorescence (FI) correspond à la somme des intensités de fluorescence de l'ensemble des pixels contenus dans un dépôt de plasmide.

Comme nous l'avons décrit précédemment, nous immobilisons sur la puce les différents types de plasmides contenant les lésions ainsi qu'un plasmide contrôle dont le signal obtenu montre la part de la réparation non spécifique qui a lieu pendant la réaction enzymatique. Afin d'observer uniquement l'activité d'excision/resynthèse qui a lieu spécifiquement sur la lésion considérée, l'intensité de fluorescence obtenue au niveau de plasmide contrôle a été soustraite à l'intensité de fluorescence obtenue pour chaque ratio A et C.

Dans un second temps, les intensités de fluorescence pour les deux ratios A et C sont sommées pour un même type de plasmide afin d'obtenir une seule valeur pour une lésion donnée.

L'ensemble de ces étapes nous permet d'obtenir l'histogramme représenté sur la Figure 57 ci-dessous :

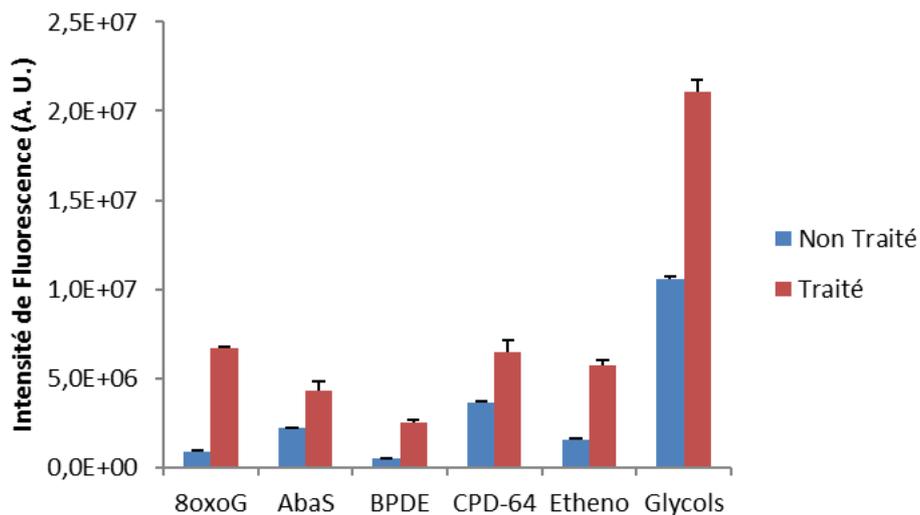


Figure 57 - Profil d'excision/resynthèse des différentes lésions obtenu après soustraction de l'intensité de fluorescence du plasmide contrôle

3.5.2. Contribution relative de chaque voie à la réparation totale

Afin d'observer comment sont réparties les activités d'excision/resynthèse des différentes lésions, nous pouvons diviser l'intensité de fluorescence obtenue au niveau de chaque lésion par l'intensité de fluorescence totale qui correspond à la somme des intensités de fluorescence obtenues au niveau des différentes lésions selon le calcul suivant :

$$\text{Contribution relative (\%)} = \frac{FI (\text{lésion})}{FI \text{ Totale}} \times 100$$

Ceci nous permet d'obtenir un pourcentage correspondant à ce que nous appelons la contribution relative de chaque voie de réparation par lésion.

La Figure 58 présente les diagrammes obtenus pour les deux extraits protéiques « NT » et « T » :

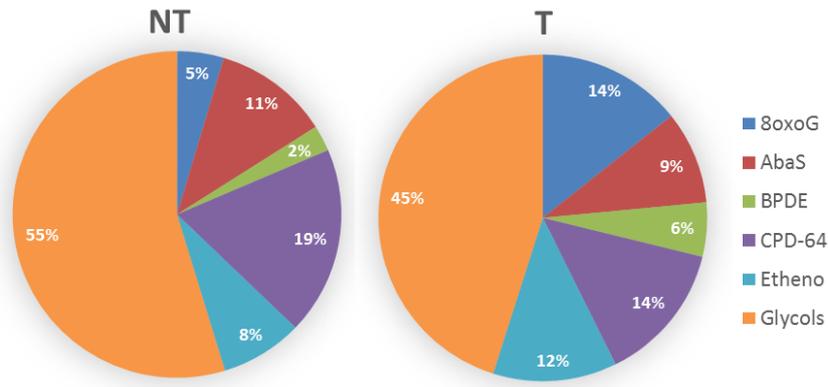


Figure 58 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion : 1) Diagramme NT de l'échantillon « Non Traité » 2) Diagramme T de l'échantillon « Traité »

3.5.3. Effet du traitement

Ce projet de recherche a pour but d'explorer la réponse cellulaire à certains agents génotoxiques en étudiant les différents profils d'excision/resynthèse obtenus. Pour chaque traitement, les expériences ont été réalisées en triplicats. Les valeurs de fluorescence de chaque lésion ont été moyennées pour l'échantillon contrôle (NT) afin de calculer le rapport suivant :

$$\text{Rapport} = \frac{FI (\text{échantillon})}{\text{Moyenne } FI (\text{Contrôle})}$$

Ce rapport nous permet de visualiser l'effet d'un traitement de manière simplifiée. Après avoir effectué les rapports pour chaque type de lésion présente sur la puce, nous obtenons l'histogramme suivant (Figure 59) :

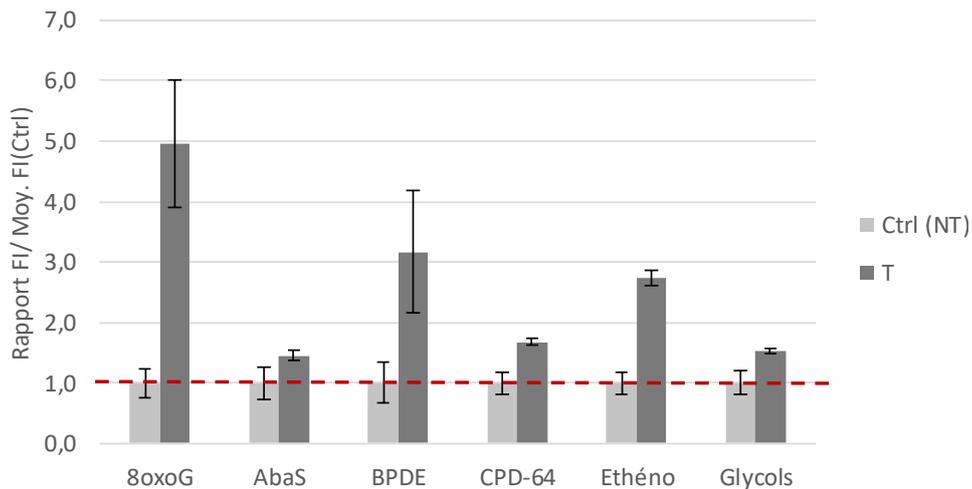


Figure 59 - Rapport de l'intensité de fluorescence des extraits « T » par rapport à la moyenne des extraits « NT »

Ce rapport est ensuite interprété de la manière suivante :

Rapport < 1 : inhibition des activités de réparation

Rapport = 1 : pas d'effet du traitement sur les activités de réparation

Rapport > 1 : stimulation des activités de réparation

Par exemple, sur la Figure 59, nous observons une stimulation des activités de réparation au niveau de l'ensemble des lésions suite au traitement. Cette stimulation est d'autant plus importante que le rapport est élevé, nous pouvons donc classer l'importance de cette stimulation au niveau des différentes lésions de la façon suivante :

8oxoG > BPDE > Ethéno > CPD-64 > Glycols = AbaS

3.6. Contrôle qualité des puces fonctionnalisées

Il est possible d'observer une variabilité entre les différentes expériences réalisées due à la qualité du support ou des dépôts, voire de la réaction biologique elle-même.

Ces variabilités peuvent impacter la reproductibilité de l'intensité des signaux de fluorescence au moment de la réalisation du test ExSy-SPOT.

Afin de palier à ces problèmes, plusieurs démarches de contrôle qualité ont été mises en place dont l'utilisation d'un même extrait nucléaire de référence provenant de cellules HeLa (CC012050, Ipracell). Cet extrait est acheté en grande quantité puis stocké sous forme d'aliquots à -80°C.

La première procédure consiste à contrôler la qualité de chaque lot de production de lames (soit 15 lames). Pour cela, nous utilisons l'extrait de référence à deux concentrations : 0.3 et 0.6 mg/mL avec ajout de dCTP-Cy3 dans le mix réactionnel. Sept dépôts identiques pour chacune des concentrations sont effectués sur les pavés d'une même lame. Les intensités de fluorescence entre les pavés d'une même concentration sont ensuite comparées entre elles en calculant le coefficient de variation entre les différentes lésions. Ce coefficient nous permet d'évaluer la variabilité inter-pavé et il ne doit pas dépasser 10% afin qu'un lot de production de lames soit conforme. De plus, les intensités de fluorescence sont également comparées à d'autres lots de lames indépendants dans leur production permettant ainsi de surveiller la variabilité inter-lots.

La deuxième procédure consiste à ajouter systématiquement, lors des différents tests des extraits protéiques, un contrôle avec l'extrait de référence HeLa en duplicats sur chaque lame à une concentration de 0.6 mg/mL. Il est alors possible de normaliser nos résultats entre eux si la variabilité des intensités de fluorescence de l'extrait de référence entre les différentes lames est trop importante.

L'ensemble des démarches que nous venons de décrire est effectuée pour chaque nouveau lot de production et au cours des différents tests ExSy-SPOT effectués.

4. Analyse statistique

Nous avons effectué des analyses statistiques sur les intensités de fluorescence obtenues avec le test de réparation ainsi que sur les résultats des dosages HPLC-MS/MS. Pour cela, nous avons tout d'abord vérifié les hypothèses de normalité et d'égalité des variances, en utilisant le test de Shapiro-Wilk pour savoir si l'échantillon suit une loi normale. Le test de Bartlett a permis de vérifier l'homogénéité des variances.

Dans le cas où les deux hypothèses sont respectées, nous avons réalisé le test d'ANOVA. Ce test paramétrique permet d'analyser la variance afin d'expliquer le comportement d'une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative ou encore de savoir si les échantillons sont issus d'une même population. Si les hypothèses ne sont pas respectées, nous avons utilisé le test non-paramétrique

de Kruskal-Wallis qui permet de déterminer si les échantillons proviennent d'une même population. Nous considérerons qu'il y aura une différence significative lorsque la p-value sera inférieure à 0.05.

Lorsque les tests de Kruskal-Wallis ou d'ANOVA ont permis de mettre en évidence une différence entre les groupes, nous réalisons des tests post-hoc afin de déterminer quels groupes sont significativement différents entre eux. Suite au test d'ANOVA, nous avons utilisé le test post-hoc de Tukey et dans le cas du test de Kruskal-Wallis, nous avons choisi le test post-hoc de Nemenyi.

Les résultats ont été analysés par le programme d'analyse de statistique R (<https://www.r-project.org/>).

CHAPITRE 3

RESULTATS

Chapitre 3 : Résultats

1. Introduction

Ce chapitre présente les résultats de la réponse cellulaire à deux agents pro-génotoxiques et de leurs métabolites. Il sera divisé en deux parties en fonction de l'agent utilisé. Chaque partie suit la même démarche expérimentale que nous allons détailler ci-dessous.

1. Démarche expérimentale pour l'optimisation de la conception de la puce

Dans le but d'obtenir des informations sur la spécificité des mécanismes de réparation de l'ADN sollicités suite à l'exposition génotoxique, nous allons construire deux nouveaux substrats plasmidiques qui vont contenir les lésions d'intérêt en relation avec les agents génotoxiques que nous allons étudier.

L'objectif est de former par réaction chimique un type de lésion donné dans le substrat plasmidique, qui sera ensuite immobilisé sur la biopuce, avec les substrats déjà disponibles (8oxoG, AbaS, CPD-64 et Glycols). Pour cela, nous utilisons un agent chimique correspondant au métabolite qui va réagir avec l'ADN (CAA ou BPDE) pour entraîner la formation des lésions d'intérêt (Éthénobases ou adduits du BPDE) dans le plasmide.

Il est ensuite nécessaire de vérifier le nombre et la nature des lésions formées par l'agent génotoxique.

Pour cela, d'une part, nous quantifions le nombre de lésions spécifiques formées par HPLC-MS/MS.

D'autre part, nous recherchons d'autres lésions non spécifiques susceptibles d'avoir été créées au cours de la réaction chimique. Deux techniques sont utilisées :

- Le dosage HPLC-MS/MS pour la quantification des lésions oxydatives de type 8oxoG très facilement créées au cours de réactions chimiques à cause de la susceptibilité de la Guanine à l'oxydation et à la présence d'oxygène.
- L'électrophorèse sur gel d'agarose qui permet de s'assurer de l'absence de cassures et donc de l'intégrité du plasmide. Plus précisément, nous vérifions que la forme superenroulée du plasmide est conservée à plus de 85%. Les formes relaxées et linéaires indiquent la présence de cassures simple et double brin.

Une fois que les conditions expérimentales de formation des lésions spécifiques sont établies et validées (concentration en agents génotoxiques, temps, température, ...), le plasmide correspondant est immobilisé sur la puce.

Nous devons ensuite vérifier que le signal de fluorescence qui sera obtenu suite à la réparation par des extraits de ce plasmide sera suffisant et d'intensité équivalente aux signaux obtenus au niveau des autres substrats immobilisés. Ce signal de fluorescence dépend de la quantité de lésions présente sur le plasmide et de l'efficacité de la voie de réparation ciblée.

Nous conduisons donc une réaction d'excision/resynthèse par incubation d'extraits protéiques dans des conditions standards. Si le résultat n'est pas satisfaisant, nous revoyons les conditions expérimentales de préparation des substrats plasmidiques, pour ajuster la quantité de lésions formées.

Nous suivons ainsi une démarche en boucle entre les conditions de traitement du plasmide et la réaction d'excision/resynthèse (Figure 60).

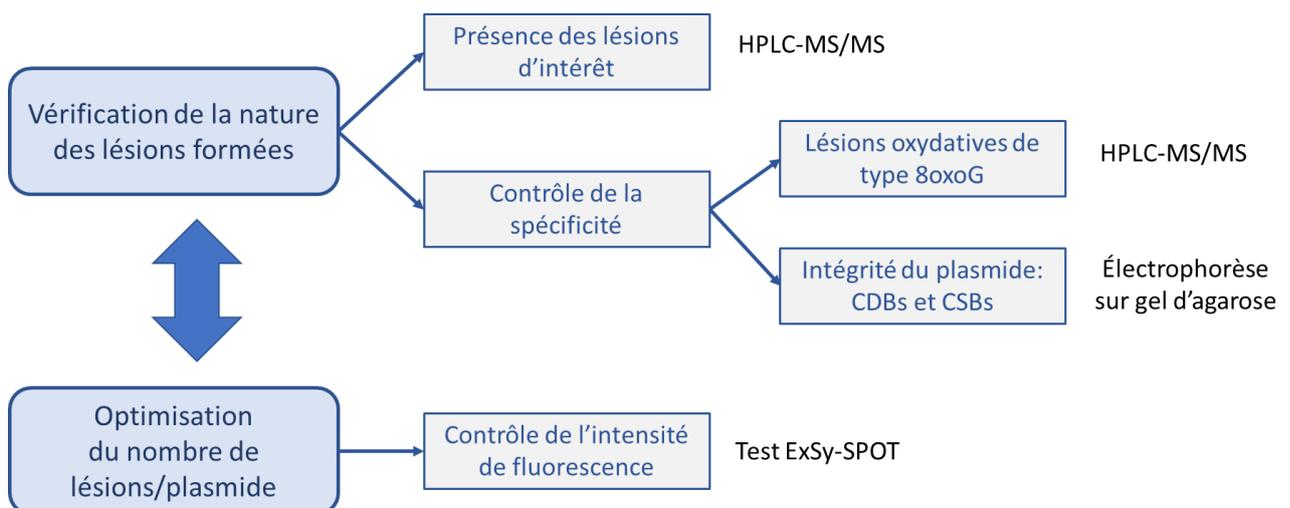


Figure 60 - Démarche expérimentale de préparation des substrats plasmidiques contenant les lésions d'intérêt

2. Démarche expérimentale pour l'étude des conséquences de l'exposition aux agents génotoxiques

Pour l'étude de la réponse cellulaire suite à l'exposition aux différents agents génotoxiques, nous nous sommes intéressés à deux aspects : l'analyse des lésions formées et l'analyse de la réparation de l'ADN.

Pour cela, nous avons utilisé deux techniques :

- Le dosage des lésions formées par HPLC-MS/MS
- Le test de réparation de l'ADN (ExSy-SPOT)

La quantification des lésions formées est une méthode directe pour évaluer l'exposition cellulaire à un agent génotoxique. Elle est aujourd'hui considérée comme une des méthodes de référence pour étudier la génotoxicité de substances endogènes ou exogènes.

Par ailleurs, nous souhaitons mieux comprendre quel peut être l'apport de la mesure de la réparation de l'ADN dans les études d'exposition à des génotoxiques, dans une perspective d'identification de biomarqueurs.

Nous avons exploré trois paramètres que nous évaluerons pour ces deux outils :

1) La réponse cellulaire et sa variabilité

Pour explorer la variabilité cellulaire, nous avons choisi deux lignées cellulaires appropriées pour cette étude en termes de modèle d'exposition et de capacités de métabolisation.

Notre choix s'est porté sur l'utilisation de lignées cellulaires humaines du fait de leur facilité d'utilisation, de leur division rapide et de leur durée de vie importante. Plusieurs lignées cellulaires sont utilisées dans le cadre de l'étude de la toxicité des agents génotoxiques (HEL, BEAS-2B, Caco-2, ...). Nous avons sélectionné deux modèles cellulaires différents : les lignées cellulaires A549 et HepG2 dont les caractéristiques de métabolisation ont été décrites précédemment.

2) Le seuil de la réponse cellulaire

Ce paramètre nous permet d'évaluer la dose la plus faible à partir de laquelle nous observons un effet sur la formation des lésions et la réparation de l'ADN. Afin d'identifier ce seuil, nous avons choisi trois doses : IC_{20} , $IC_{20}/10$ et $IC_{20}/50$. La dose IC_{20} est déterminée par l'utilisation du test de viabilité cellulaire MTT. Cette dose correspond à la concentration en agent génotoxique entraînant 20% de mortalité cellulaire. Cette dose a été préférée à IC_{50} car idéalement, elle correspond à un faible niveau de toxicité pouvant induire une réponse spécifique à travers l'évaluation de la signature enzymatique de réparation. De plus, IC_{20} permet la formation de dommages à l'ADN sans entraîner une mort cellulaire de type apoptose ou nécrose excessive qui conduirait à des niveaux élevés de nucléases.

Dans le cadre de cette étude, ces trois doses seront utilisées à deux temps de traitement : 24 et 48h. Ces deux temps correspondent à des temps classiquement utilisés pour évaluer la génotoxicité de composés. De plus, des tests préliminaires ont permis d'observer des effets plus marqués à ces deux temps de traitements qu'à des temps plus courts (résultats non présentés).

3) La spécificité de la réponse cellulaire

L'objectif de ce dernier paramètre est d'examiner la relation entre l'agent génotoxique, les lésions formées et les voies de réparation.

Pour cela, nous avons décrit dans le premier chapitre les caractéristiques des différents agents que nous avons sélectionnés ; nous avons suivi au cours du traitement la formation des lésions formées dans l'ADN cellulaire par dosage HPLC-MS/MS ; puis dans un dernier temps, nous avons incubé les différents extraits protéiques avec le test ExSy-SPOT afin d'obtenir différents profils de réparation.

Ces différentes informations ont été analysées et regroupées afin de déterminer si la spécificité des lésions formées par HPLC-MS/MS et la signature enzymatique de réparation nous permet de discriminer la nature de l'agent génotoxique étudié et la dose d'exposition.

Par ailleurs, pour chaque agent génotoxique, nous avons utilisé leur précurseur nécessitant une étape de métabolisation préalable par les cellules avant de former des lésions dans l'ADN. Cette démarche permet d'évaluer si le nombre de lésions formées et les signatures enzymatiques de réparation varient ou non en fonction de cette étape de métabolisation.

En fonction des signatures enzymatiques de réparation obtenues, nous discuterons de l'identification possible de nouveaux biomarqueurs suite à une exposition.

La démarche expérimentale de cette deuxième partie que nous venons de décrire est résumée ci-dessous :

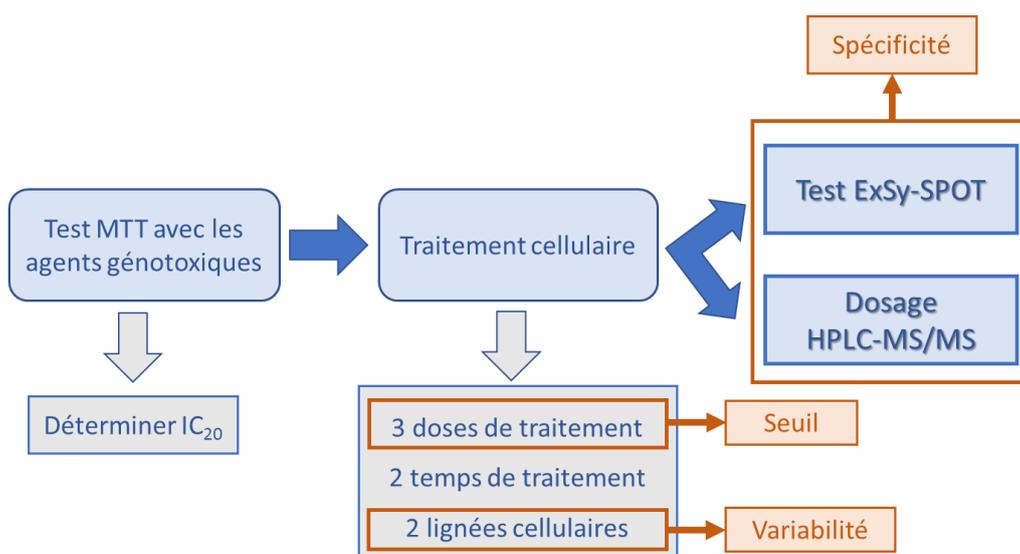


Figure 61 - Démarche expérimentale pour l'exploration de la réponse cellulaire ainsi que les paramètres évalués en vue d'identifier des biomarqueurs

2. Etude de la réponse cellulaire au CAA et son précurseur l'IFO

2.1. Optimisation de la formation des lésions Ethénobases dans le plasmide pour le test ExSy-SPOT

Nous avons utilisé le composé CAA pour former spécifiquement des lésions Ethénobases. C'est d'ailleurs par l'utilisation de ce composé que ce type de lésions a été découvert comme nous l'avons vu précédemment (Chapitre 1).

2.1.1. Analyse des lésions Ethénobases par HPLC-MS/MS

Nous quantifions le nombre de lésions Ethénobases par analyse HPLC-MS/MS. La quantification est réalisée par calibration externe à l'aide d'un standard composé de ϵ dA, ϵ dG et ϵ dC dont le chromatogramme est présenté sur la Figure 62. L'intensité du pic ϵ dA est plus importante que pour les deux autres Ethénonucléosides traduisant une meilleure sensibilité pour la détection de ce type d'Ethénonucléosides comparée à ϵ dG et ϵ dC.

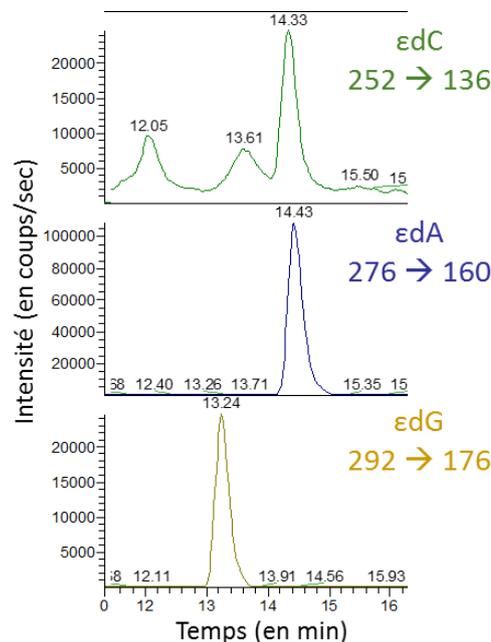


Figure 62 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection de 1 pmol de standard Ethénonucléosides (ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG)

2.1.2. Cinétique de formation des Ethénobases dans l'ADN de thymus de veau

Suite à des études préliminaires, l'objectif initialement fixé était d'obtenir un plasmide contenant une trentaine de lésions Ethénobases.

Par souci d'économie des substrats plasmidiques, nous avons effectué un premier test sur de l'ADN de thymus de veau à 1 mg/mL dilué dans du tampon K_2HPO_4/KH_2PO_4 à 10 mM, en utilisant une concentration finale de 100 mM de CAA. Le nombre de lésions a été suivi en effectuant une cinétique sur 42h à 37°C (résultats non présentés). Les résultats ont montré que la formation des lésions Ethénonucléosides est linéaire entre 0 et 24h de traitement puis un plateau est atteint à partir de 24h. Le maximum de lésions Ethénonucléosides formées est d'environ 70 lésions/6 000 nucléosides normaux. Le nombre de lésions est exprimé ainsi car cela correspond à la taille du plasmide utilisé. Par ailleurs, le traitement n'entraîne pas de formation de lésions oxydatives de type 8oxoG. Après 24h de traitement, le taux de lésions est trop important comparé à ce que nous souhaitons obtenir.

2.1.3. Formation des Ethénobases dans le plasmide

Suite à ces premiers résultats, nous avons effectué un premier test en traitant en parallèle de l'ADN de thymus de veau et le plasmide à 100 mM de CAA pendant 2h (résultats non présentés). Le plasmide est dilué à 1 mg/mL dans du PBS 1X. Ce temps de traitement court de 2h a été choisi afin de ne pas former un nombre trop important de lésions et également d'éviter une dégradation trop importante du plasmide. En comparant le nombre de lésions formées dans l'ADN de thymus de veau et le plasmide, nous avons constaté que le traitement CAA entraîne une formation 5 fois plus importante de lésions dans l'ADN de thymus de veau que dans le plasmide. Cette différence est probablement due à la forme superenroulée du plasmide qui restreint l'accessibilité des bases au composé génotoxique rendant la formation des lésions plus difficile que sur l'ADN linéaire.

Nous avons donc effectué une nouvelle expérience que nous avons réalisée trois fois de manière indépendante afin de contrôler également la répétabilité de la réaction. Pour cela, trois concentrations ont été testées sur le plasmide pendant 2h à 37°C : 100, 150 et 200 mM de CAA. La Figure 63 montre les résultats du dosage avec la quantité de chaque Ethénonucléosides formés (ϵ dA en bleu, ϵ dG en orange et ϵ dC en gris). La courbe en rouge représente la somme des trois Ethénonucléosides en fonction de la concentration en CAA.

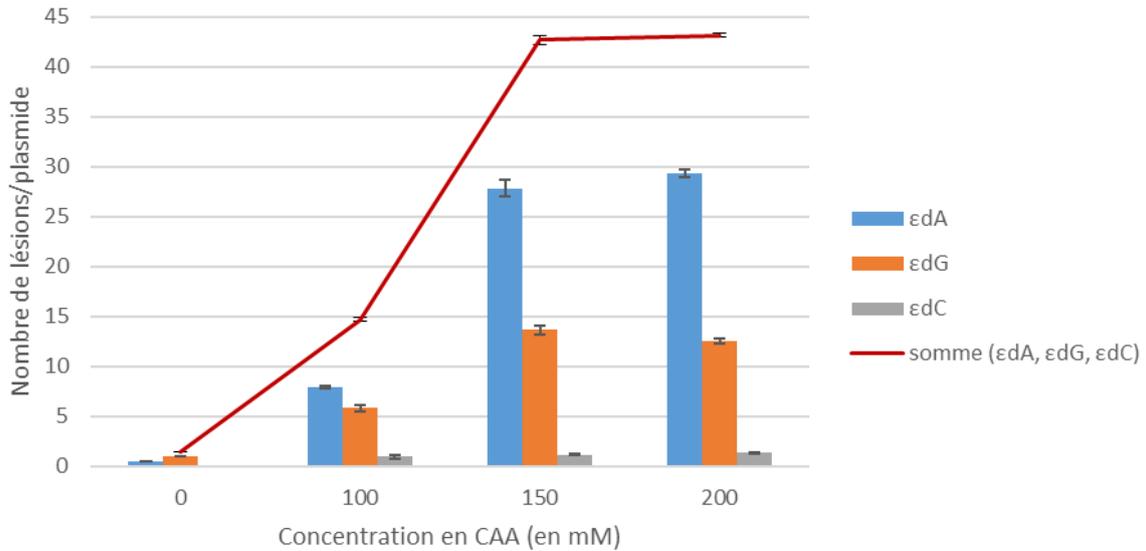


Figure 63 - Test de reproductibilité de formation des Ethénonucléosides dans le plasmide après traitement avec trois concentrations en CAA : 100, 150 et 200 mM par dosage HPLC-MS/MS. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

En observant la courbe rouge, nous constatons que la formation d’Ethénonucléosides est linéaire entre 0 et 150 mM CAA. A partir de 150 mM de CAA, un plateau est atteint avec environ 40 lésions formées dans le plasmide. Pour les trois concentrations testées, le coefficient de variation est inférieur à 5%, ce qui montre une forte robustesse des conditions de traitement du plasmide.

L’histogramme de la Figure 64 détaille le pourcentage de formation des trois Ethénonucléosides pour les trois conditions de traitement. La formation de εdA est majoritaire pour les trois concentrations avec en moyenne 60% εdA, suivi de εdG avec environ 35% et d’une très faible proportion de εdC (moins de 5%). La proportion de εdA augmente légèrement lorsque la concentration en CAA augmente tandis que la proportion de εdG diminue.

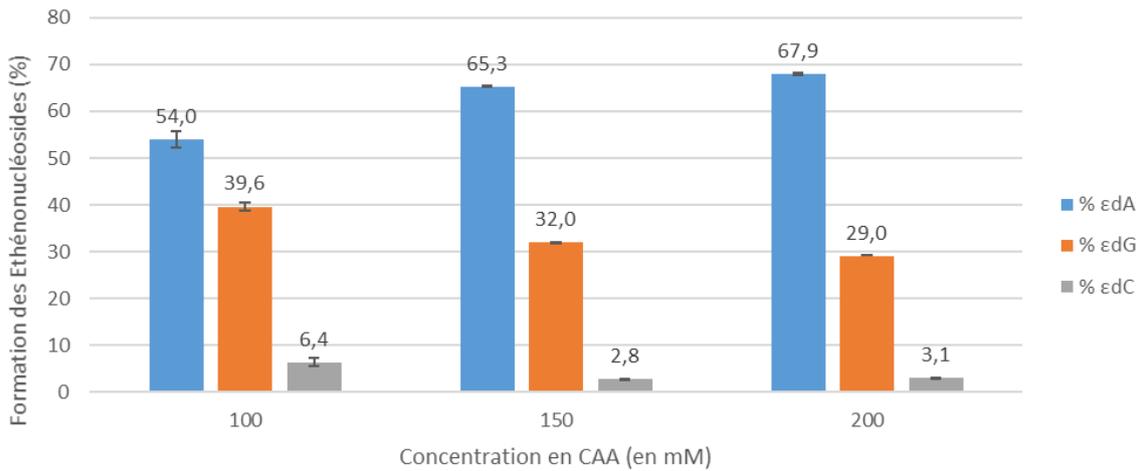


Figure 64 - Comparaison de la proportion des trois types d’Ethénonucléosides formés dans le plasmide suite au traitement avec le CAA. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Comme évoqué précédemment, la méthode de dosage est plus sensible pour la détection de εdA que pour εdG et εdC (Figure 62). De plus, concernant la transition MRM 252 → 136 (εdC), nous constatons qu’un pic sort très proche de celui de εdC, ce qui complexifie l’intégration de celui-ci pour la quantification de εdC (Figure 65). La quantification n’est donc pas absolue.

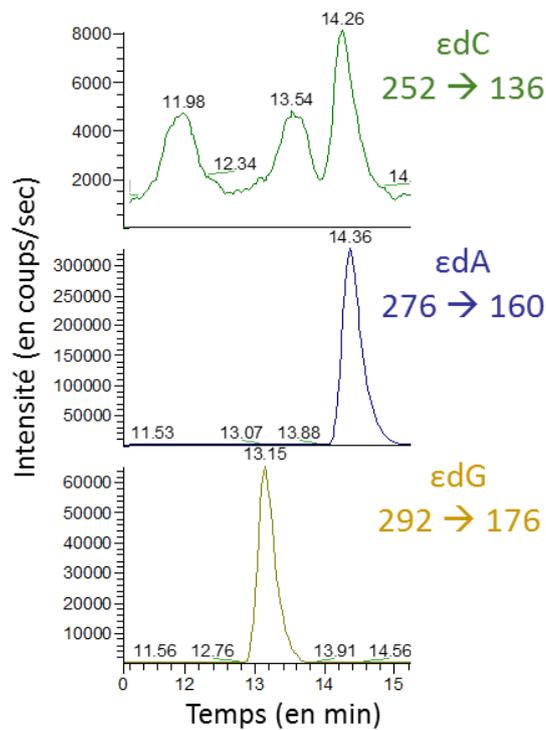


Figure 65 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection du plasmide traité à 100 mM CAA

Enfin, nous devons nous assurer de la spécificité de la réaction en vérifiant deux paramètres. Tout d'abord, nous ne détectons pas de lésions oxydatives de type 8oxodG par HPLC-MS/MS (résultats non présentés). Puis, la présence de cassures simple et double brin est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 66).

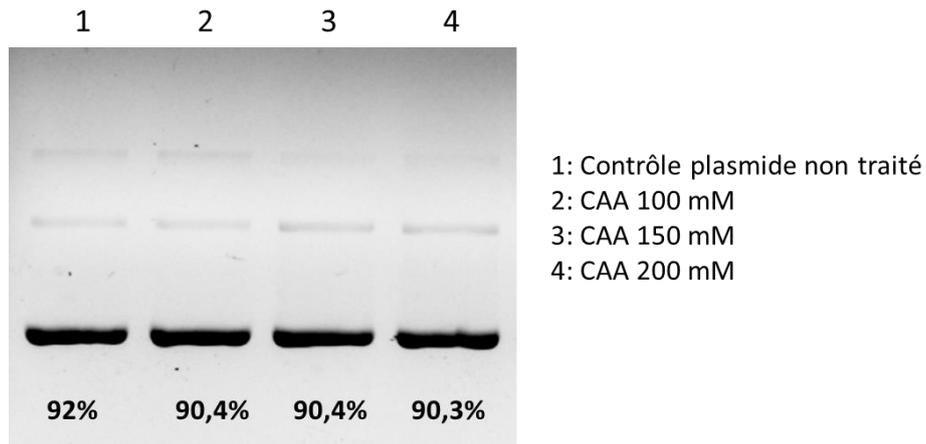


Figure 66 - Electrophorèse sur gel d'agarose 0.8% avec marquage BET : la forme superenroulée du plasmide est de 92, 90.4, 90.4 et 90.3% respectivement pour les puits 1, 2, 3 et 4

L'intégrité du plasmide est respectée puisque la forme superenroulée du plasmide est supérieure à 85% pour l'ensemble des conditions.

2.1.4. Contrôle du signal avec le test ExSy-SPOT

Tous les critères étant remplis, les plasmides sont donc immobilisés sur les lames afin d'évaluer le profil de réparation obtenu via le test de réparation. Nous avons sélectionné uniquement deux substrats plasmidiques puisqu'à 150 et 200 mM, nous formons le même nombre de lésions par plasmide.

La réaction d'excision/resynthèse est effectuée en utilisant du dCTP-Cy3 et l'extrait de référence HeLa à deux concentrations : 0.2 et 0.6 mg/mL. Les résultats sont présentés sur la Figure 67 pour la condition de traitement 100 mM et la Figure 68 pour 200 mM CAA.

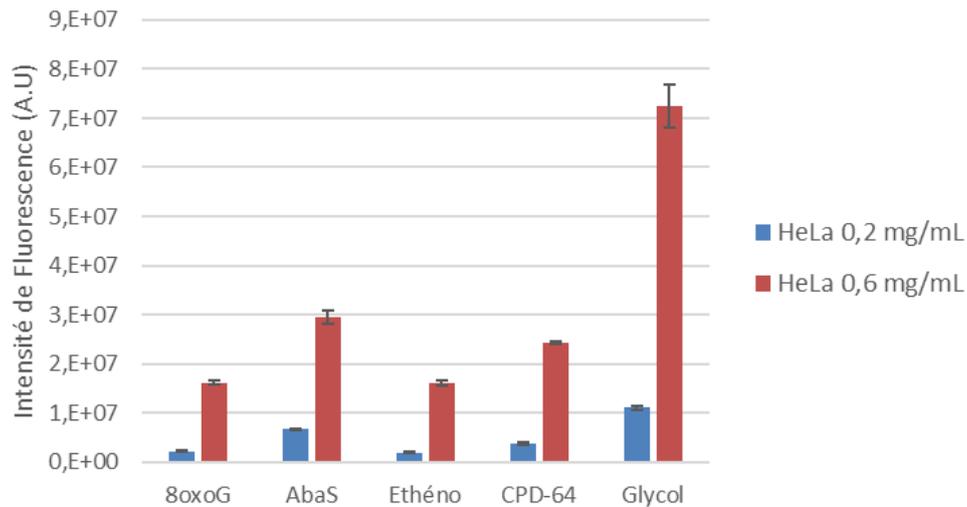


Figure 67 - Profil de réparation obtenu avec des extraits HeLa aux concentrations 0.2 et 0.6 mg/mL en utilisant le plasmide traité avec **100 mM CAA**

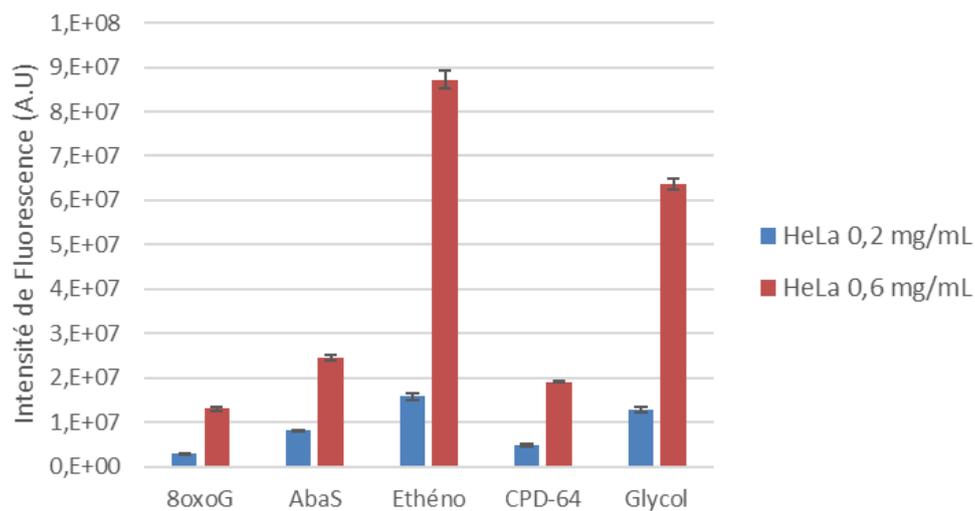


Figure 68 - Profil de réparation obtenu avec des extraits HeLa aux concentrations 0.2 et 0.6 mg/mL en utilisant le plasmide traité avec **200 mM CAA**

Nous obtenons bien une dose-réponse au niveau des signaux de réparation en fonction de la concentration en extraits utilisée. De plus, le signal de fluorescence est dépendant de la quantité de lésions. En effet, au niveau de la lésion Ethéno, l'intensité de fluorescence est en moyenne 7 fois plus importante dans la condition CAA 200 mM que CAA 100 mM.

L'intensité de fluorescence obtenue au niveau de Ethéno est trop élevée pour la condition CAA 200 mM comparée aux signaux obtenus pour les autres lésions. En revanche, celle de la condition 100 mM est du même ordre de grandeur que la lésion 8oxoG.

L'ensemble de ces expériences nous permet de conclure que la concentration de traitement en CAA qui convient le mieux est de 100 mM.

En conclusion, afin d'obtenir un profil de réparation correct au niveau de la lésion Ethéno, les conditions de réaction validées sont de traiter le plasmide pendant 2h à 37°C à 100 mM de CAA. Ces conditions de traitement respectent nos différents critères de validation :

- la formation de lésions Ethénobases est d'environ 15 lésions par plasmide en proportion suivante : 54% εA, 40% εG et 6% εC,
- la spécificité est respectée : il n'y a pas d'autres types de dommages qui sont formés (8oxoG et cassures simple et double brin),
- la reproductibilité de la réaction est bonne (> 95%).

2.1.5. Autres paramètres testés

Plusieurs autres paramètres ont également été testés afin d'évaluer leur influence sur la formation des Ethénobases. Par exemple, nous avons utilisé un pH 6 au lieu de 7 (PBS) afin de favoriser la dernière étape de transformations des hydroxyéthénobases en Ethénobases. Cependant, aucune différence n'a été observée dans le nombre de lésions formées. Nous avons également dilué le plasmide dans H₂O au lieu du PBS. Le nombre de lésions formées est un peu plus élevé dans H₂O aux mêmes concentrations. Cependant, le plasmide est très dégradé. Ceci est probablement dû au NaCl contenu dans le PBS, or les ions Na⁺ stabilisent l'ADN en formant un écran protecteur de contre-ions autour de la double hélice.

2.2. Test de viabilité cellulaire et traitement cellulaire avec le CAA et l'IFO

2.2.1. Survie cellulaire après traitement avec les agents génotoxiques CAA et IFO

Le test MTT est utilisé pour mesurer la cytotoxicité des composés génotoxiques IFO et CAA. L'objectif est de déterminer la dose IC₂₀. L'expérience a été réalisée en triplicats.

Les résultats de la Figure 69 sont présentés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle (cellules non traitées). En abscisse, l'échelle utilisée est le logarithme de la concentration en CAA. Le test a été effectué sur une gamme de concentration entre 10 nM et 1 mM en effectuant une dilution en cascade au 1/5^e. Les deux lignées cellulaires A549 (en bleu) et HepG2 (en orange) ont été incubées avec le composé CAA pendant 24 et 48h. Pour l'ensemble des résultats (dosage des lésions et tests de réparation) de ce chapitre, nous conserverons ce code couleur qui nous permet de discerner

rapidement les résultats obtenus pour les deux lignées cellulaires utilisées : A549 en bleu et HepG2 en orange.

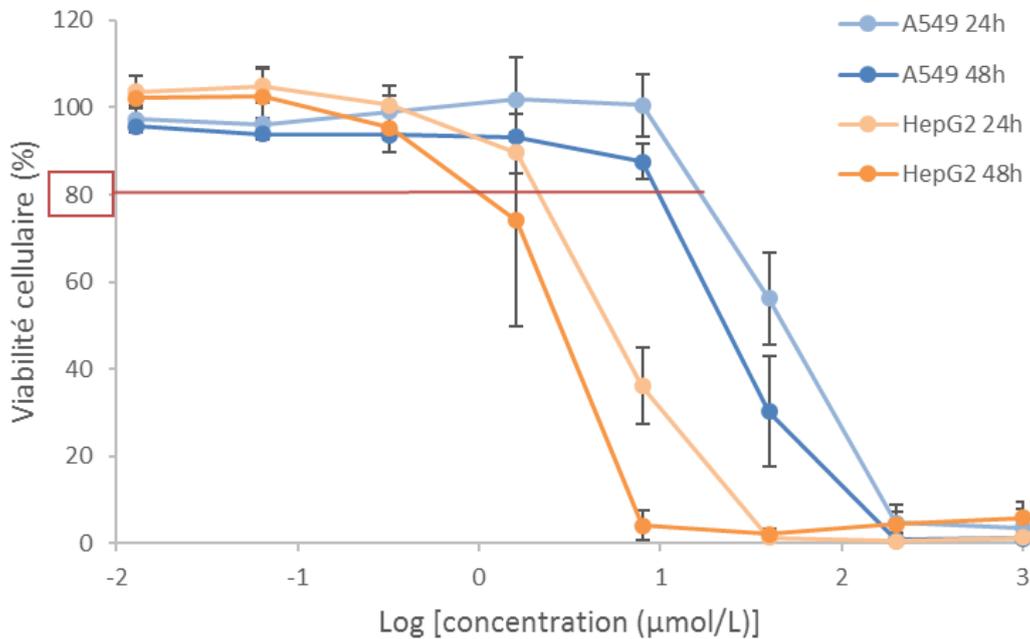


Figure 69 - Courbe de cytototoxicité du composé CAA après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

La lignée cellulaire HepG2 est plus sensible au composé CAA que la lignée A549. En effet, après 24h de traitement, la dose IC_{20} pour le composé CAA est évaluée à environ 40 µM et 4 µM respectivement pour les lignées A549 et HepG2. Pour le temps de traitement de 48h, cette dose est estimée à environ 20 µM et 2 µM respectivement pour les lignées A549 et HepG2. Par comparaison des doses IC_{20} entre les deux lignées cellulaires, la lignée A549 apparaît donc en moyenne 10 fois plus résistante au CAA que la lignée HepG2.

Ce même test a été effectué avec le composé IFO en utilisant une gamme de concentration de 150 nM à 19 mM en effectuant une dilution en cascade au $1/2^e$. Les résultats sont présentés sur la Figure 70 :

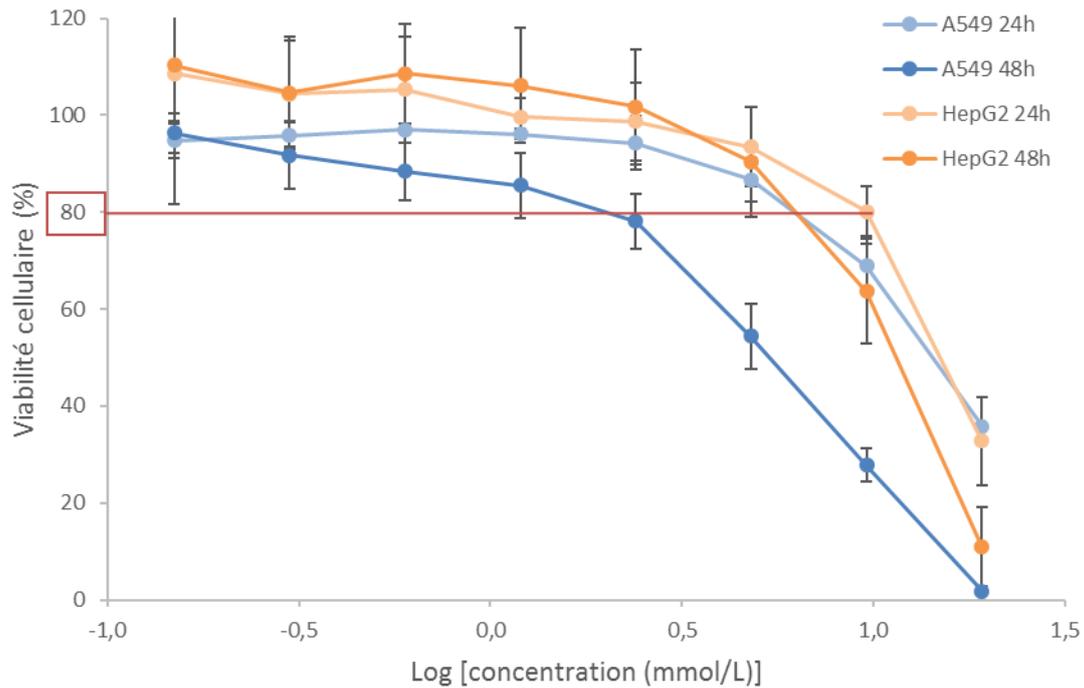


Figure 70 - Courbe de cytotoxicité du composé IFO après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Contrairement au CAA, nous observons que la lignée A549 est plus sensible au composé IFO que la lignée HepG2. Après 24h de traitement, la dose IC_{20} pour le composé IFO est évaluée à environ 6 mM et 9.6 mM respectivement pour les lignées A549 et HepG2. Pour le temps de traitement de 48h, cette dose est estimée à environ 2 mM et 6.7 mM respectivement pour les lignées A549 et HepG2. Par comparaison des doses IC_{20} entre les deux lignées cellulaires, la lignée HepG2 apparaît en moyenne environ 2 fois plus résistante à l'IFO que la lignée A549.

Il est également intéressant de noter que le temps de traitement affecte peu la viabilité cellulaire pour la lignée HepG2 contrairement à la lignée A549 qui est bien plus sensible au temps de traitement de 48h que de 24h. Cette différence entre 24 et 48h pour la lignée A549 peut s'expliquer par un délai de métabolisation du composé.

Un tableau récapitulatif des différentes doses que nous allons utiliser pour la suite des expériences est présenté sur le Tableau 12.

Composé	Lignées cellulaires	A549		HepG2	
		24h	48h	24h	48h
CAA (μM)	IC ₂₀	40	20	4	2
	IC ₂₀ /10	4	2	0,4	0,2
	IC ₂₀ /50	0,8	0,4	0,08	0,04
IFO (μM)	IC ₂₀	6000	2000	9600	6700
	IC ₂₀ /10	600	200	960	670
	IC ₂₀ /50	120	40	192	134

Tableau 12 - Résumé des différentes concentrations utilisées pour les deux composés CAA et IFO en fonction des deux lignées cellulaires : A549 et HepG2

Par comparaison des doses IC₂₀ des deux composés par lignée, nous constatons que pour la lignée HepG2, la dose IC₂₀ de l'IFO est en moyenne 3 000 fois supérieure à celle du CAA à la différence de la lignée A549 qui n'est que 120 fois supérieure. En résumé, la lignée HepG2 est très sensible au composé CAA et beaucoup moins au composé IFO tandis que l'inverse est observé pour la lignée A549.

2.2.2. Traitement cellulaire

Nous avons effectué les traitements avec les deux agents sur les deux lignées cellulaires. Pour chaque composé (CAA et IFO) et temps de traitement (24 et 48h), nous avons quatre conditions :

- Contrôle : cellules non traitées (noté Ctrl)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀ (notées IC₂₀)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀/10 (notées IC₂₀/10)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀/50 (notées IC₂₀/50)

Les expériences ont également été réalisées en triplicats.

2.3. Caractérisation des activités de réparation de l'ADN en réponse au CAA et à l'IFO

2.3.1. Dosage des lésions par HPLC-MS/MS

2.3.1.1. Les lésions Ethénonucléosides

Le traitement avec les différentes doses n'induit aucune augmentation significative du nombre d'Ethénobases dans l'ADN. La Figure 71 présente un exemple obtenu pour la lignée A549 traitée ou non à l'IFO à la dose IC₂₀. Les lésions sont présentes à l'état basal entre 1 et 2 Ethénonucléosides/10⁶ nucléosides normaux. Nous notons une légère augmentation du nombre d'Ethénonucléosides suite au traitement mais qui n'est pas statistiquement significative.

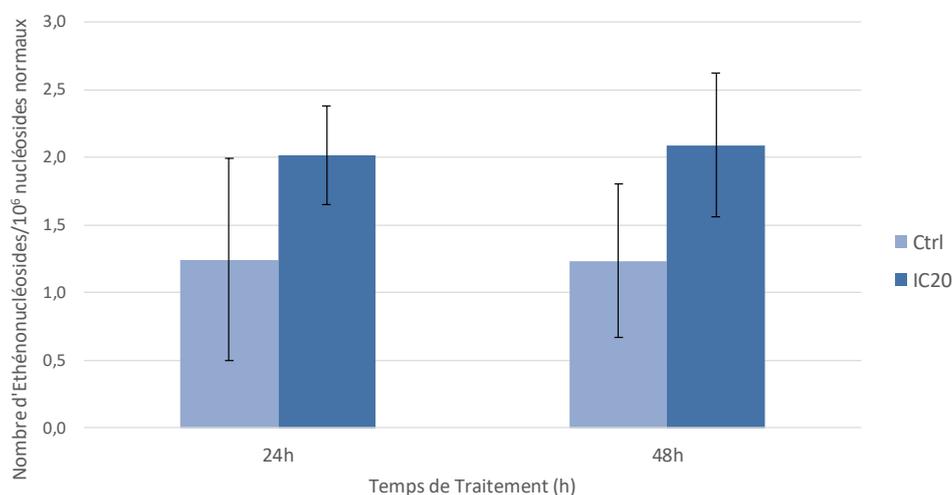


Figure 71 - Formation des lésions Ethénonucléosides (ϵ dG, ϵ dA et ϵ dC) dans les cellules **A549** traitées à la dose IC₂₀ avec le composé **IFO** pendant 24 et 48h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Il est important de noter que lors des analyses, le seul pic détecté par HPLC-MS/MS est celui de ϵ dG et parfois ϵ dA (Figure 72). Or, nous avons vu précédemment que la méthode d'analyse développée pour le dosage de ces lésions est plus sensible pour la détection de ϵ dA. Nous pouvons donc en conclure que le niveau basal de ϵ dG est plus important que celui de ϵ dA et ϵ dC au niveau de l'ADN cellulaire. Ceci a également été observé pour la lignée A549 dans une autre étude (Danielsen et al., 2011). Le chromatogramme en Figure 72 illustre bien la difficulté que nous avons rencontrée pour le dosage de ces lésions dans l'ADN cellulaire. En effet, la sensibilité de détection de ces lésions reste faible malgré l'optimisation des paramètres de détection et l'augmentation de la quantité d'ADN cellulaire injectée. Dans ces conditions, nous atteignons la limite de sensibilité du dosage, ce qui explique également les écarts-types importants. En conclusion, nous observons une tendance à l'augmentation du nombre

d'Éthénobases dans l'ADN cellulaire suite au traitement avec les deux composés mais qui n'est pas significative.

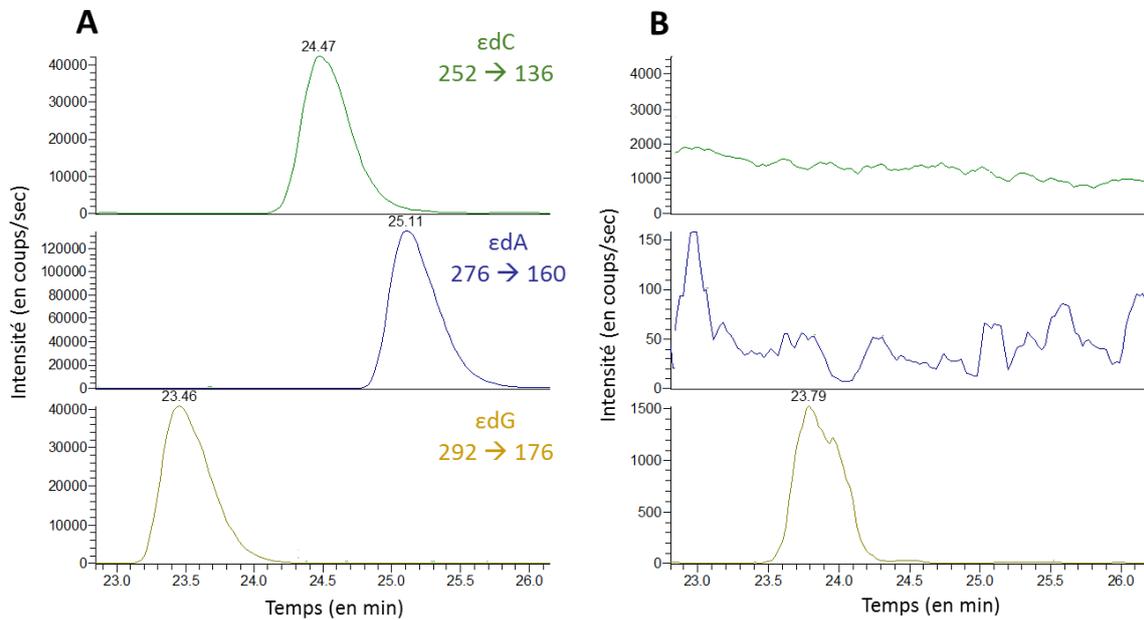


Figure 72 - Chromatogramme obtenu par HPLC-MS/MS après injection : A) de 1 pmol de standard Ethénonucléosides (ϵ dA, ϵ dC et ϵ dG) - B) d'un échantillon d'ADN cellulaire de la lignée A549 traitée avec IFO à la dose IC_{20} 24h

2.3.1.2. Les lésions 8oxodG

Les traitements cellulaires à l'IFO et au CAA n'induisent pas de formation de 8oxoG puisqu'aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le contrôle et les cellules traitées.

La Figure 73 montre un exemple obtenu avec la lignée A549 traitée ou non au CAA à la dose IC_{20} . Ces lésions sont également présentes à l'état basal entre 1 et 2 lésions 8oxodG/ 10^6 nucléosides normaux. Nous remarquons une légère augmentation uniquement pour le temps de traitement de 24h mais qui n'est pas significative.

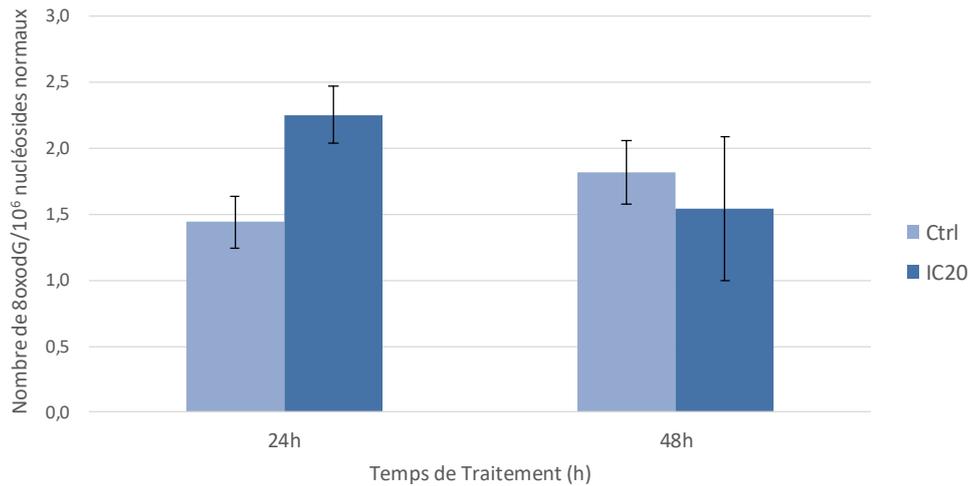


Figure 73 - Formation des lésions oxydatives de type 8oxodG dans les cellules **A549** traitées à la dose IC₂₀ avec le composé **CAA** pendant 24 et 48h. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

2.3.2. Le test ExSy-SPOT

2.3.2.1. Normalisation des données par les extraits HeLa

Avant d'analyser les échantillons des cellules A549 et HepG2 traitées, nous contrôlons la variabilité inter-lame en utilisant l'extrait de référence HeLa déposé en duplicats sur chaque lame. Le coefficient de variation inter-lame ne doit pas dépasser 10%.

Pour cette première étude sur l'IFO et le CAA, les tests de réparation ont été effectués sur 4 jours à raison de 4 lames par jour. Les intensités de fluorescence pour l'extrait de référence sont moyennées par jour (Figure 74).

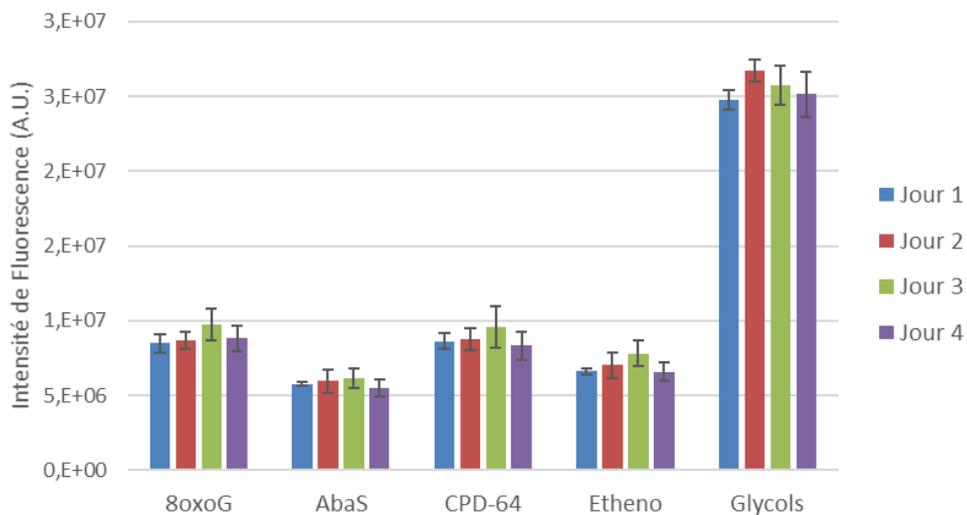


Figure 74 - Profil de réparation obtenu avec l'extrait de référence **HeLa** à la concentration 0.6 mg/mL en dCTP-Cy3

Les intensités de fluorescence obtenues entre les différents jours sont homogènes et le coefficient de variation est inférieur à 10% pour l'ensemble des lames. Nous analysons également d'autres paramètres comme la contribution relative de chaque lésion qui ne présente pas de variation (résultats non présentés). L'ensemble des paramètres analysés est conforme au seuil fixé.

2.3.2.2. Niveau basal de réparation des lignées cellulaires utilisées

Dans les conditions standards optimisées au laboratoire, les tests de réparation sont effectués en utilisant le dCTP-Cy3 comme nucléotide marqué et une concentration finale en extraits protéiques de 0.15 mg/mL.

Avant d'effectuer l'ensemble des tests, nous nous sommes intéressés au niveau basal des activités enzymatiques de réparation des deux lignées cellulaires afin de vérifier que les conditions standards sont adaptées. La Figure 75 présente les profils de réparation obtenus pour la lignée cellulaire A549 (en bleu) et la lignée HepG2 (en rouge).

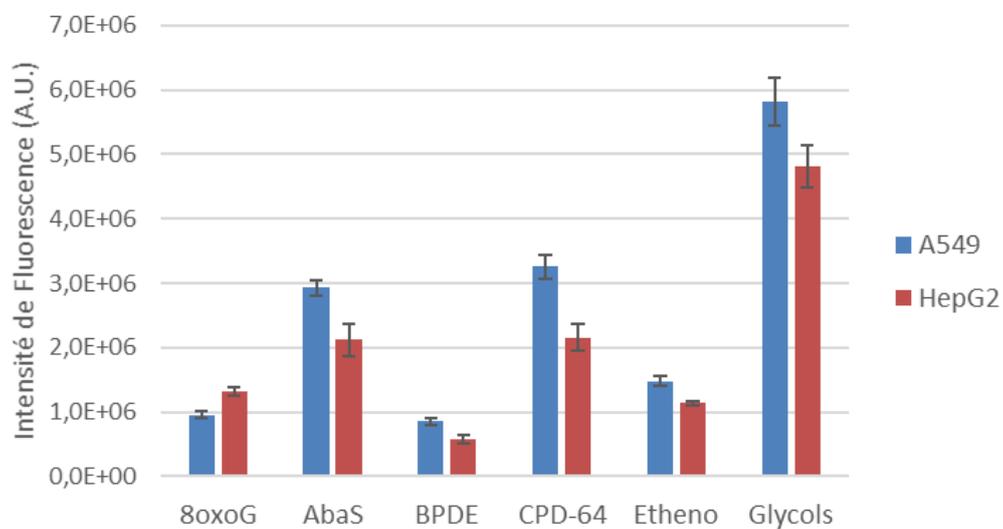


Figure 75 - Profil de réparation obtenu avec les extraits protéiques des lignées **A549** (en bleu) et **HepG2** (en rouge) à la concentration de 0.15 mg/mL en **dCTP-Cy3**

Le test ExSy-SPOT comporte quatre lésions réparées principalement par la voie de réparation BER (8oxoG, AbaS, Etheno et Glycols) et deux lésions réparées par la voie NER (CPD-64 et BPDE). L'état basal des cellules A549 est plus élevé que celui des cellules HepG2 puisque les intensités de fluorescence au

niveau des différentes lésions sont plus importantes exceptées pour 8oxoG. Les cellules A549 possèdent donc des capacités de réparation plus élevées que les cellules HepG2.

Si nous comparons maintenant les contributions relatives de chaque voie de réparation pour les deux lignées cellulaires à l'état basal, nous obtenons les deux diagrammes suivants (Figure 76) :

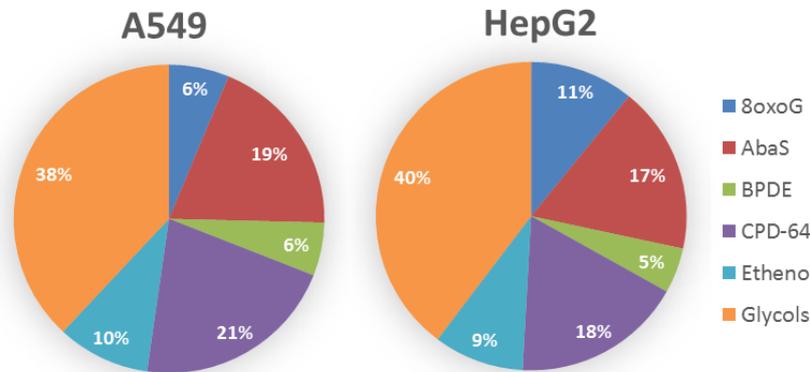


Figure 76 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion sur la lignée cellulaire **A549** et **HepG2** avec l'utilisation de **dCTP-Cy3**

Ces diagrammes nous apportent des informations sur les voies de réparation mises en œuvre au cours du test de réparation. En effet, par exemple, nous constatons qu'au niveau de la lésion 8oxoG, la lignée HepG2 (11%) possède des activités de réparation plus importantes que la lignée A549 (6%) tandis que cette dernière (21%) a des activités de réparation plus élevées au niveau des dommages induits par les UV (CPD-64) comparées à la lignée HepG2 (18%). Malgré ces quelques différences, les profils de réparation restent globalement similaires pour les deux lignées cellulaires.

Les intensités de fluorescences étant homogènes entre les différentes lésions présentes sur la puce, nous avons donc effectué les tests de réparation dans ces conditions standards.

2.3.2.3. Analyse de la réparation de l'ADN en réponse au CAA

L'utilisation du composé CAA n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives aux doses testées et pour les deux lignées cellulaires (résultats non présentés).

2.3.2.4. Analyse de la réparation de l'ADN en réponse à l'IFO

Tout comme le CAA, le composé IFO n'a pas d'effet significatif sur les activités de réparation de l'ADN pour la lignée A549 aux deux temps de traitement (résultats non présentés).

Néanmoins, le test statistique ANOVA a mis en évidence des différences pour la lignée cellulaire HepG2 au temps de traitement de 24h.

La Figure 77 présente les résultats de l'intensité de fluorescence de chaque condition par rapport à l'intensité de fluorescence des cellules contrôles pour chacune des lésions et pour les quatre conditions : non traitées (Ctrl) puis de la dose la plus faible à la plus forte en IFO pendant 24h (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀).

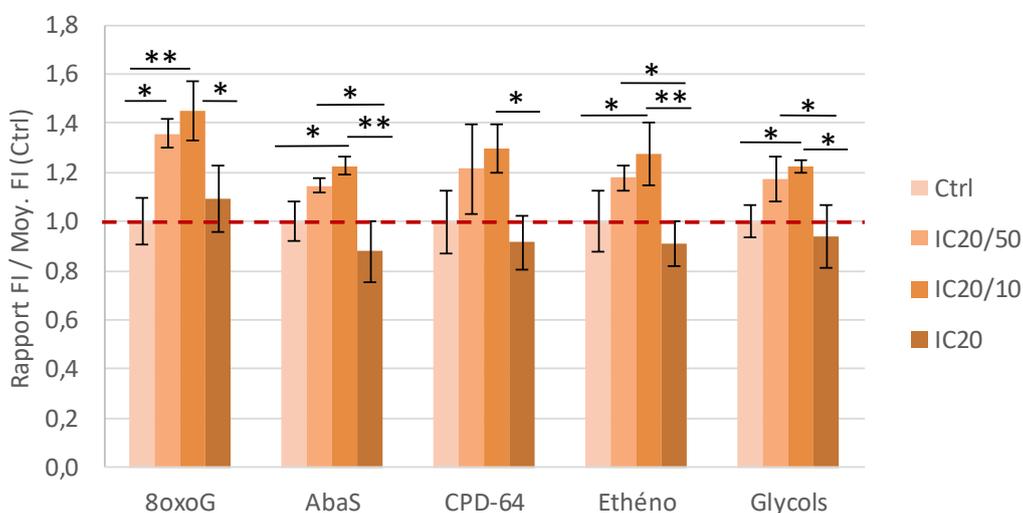


Figure 77 – Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **HepG2** traitée à l'IFO pendant **24h** aux différentes doses (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)

Le Tableau 13 résume les différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées en fonction des lésions présentes sur la puce :

	8oxoG	AbaS	CPD-64	Ethéno	Glycols
Ctrl – IC ₂₀ /50	*(↗)				
Ctrl – IC ₂₀ /10	** (↗)	*(↗)		*(↗)	*(↗)
IC ₂₀ /50 – IC ₂₀		*		*	*
IC ₂₀ /10 – IC ₂₀	*	**	*	**	*

Tableau 13 - Tableau récapitulatif des différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées sur la lignée cellulaire HepG2 traitée ou non à l'IFO. * p<0.05, ** p<0.01 (Test ANOVA). Par rapport au contrôle, une stimulation des activités de réparation (↗) a été constatée pour les deux doses les plus faibles.

Les différentes doses utilisées présentent un effet de l'IFO en cloche. La dose la plus forte (IC_{20}) ne montre aucune différence comparée au contrôle. Les deux autres doses $IC_{20}/10$ et $IC_{20}/50$ présentent quant à elles des différences ; particulièrement pour la dose intermédiaire ($IC_{20}/10$) où nous observons une stimulation des activités de réparation de la voie BER (8oxoG, AbaS, Ethéno, Glycols). Cette stimulation est plus marquée au niveau de 8oxoG. La voie NER (CPD-64) ne semble pas affectée par le traitement IFO aux trois doses testées. A la dose la plus faible ($IC_{20}/50$), nous remarquons également que l'ensemble des activités de réparation est stimulé mais seule 8oxoG est significativement différente du contrôle.

Suite au traitement à l'IFO de la lignée HepG2 pendant 24h, nous obtenons une signature enzymatique de réparation intéressante au niveau de la voie BER et spécifiquement au niveau de 8oxoG.

3. Etude de la réponse cellulaire au BPDE et son précurseur le B[a]P

Nous allons effectuer la même démarche que dans la partie précédente avec le composé B[a]P et son métabolite le BPDE.

3.1. Optimisation de la formation des adduits du BPDE dans le plasmide pour le test ExSy-SPOT

3.1.1. Analyse des adduits BPDE- N^2 -dG par HPLC-MS/MS

L'objectif est d'obtenir un plasmide contenant spécifiquement des dommages induits par l'agent génotoxique BPDE. Nous avons choisi de centrer notre étude sur la formation de l'adduit issu de la voie des diol-époxydes soit l'adduit BPDE- N^2 -G. En effet, comme discuté dans l'introduction, l'étude de la littérature indique que cet adduit stable est celui majoritairement formé. La quantification de cet adduit est réalisée par calibration externe à l'aide d'une gamme de standard BPDE- N^2 -dG dont le chromatogramme est présenté en Figure 78.

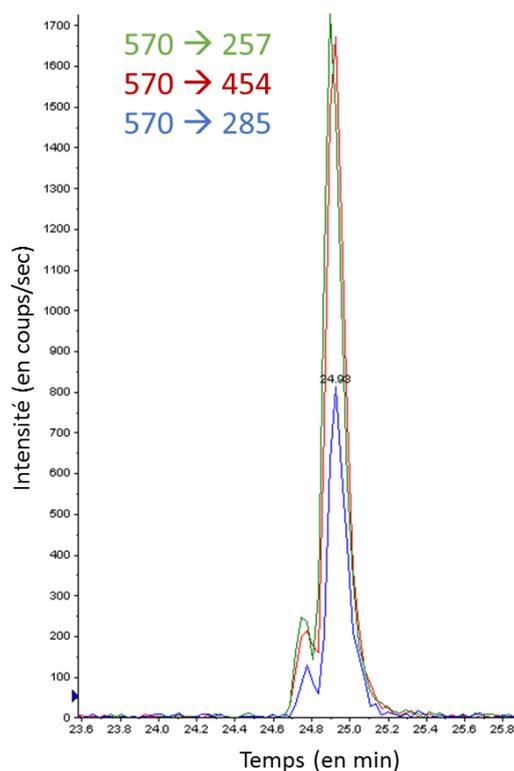


Figure 78 - Chromatogramme obtenu en HPLC-MS/MS après injection de 200 fmol de standard BPDE-N²-dG en MS/MS

3.1.2. Formation des adduits du BPDE dans le plasmide

Nous nous sommes basés sur les précédents travaux effectués par Marie et al. qui ont montré que la formation des adduits du BPDE a lieu très rapidement dans l'ADN de thymus de veau (Marie et al., 2008). En effet, le BPDE possède une très grande réactivité pour l'ADN puisqu'au bout de 5 min, la totalité des adduits est déjà formée. Cependant, étant donné que la formation des lésions semble plus difficile dans le plasmide due à sa forme superenroulée, nous avons choisi un temps de traitement un peu plus long de 2h à 37°C.

L'optimisation de cette lésion a été plus complexe que pour les Ethénobases donc nous avons testé une gamme de concentrations en BPDE plus large comprise entre 15 et 400 μ M. Pour l'ensemble des concentrations, le BPDE a été préalablement dilué dans l'acétonitrile. De plus, le plasmide est dilué à 1 mg/mL dans H₂O au lieu du PBS car nous avons constaté que très peu de lésions étaient formées lorsque le plasmide est dilué dans du PBS.

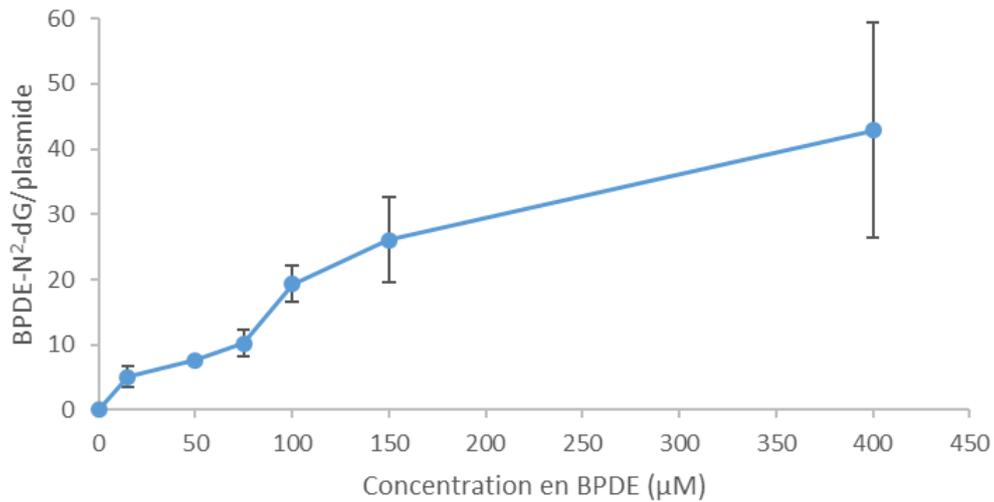


Figure 79 - Formation de l'adduit BPDE-N²-dG dans le plasmide traité au BPDE pendant 2h à 37°C en fonction de la concentration en BPDE. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Le nombre d'adduits BPDE-N²-dG est corrélé à la concentration en BPDE utilisée. Nous constatons que plus la concentration en BPDE augmente, plus l'écart-type est important témoignant d'une mauvaise reproductibilité de la réaction. Ceci a été confirmé en calculant les coefficients de variation pour chacune des concentrations. En effet, celui-ci est proche de 30% pour la concentration maximale de 400 µM.

Concernant la spécificité des lésions formées, aucune lésion oxydative de type 8oxoG n'a été détectée pour l'ensemble des conditions et l'intégrité du plasmide est conservée (résultats non présentés).

3.1.3. Contrôle du signal avec le test ExSy-SPOT

Les tests de réparation ont ensuite été effectués uniquement pour les conditions où le critère de reproductibilité est respecté soit entre 15 et 150 µM.

Les résultats présentés sur la Figure 80 montrent les profils de réparation obtenus pour deux lignées cellulaires : la lignée de référence HeLa (en bleu) et une lignée cellulaire issue d'un hépatocarcinome Huh7 (en rouge) avec le plasmide traité à 100 µM.

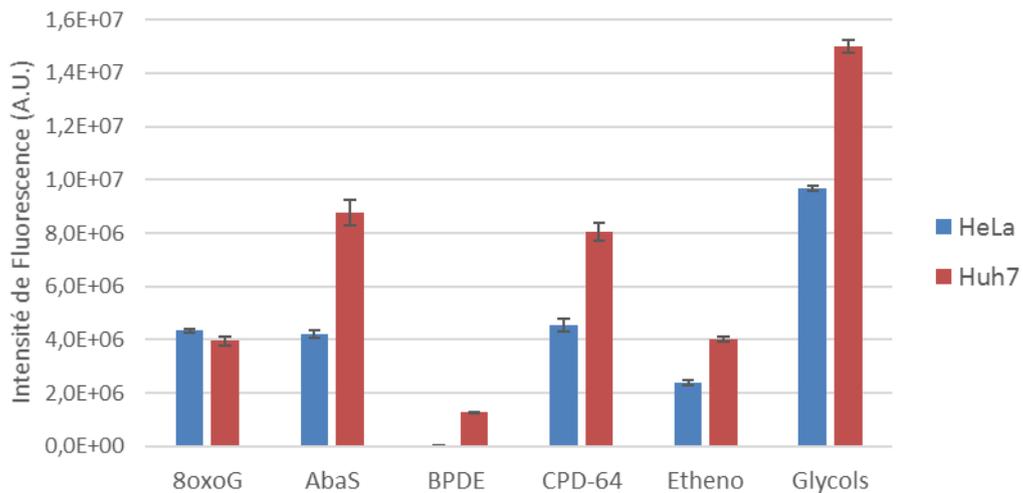


Figure 80 - Comparaison des profils de réparation obtenus avec des extraits **HeLa** et **Huh7** à la concentration de 0.4 mg/mL en utilisant le plasmide BPDE 100 μ M

Pour une même concentration en extrait protéique, nous constatons que le niveau basal des activités de réparation des cellules Huh7 est supérieur à celui des cellules HeLa. De plus, suite au constat que la lignée HeLa présente une intensité de fluorescence faible au niveau de la lésion BPDE, nous avons testé des extraits protéiques provenant de différentes lignées cellulaires. Parmi les lignées cellulaires, nous avons retenu la lignée Huh7 qui présente l'intensité de fluorescence la plus élevée au niveau de la lésion BPDE. Ces résultats révèlent que malgré que ce type de lésion soit principalement réparé par la voie NER, tout comme les lésions CPD-64, nous obtenons un profil de réparation différent. La lésion BPDE est moins bien réparée que les lésions CPD-64 ce qui peut être due à plusieurs facteurs spécifiques à la réparation des lésions BPDE dont nous discuterons plus tard (Chapitre 4).

La phase d'optimisation du substrat plasmidique BPDE a donc été effectuée avec la lignée cellulaire Huh7.

La Figure 81 présente uniquement l'intensité de fluorescence obtenue au niveau de la lésion BPDE en fonction des différents plasmides qui ont été immobilisés sur la puce.

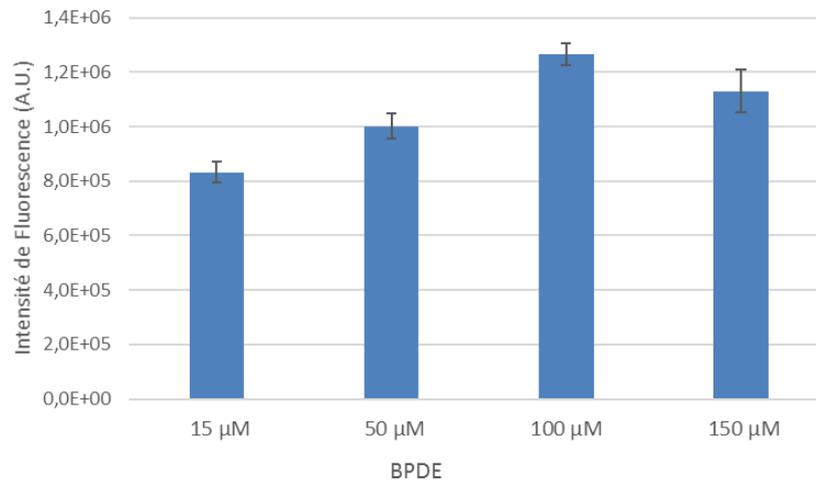


Figure 81 - Profil de réparation obtenu au niveau de la lésion **BPDE** avec l'utilisation des extraits protéiques provenant de la lignée cellulaire **Huh7** à une concentration de 0.4 mg/mL

Nous obtenons bien une dose-réponse au niveau des signaux de réparation en fonction du nombre de lésions présent dans le plasmide jusqu'à 100 µM BPDE. Un plateau est atteint au-delà d'un certain nombre de lésions pouvant s'expliquer par une quantité limitante d'enzymes dans les extraits ou un problème d'accessibilité aux lésions lorsque celles-ci sont présentes en nombre trop important.

La Figure 82 présente le profil de réparation obtenu pour l'ensemble des lésions présentes sur le test de réparation avec le plasmide BPDE 100 µM et l'utilisation de deux concentrations en extraits protéiques Huh7 (0.2 et 0.4 mg/mL).

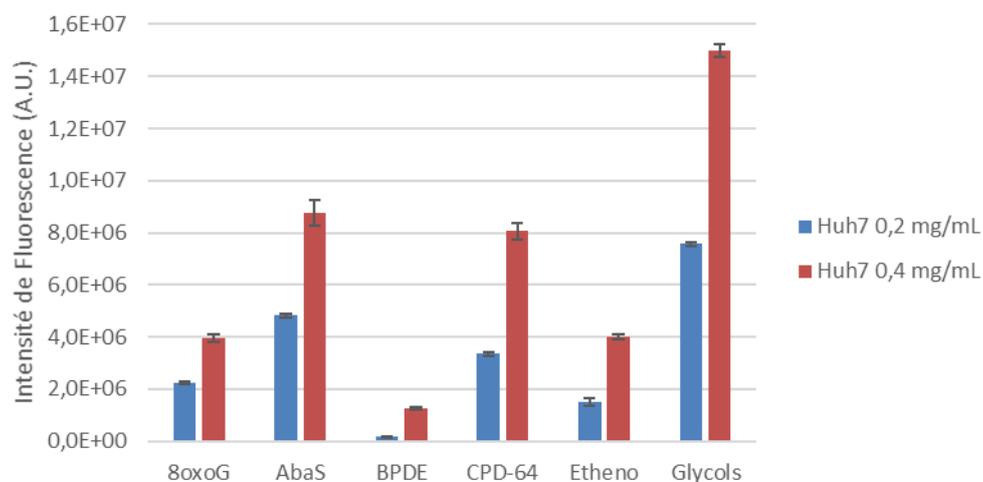


Figure 82 - Profil de réparation obtenu avec des extraits **Huh7** aux concentrations 0.2 et 0.4 mg/mL en utilisant le plasmide **BPDE 100 µM**

Nous observons une dose-réponse au niveau des signaux de réparation en fonction de la concentration en extraits protéiques utilisée. Le signal de réparation est faible comparé aux autres lésions mais, malgré plusieurs tests, nous n'avons pas réussi à améliorer ce signal de fluorescence. Nous avons donc choisi la condition où l'intensité de fluorescence est la plus élevée soit le plasmide traité avec 100 μM BPDE.

Pour conclure, les conditions de réaction validées sont de traiter le plasmide pendant 2h à 37°C à 100 μM BPDE. Ces conditions de traitement respectent nos différents critères de validation :

- la formation d'adduits BPDE-N²-G est d'environ 20 adduits par plasmide,
- la spécificité est respectée : il n'y a pas d'autres types de dommages qui sont formés (8oxoG et cassures simple et double brin),
- la reproductibilité de la réaction est bonne (> 90%).

3.1.4. Autres paramètres testés

L'optimisation de ce substrat plasmidique contenant l'adduit BPDE-N²-G a été plus laborieuse que pour le plasmide contenant les Ethénobases puisque nous avons pu constater que :

- ce type d'adduit est moins réparé que les autres lésions présentes sur la puce,
- nous n'obtenons pas toujours de dose-réponse entre le nombre de lésions présent dans le plasmide et le signal de réparation sur puce,
- la reproductibilité de la réaction n'est pas bonne à de fortes concentrations en BPDE,
- le signal de réparation est faible comparé aux autres lésions.

Nous avons donc exploré plusieurs autres paramètres afin d'essayer d'améliorer le signal de réparation.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la solubilité du BPDE. En effet, celui-ci est très peu soluble donc différents solvants ont été testés : le TEA/THF (solvant dans lequel se trouve la solution mère de BPDE) ; le DMSO et l'ACN. Ces trois solvants n'ont montré aucune différence dans le nombre de lésions formées. Notre choix s'est donc porté vers l'ACN qui présente une meilleure reproductibilité de réaction et qui est simple d'utilisation.

Nous avons ensuite vérifié le problème d'accessibilité du plasmide au génotoxique que nous avons constaté avec le CAA. Pour cela, nous avons linéarisé le plasmide en utilisant une enzyme de restriction avant d'effectuer la réaction chimique avec le BPDE. Nous n'avons pas obtenu de différences significatives dans le nombre de lésions formées. La forme superenroulée ne semble donc pas entrainer de gêne pour la formation de ces lésions.

Enfin, nous avons effectué un dernier test en diminuant le temps de traitement de 2h à 30 min. Il s'est avéré que le nombre de lésions formées est identique. Un temps plus court de réaction permet de s'affranchir du problème lié à la dégradation du BPDE en métabolite inactif, le 7,8,9,10-tétraol-B[a]P et ainsi entrainer un rendement de réaction plus faible. Ce constat doit être confirmé par de nouveaux tests.

3.2. Test de viabilité cellulaire et traitement cellulaire avec le BPDE et le B[a]P

3.2.1. Survie cellulaire après traitement avec les agents génotoxiques BPDE et B[a]P

Comme précédemment, nous avons utilisé le test MTT pour évaluer la cytotoxicité des deux composés afin de déterminer la dose IC_{20} . L'expérience a été réalisée en triplicats.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle où les cellules ont été traitées avec 0.2 ou 0.5% de DMSO en fonction du composé utilisé. Ce pourcentage de DMSO a été choisi, car il correspond au pourcentage maximum de DMSO utilisé comme solvant au cours de l'exposition des cellules. Il a été montré au cours de ces tests de cytotoxicité que ces concentrations en DMSO n'avaient pas d'effet sur la viabilité cellulaire (résultats non présentés).

Ce test a été effectué sur une gamme de concentration en BPDE comprise entre 2 nM et 38 μ M en effectuant une dilution en cascade au $1/5^e$. Les deux lignées cellulaires A549 (en bleu) et HepG2 (en orange) ont été incubées avec le composé pendant 24 et 48h (Figure 83).

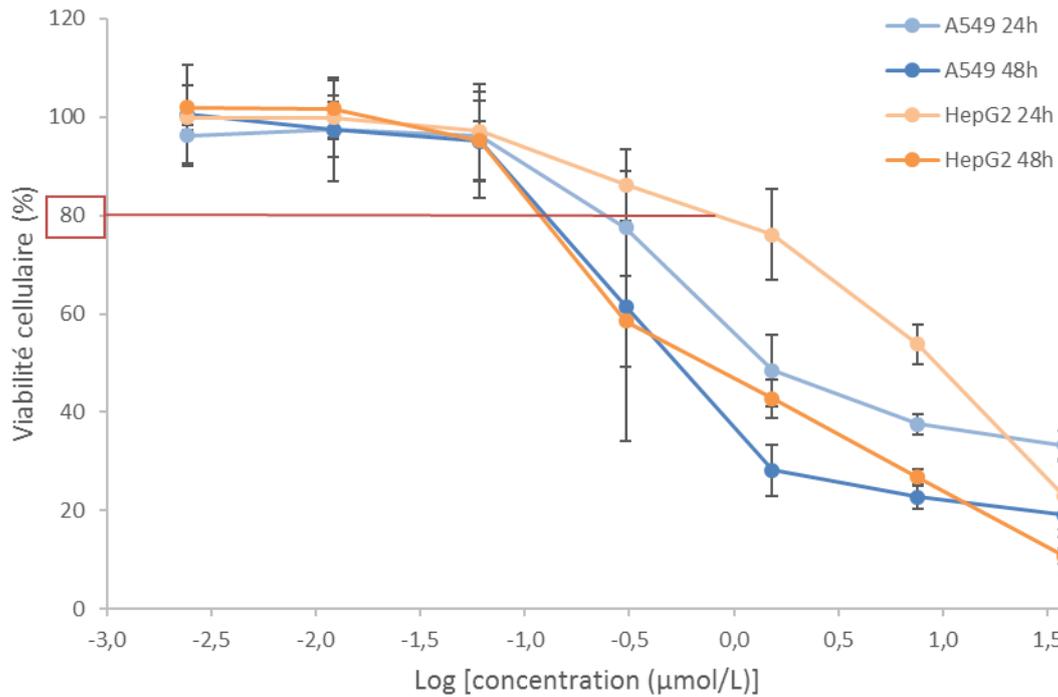


Figure 83 - Courbe de cytotoxicité du composé **BPDE** après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Après 24h d'incubation avec le BPDE, la lignée cellulaire A549 est plus sensible que la lignée HepG2. En effet, la dose IC_{20} est évaluée à environ 800 nM et 350 nM respectivement pour les lignées HepG2 et A549. Pour le temps de traitement de 48h, les deux lignées cellulaires présentent des courbes de cytotoxicité à peu près équivalente puisque les doses IC_{20} sont estimées à 175 et 200 nM respectivement pour les lignées A549 et HepG2.

Ce test a également été effectué avec le composé B[a]P en utilisant une gamme de concentration entre 0,8 et 200 µM en effectuant une dilution en cascade au $1/2^e$. Les résultats sont présentés sur la Figure 84 :

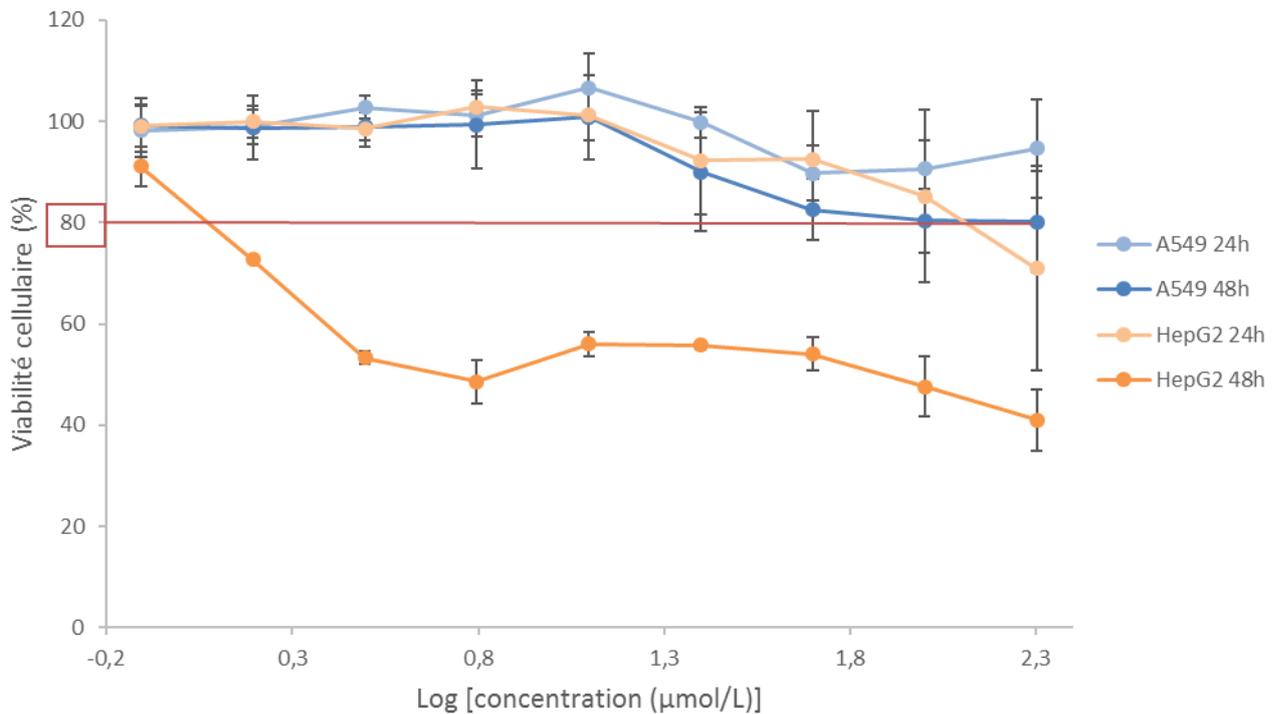


Figure 84 - Courbe de cytotoxicité du composé **B[a]P** après 24 et 48h sur les lignées cellulaires : A549 et HepG2. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3)

Les différences entre les deux lignées cellulaires pour ce composé sont très intéressantes. En effet, nous constatons que la lignée A549 est particulièrement peu sensible aux concentrations testées pour ce composé puisque nous obtenons moins de 20% de mortalité cellulaire à la concentration maximale après 24h d'incubation. Nous avons donc choisi d'utiliser la concentration maximale testée de 200 µM. Après 48h de traitement, la dose IC_{20} est estimée à 100 µM. Ces deux doses sont élevées.

Pour la lignée HepG2, nous observons qu'après 24h de traitement, les cellules sont peu sensibles au composé tout comme la lignée A549 ; la dose IC_{20} est évaluée à 200 µM. Par ailleurs, après 48h, nous constatons une forte sensibilité au composé puisque la dose IC_{20} est 200 fois inférieure (1 µM) à celle obtenue après 24h. Cette différence peut s'expliquer par le délai de métabolisation du composé conduisant à des métabolites toxiques.

Un tableau récapitulatif des différentes doses obtenues est présenté dans le Tableau 14.

	Lignées cellulaires	A549		HepG2	
Composé	Temps de traitement	24h	48h	24h	48h
BPDE (nM)	IC ₂₀	350	175	800	200
	IC ₂₀ /10	35	17,5	80	20
	IC ₂₀ /50	7	3,5	16	4
B[a]P (μM)	IC ₂₀	200	100	150	1
	IC ₂₀ /10	20	10	15	0,1
	IC ₂₀ /50	4	2	3	0,02

Tableau 14 - Résumé des différentes concentrations utilisées pour les deux composés BPDE (en nM) et B[a]P (en μM) en fonction des deux lignées cellulaires : A549 et HepG2

Si nous comparons maintenant les doses des deux composés par lignée, la dose IC₂₀ est plus de 500 fois supérieure pour le B[a]P que le BPDE pour la lignée A549 à la différence de la lignée HepG2 au temps de traitement 48h qui n'est que 5 fois supérieure.

3.2.2. Traitement cellulaire

Nous avons effectué les traitements avec les deux agents sur les deux lignées cellulaires. Pour chaque composé (B[a]P et BPDE) et temps de traitement (24 et 48h), nous avons cinq conditions :

- Cellules non traitées (notées NT)
- Cellules traitées au DMSO 0.2 ou 0.5% (notées Ctrl)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀ (notées IC₂₀)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀/10 (notées IC₂₀/10)
- Cellules traitées à la dose IC₂₀/50 (notées IC₂₀/50)

Les expériences ont également été réalisées en triplicats.

3.3. Caractérisation des activités de réparation de l'ADN en réponse au BPDE et B[a]P

3.3.1. Dosage des lésions par HPLC-MS/MS

3.3.1.1. Les adduits BPDE-N²-dG

3.3.1.1.1. Suite à l'exposition au BPDE

Dans un premier temps, nous allons étudier la formation des adduits BPDE-N²-dG dans l'ADN des deux lignées cellulaires suite au traitement aux doses IC₂₀ après 24 ou 48h de traitement. Nous nous sommes focalisés uniquement sur cette dose puisqu'elle correspond à la dose maximale utilisée et donc à la formation d'adduits la plus importante. Les résultats du nombre d'adduits formés en fonction du temps suite à l'exposition au BPDE sont présentés pour les deux lignées cellulaires ci-dessous : A549 (Figure 85) et HepG2 (Figure 86).

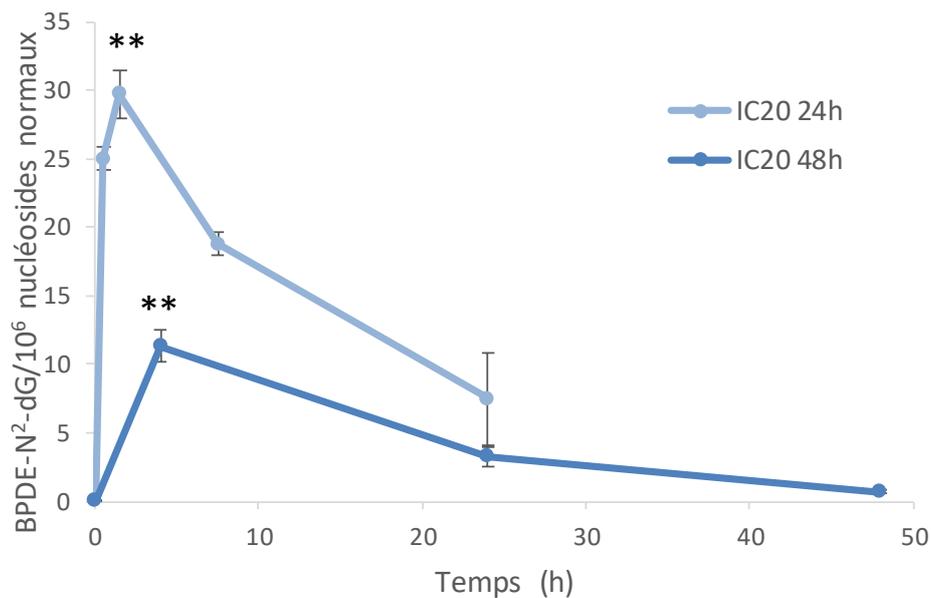


Figure 85 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N²-dG lors du traitement des cellules **A549** avec 175 (IC₂₀ 48h) et 350 nM (IC₂₀ 24h) de **BPDE**. Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

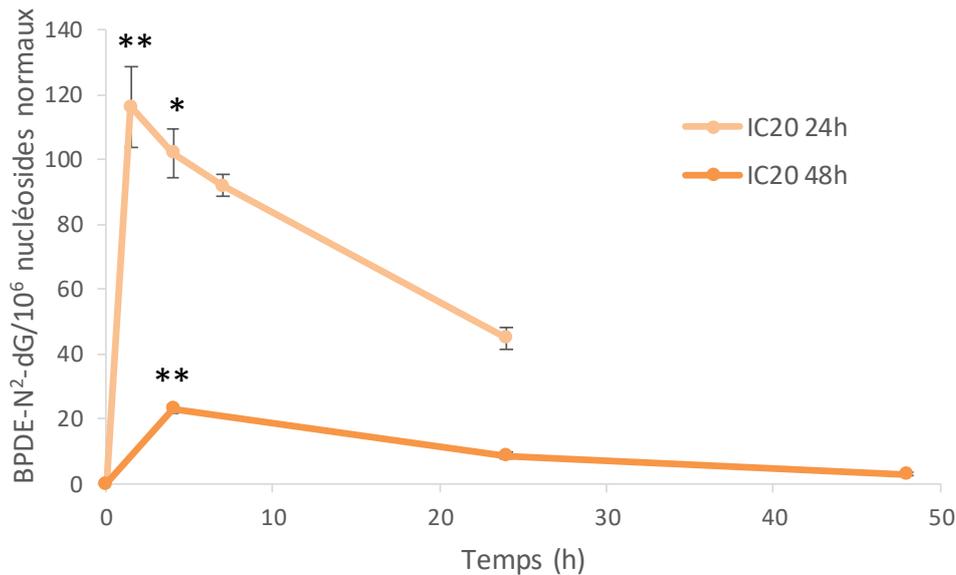


Figure 86 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N²-dG lors du traitement des cellules **HepG2** avec 200 (IC₂₀ 48h) et 800 nM (IC₂₀ 24h) de **BPDE**. Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

Pour la dose IC₂₀ 24h, la quantité d'adduits a été mesurée après 1h30, 7h et 24h de traitement au BPDE pour les deux lignées cellulaires. Le temps de 30 min a été ajouté uniquement pour la lignée A549.

Pour la dose IC₂₀ 48h, la quantité d'adduits a été mesurée après 4h, 24h et 48h de traitement au BPDE pour les deux lignées cellulaires.

Les cinétiques de formation des adduits obtenues pour les deux lignées cellulaires sont similaires, seul le nombre de lésions formées est différent. Les lésions sont formées très rapidement suite au traitement BPDE. En effet, le maximum de lésions formées dans l'ADN cellulaire est observé dès 1h30 de traitement. Ces résultats sont cohérents avec le type de composé utilisé puisque celui-ci ne nécessite pas d'étape de métabolisation et peut directement endommager l'ADN. Les dommages sont ensuite rapidement réparés dans les deux lignées cellulaires. Plus de la moitié des dommages formés ont été réparés après 24h de traitement tandis qu'après 48h, la quasi-totalité des dommages a été réparée.

De plus, le nombre de lésions formées est 4 fois supérieur pour la lignée HepG2 (120 adduits/10⁶ nucléosides normaux) comparé à la lignée A549 (30 adduits/10⁶ nucléosides normaux) pour la dose IC₂₀ 24h. Or, la dose utilisée est uniquement 2 fois supérieure pour la lignée HepG2, les adduits BPDE-N²-dG ont donc tendance à être formés plus facilement dans cette lignée cellulaire.

3.3.1.1.2. Suite à l'exposition au B[a]P

Nous allons maintenant nous intéresser au dosage de ce même type de lésions après traitement avec le composé B[a]P.

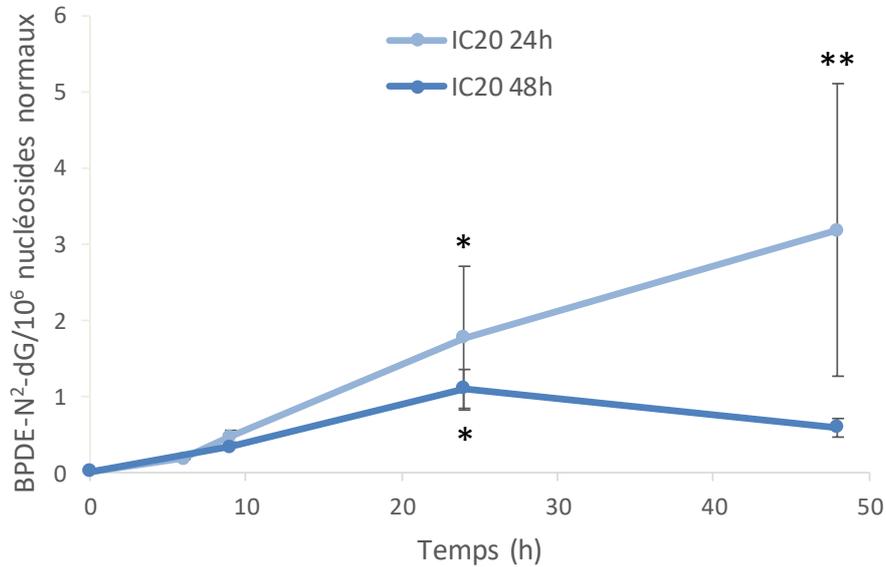


Figure 87 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N²-dG lors du traitement des cellules **A549** avec 100 (IC₂₀ 48h) et 200 μM (IC₂₀ 24h) de **B[a]P**. Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

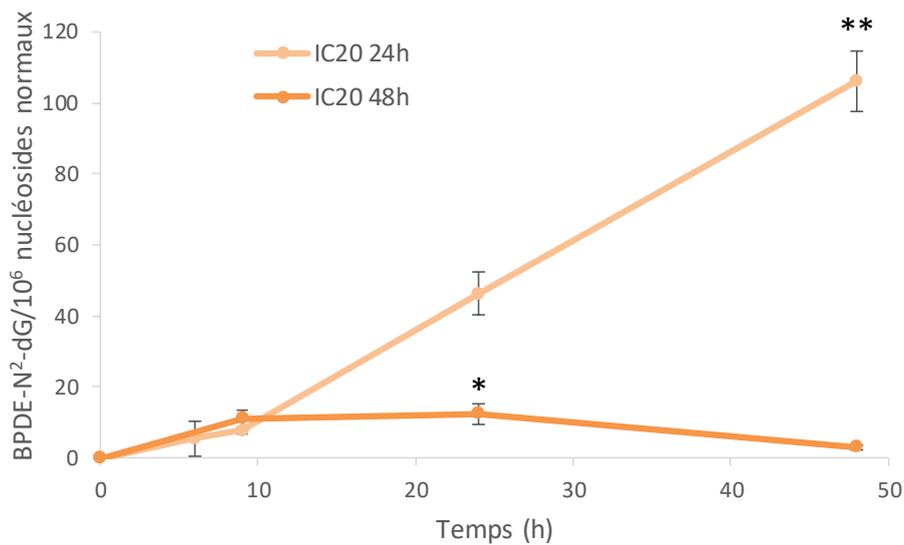


Figure 88 - Cinétique de formation des adduits BPDE-N²-dG lors du traitement des cellules **HepG2** avec 1 (IC₂₀ 48h) et 150 μM (IC₂₀ 24h) de **B[a]P**. Les quantités d'adduits sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

Pour la dose IC₂₀ 24h, la quantité d'adduits a été mesurée après 6h, 9h, 24h et 48h de traitement au B[a]P pour les deux lignées cellulaires.

Pour la dose IC₂₀ 48h, la quantité d'adduits a été mesurée après 9h, 24h et 48h de traitement au B[a]P pour les deux lignées cellulaires.

Les cinétiques de formation des adduits sont une nouvelle fois proches pour les deux lignées cellulaires. Par ailleurs, elles sont différentes de celles obtenues avec le BPDE. En effet, contrairement au BPDE, les lésions sont formées plus lentement dans l'ADN cellulaire où une phase de latence est observée en début de traitement. Ce temps correspond au délai nécessaire pour que les systèmes de métabolisation du B[a]P soient activés afin de le métaboliser en BPDE et conduire à la formation d'adduits.

Nous avons étendu le traitement avec la dose IC₂₀ 24h à 48h de traitement afin d'évaluer si le nombre de lésions formées continuait de se poursuivre ou non après 24h. Pour les deux lignées cellulaires, le nombre de lésions formées augmente de manière quasi linéaire entre 24h et 48h de traitement puisque le maximum de lésions est observé à 48h. Il est cependant important de souligner que la concentration en B[a]P utilisée est proche pour les deux lignées mais que le nombre maximum de lésions formées est plus de 30 fois supérieur pour la lignée HepG2 (110 adduits/10⁶ nucléosides normaux) comparé à la lignée A549 (3 adduits/10⁶ nucléosides normaux). Tout comme le BPDE, nous constatons une grande disparité dans le nombre d'adduits formés entre les deux lignées cellulaires.

A l'inverse, pour les doses IC₂₀ 48h, la cinétique de formation des adduits suit une courbe en cloche pour les deux lignées cellulaires avec un maximum d'adduits atteint après 24h de traitement.

3.3.1.2. Les lésions 8oxodG

Le dosage de la 8oxodG a montré des différences significatives suite au traitement avec les deux composés BPDE et B[a]P pour les deux lignées cellulaires.

3.3.1.2.1. Suite à l'exposition au BPDE

La Figure 89 présentent les résultats obtenus pour le composé BPDE et la Figure 90 ceux du composé B[a]P.

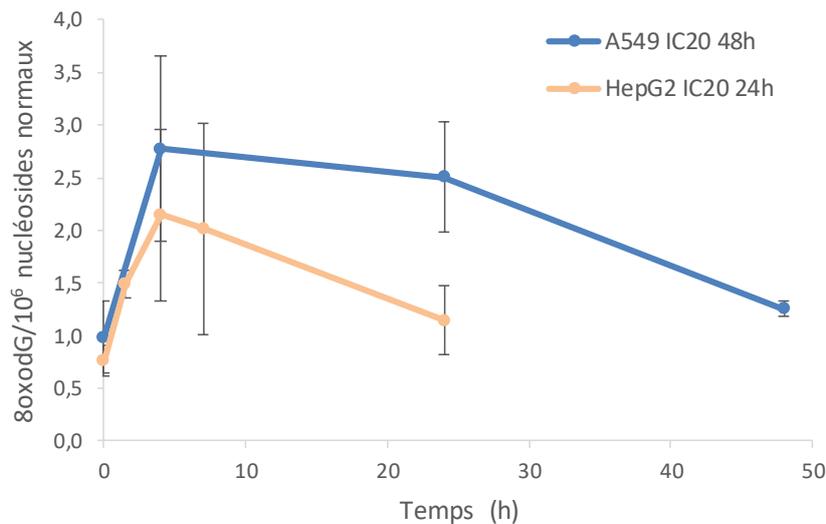


Figure 89 - Cinétique de formation des lésions 8oxodG lors du traitement des cellules **A549** avec 175 nM **BPDE** (IC₂₀ 48h) ; et des cellules **HepG2** avec 800 nM BPDE (IC₂₀ 24h). Les quantités de lésions sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

Le temps de traitement a un effet significatif ($p < 0,05$ suite au test de Kruskal-Wallis) sur la formation de 8oxodG dans les cellules traitées avec le BPDE à la dose IC₂₀ 48h et IC₂₀ 24h respectivement pour les lignées A549 et HepG2. Le nombre de 8oxodG formées augmente rapidement suite au traitement avec le BPDE puis diminue ensuite pour retrouver le niveau basal. Cependant, le niveau de lésions oxydatives est bien plus faible comparé au niveau d'adduits BPDE-N²-G : il est 3 et 60 fois plus faibles respectivement pour les lignées A549 et HepG2.

3.3.1.2.2. Suite à l'exposition au B[a]P

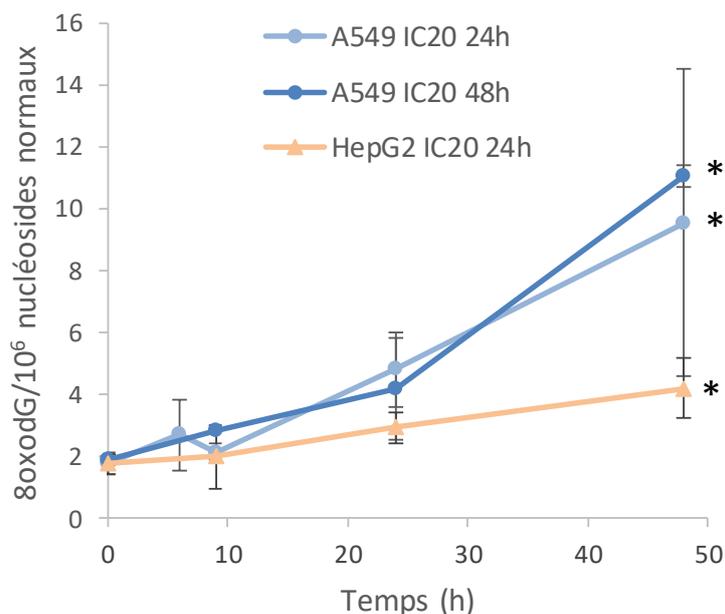


Figure 90 - Cinétique de formation des lésions 8oxodG lors du traitement des cellules **A549** avec 100 (IC₂₀ 48h) et 200 μ M (IC₂₀ 24h) de **B[a]P** ; et des cellules **HepG2** avec 150 μ M (IC₂₀ 24h) de **B[a]P**. Les quantités de lésions sont mesurées à différents temps entre 0 et 48h d'incubation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test de Kruskal-Wallis)

Seules les concentrations élevées en B[a]P, entre 100 et 200 μ M, conduisent à des différences significatives sur la formation de 8oxodG. Contrairement au BPDE, l'augmentation des lésions oxydatives est observée plus tardivement après 24h de traitement.

Le niveau de 8oxodG est plus élevé pour la lignée A549 comparé à la lignée HepG2. En effet, les doses IC₂₀ 24h utilisées pour les deux lignées cellulaires sont proches alors que le taux de lésions 8oxodG est deux fois plus important. Par ailleurs, le nombre de lésions oxydatives formées dans la lignée A549 est plus important que le nombre de BPDE-N²-dG.

3.3.2. Les tests ExSy-SPOT

3.3.2.1. Normalisation des données par les extraits HeLa

La variabilité inter-lame a également été contrôlée pour cette nouvelle série de tests comme précédemment effectuée pour les composés CAA et IFO. L'ensemble des intensités de fluorescence sur les différentes lames est homogène et le coefficient de variation est inférieur à 10%. L'ensemble des paramètres est donc conforme au seuil fixé.

3.3.2.2. Evaluation de l'effet du DMSO sur les activités de réparation de l'ADN

Pour les composés BPDE et B[a]P, deux contrôles ont été effectués : un contrôle avec les lignées cellulaires non traitées et un autre avec une concentration finale en DMSO de 0.2 ou 0.5%. Nous avons donc tout d'abord vérifié que le DMSO n'impactait pas les activités de réparation de l'ADN. Pour cela, nous avons effectué le rapport des FI (cellules traitées au DMSO) sur FI (cellules non traitées). Les résultats obtenus pour la lignée A549 sont présentés sur la Figure 91.

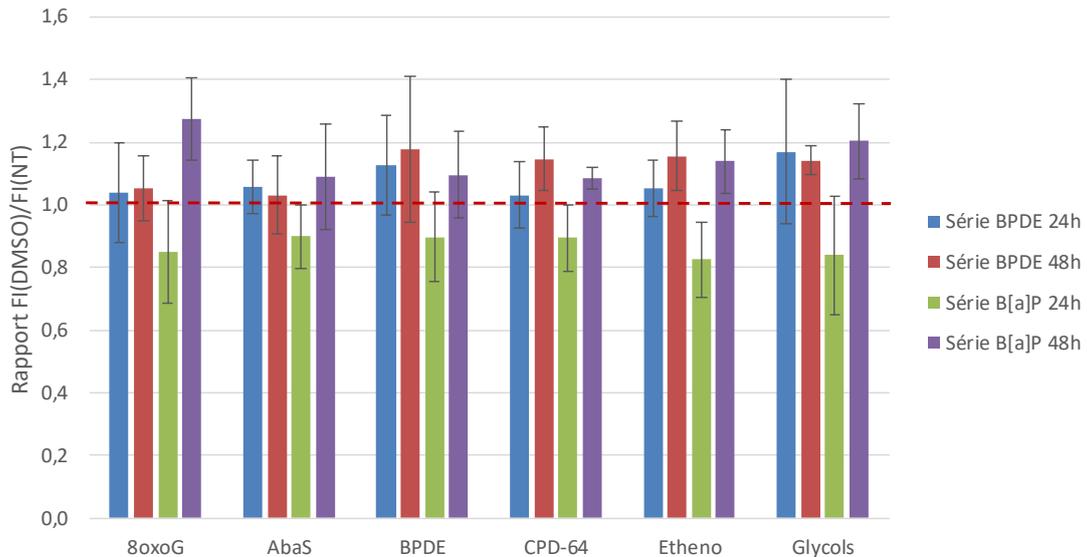


Figure 91 - Rapport de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **A549** traitée au **DMSO 0.2 ou 0.5%** pendant **24 ou 48h** par rapport à l'extrait protéique de la lignée A549 non traitée. Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)

Après avoir effectué le test statistique ANOVA, aucun effet significatif du DMSO n'a été mis en évidence pour cette lignée cellulaire ainsi que sur la lignée HepG2 (résultats non présentés).

Aux concentrations utilisées, le DMSO n'impacte pas les activités de réparation de l'ADN. Pour la suite des résultats, les tests ExSy-SPOT seront donc présentés en fonction du contrôle DMSO.

3.3.2.3. Analyse de la réparation de l'ADN en réponse au BPDE

Suite aux tests de réparation, nous avons observé un effet du BPDE sur les activités de réparation pour les deux lignées cellulaires et les deux temps de traitement excepté pour la condition 48h avec la lignée A549.

La Figure 92 présente les résultats de l'intensité de fluorescence de chaque condition par rapport à l'intensité de fluorescence des cellules contrôles pour chacune des lésions et pour les quatre conditions de traitement : DMSO (Ctrl) puis de la dose la plus faible à la plus forte en BPDE pendant 24h (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀) pour la lignée A549.

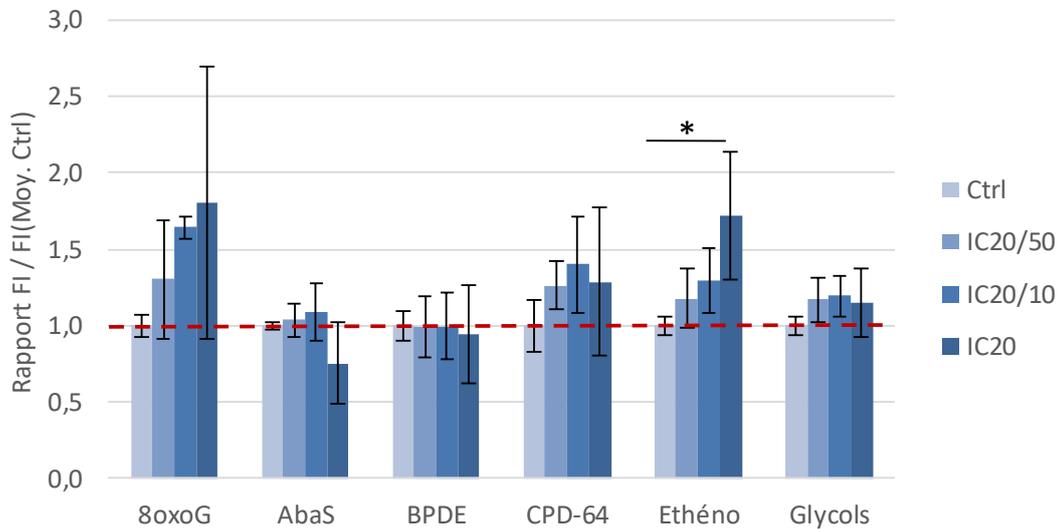


Figure 92 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **A549** traitée au **BPDE** pendant **24h** aux différentes doses (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)

La seule différence significative concerne les activités de réparation de Ethéno pour la dose la plus élevée en BPDE (IC₂₀). De plus, Ethéno et 8oxoG semblent être les deux seules lésions où les activités de réparation sont stimulées de manière dose-dépendante.

La Figure 93 présente les résultats obtenus sur la lignée HepG2 après 24h de traitement au BPDE.

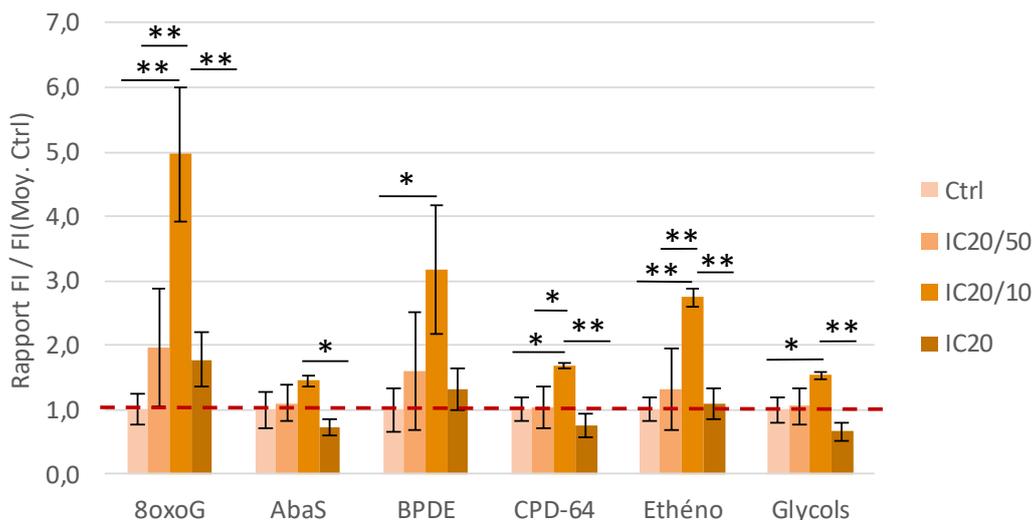


Figure 93 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **HepG2** traitée au **BPDE** pendant **24h** aux différentes doses ($IC_{20}/50$, $IC_{20}/10$ et IC_{20}) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). Trois expériences indépendantes ont été réalisées ($n = 3$). * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$ (Test ANOVA)

Le Tableau 15 résume les différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées en fonction des lésions présentes sur la puce :

	8oxoG	AbaS	BPDE	CPD-64	Ethéno	Glycols
Ctrl – $IC_{20}/10$	** (↗)		*(↗)	*(↗)	** (↗)	*(↗)
$IC_{20}/50$ – $IC_{20}/10$	** (↗)			*(↗)	** (↗)	
$IC_{20}/10$ – IC_{20}	** (↗)	*(↗)		** (↗)	** (↗)	** (↗)

Tableau 15 - Tableau récapitulatif des différences significatives obtenues entre les différentes conditions testées sur la lignée cellulaire HepG2 traitée ou non au BPDE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Test ANOVA). Pour l'ensemble des différences significatives constatées, nous avons observé une stimulation des activités de réparation (↗) pour la dose $IC_{20}/10$ comparée aux autres conditions.

Nous constatons un effet en cloche en fonction des doses de traitement pour l'ensemble des lésions étudiées. La seule dose qui est significativement différente du Ctrl est la dose intermédiaire ($IC_{20}/10$) où les activités de réparation sont stimulées sauf pour AbaS. Cette stimulation est particulièrement plus marquée pour 8oxoG et Ethéno et les mêmes différences sont observées entre la dose intermédiaire et deux autres doses (IC_{20} et $IC_{20}/50$). Il est intéressant de noter que même si aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour la dose la plus élevée, les activités de réparation ont tendance à être inhibées exceptées pour 8oxoG, BPDE et Ethéno qui ont tendance à être stimulées. De plus, à la dose la plus faible, il n'y a aucun effet du traitement mais 8oxoG, BPDE et Ethéno sont une nouvelle fois celles où nous observons une stimulation.

Nous allons maintenant comparer les contributions relatives de chaque activité de réparation pour la dose intermédiaire et le contrôle (Figure 94).

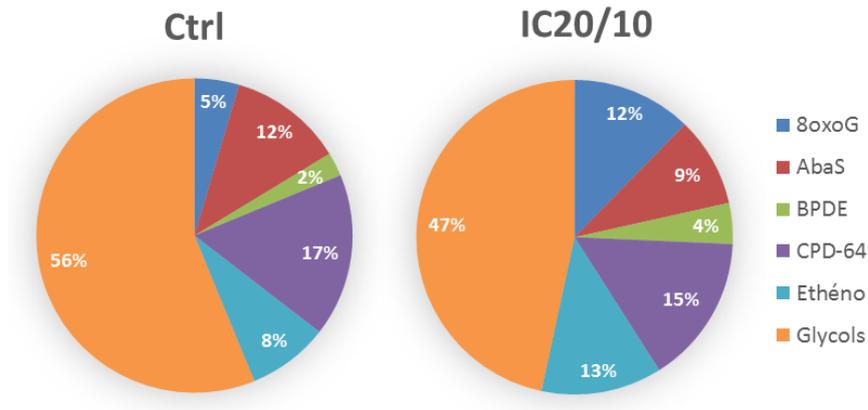


Figure 94 - Diagrammes circulaires représentant la contribution relative de chaque voie de réparation à la réparation totale en fonction de chaque lésion sur la lignée cellulaire **HepG2** pour l'extrait protéique contrôle (Ctrl) et la dose intermédiaire de **BPDE 24h** (IC₂₀/10)

En comparaison au contrôle, la contribution relative de 8oxoG, Ethéno et BPDE est augmentée en moyenne de 2 fois après traitement au BPDE tandis que Glycols, CPD-64 et AbaS sont diminués.

La Figure 95 présente les résultats après 48h de traitement BPDE sur la même lignée cellulaire HepG2.

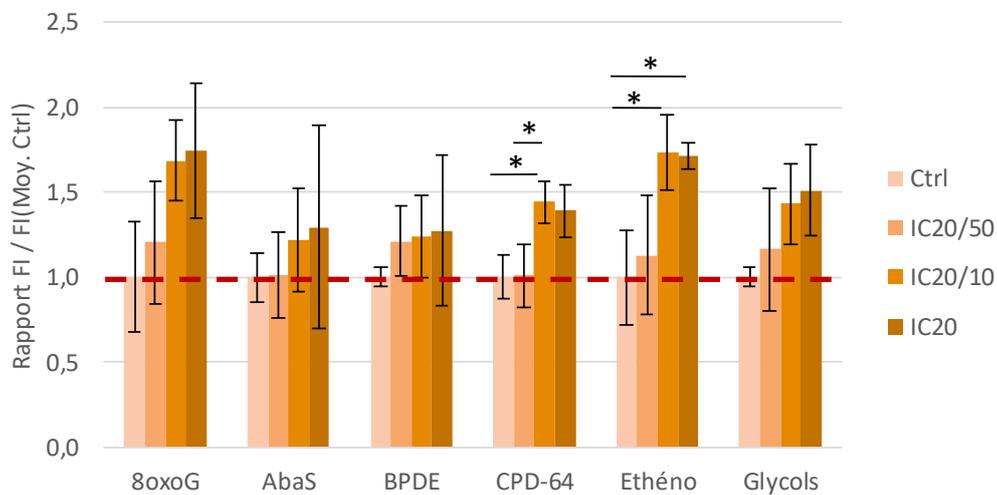


Figure 95 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **HepG2** traitée au **BPDE** pendant **48h** aux différentes doses (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)

Comme après 24h de traitement, les différences sont observées pour la dose intermédiaire mais dans le cas présent, les activités de réparation sont stimulées au niveau de CPD-64 et Ethéno. De plus, la dose la plus élevée stimule également les activités de réparation de Ethéno. Contrairement au temps de traitement 24h, les activités de réparation sont stimulées de manière dose-dépendante.

3.3.2.4. Analyse de la réparation de l'ADN en réponse au B[a]P

Suite au traitement avec le B[a]P, seule la dose IC₂₀ 48h sur les cellules HepG2 a permis de mettre en évidence des différences significatives. Les autres résultats ne seront pas présentés.

La Figure 96 présente les résultats obtenus pour les cellules HepG2 après traitement de 48h au B[a]P.

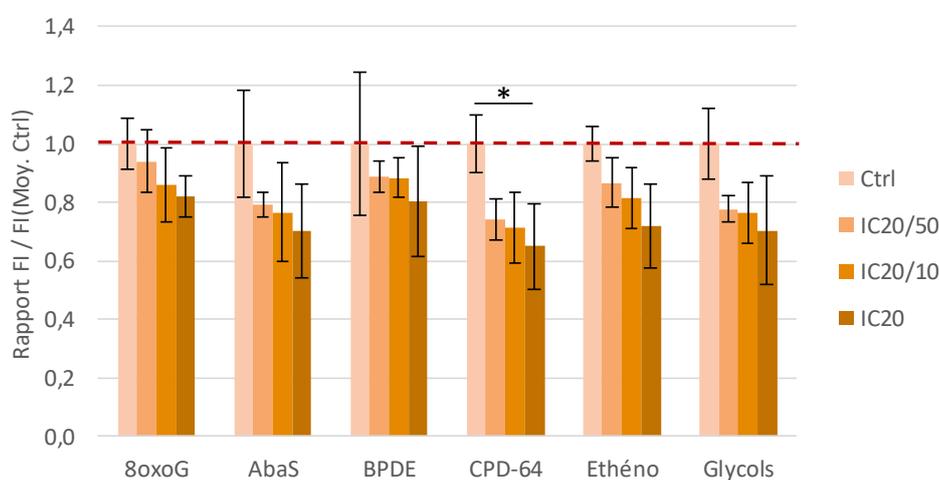


Figure 96 - Résultats de l'intensité de fluorescence des extraits protéiques de la lignée **HepG2** traitée au **B[a]P** pendant **48h** aux différentes doses (IC₂₀/50, IC₂₀/10 et IC₂₀) par rapport à la moyenne des extraits protéiques contrôle (Ctrl). Trois expériences indépendantes ont été réalisées (n = 3). *p<0.05 et **p<0.01 (Test ANOVA)

Contrairement au traitement avec le BPDE, nous constatons une inhibition de l'ensemble des activités de réparation et de manière dose-dépendante. La seule différence significative est observée sur CPD-64 à la dose IC₂₀. Cette dose correspond à une concentration très faible en B[a]P comparée aux autres concentrations testées qui sont au minimum 100 fois supérieures. De plus, ce sont également les seules conditions où nous avons noté des effets cytotoxiques suite au test MTT.

4. Conclusions

Nous venons de décrire les différents résultats obtenus avec la méthode de dosage et du test de réparation, nous allons maintenant résumer ces résultats avant d'en discuter et de proposer quelques perspectives à ce projet de recherche.

4.1. Optimisation du test de réparation pour des applications environnementales et professionnelles

Nous avons réalisé une puce permettant d'observer les activités de réparation d'un ensemble de lésions simultanément en incorporant deux types de lésions liées à des expositions environnementales et professionnelles : un substrat plasmidique contenant des Ethénobases et un autre avec les adduits BPDE-N²-G.

La préparation du substrat plasmidique contenant les Ethénobases est robuste et l'intensité de fluorescence est homogène avec les autres lésions présentes sur la puce.

Nous avons rencontré plusieurs difficultés pour la formation des adduits BPDE-N²-G notamment avec l'utilisation de l'extrait de référence provenant de cellules HeLa qui possède de faibles activités de réparation pour ce type d'adduits. Afin de pallier à ce problème, nous utilisons désormais un autre type de lignée cellulaire (Huh7) dont les activités de réparation à l'état basal sont plus élevées que pour l'extrait de référence ce qui nous a permis d'optimiser ce type d'adduits. Les conditions de réaction qui ont été validées permettent d'obtenir une intensité de fluorescence correcte mais qui reste faible comparée aux autres lésions de la puce. Par ailleurs, il faudra améliorer la robustesse de la réaction avec le composé chimique BPDE. Pour ces raisons, nous devons perfectionner l'optimisation de ce substrat plasmidique.

4.2. Etude des conséquences de l'exposition au CAA et à l'IFO

Comme nous l'avons constaté avec la méthode de dosage, l'incubation des cellules HepG2 et A549 avec les composés IFO et CAA n'entraîne pas d'augmentation significative d'Ethénobases ou de dommages oxydatifs de type 8oxoG. Par ailleurs, aucun effet sur les activités de réparation n'a également été mis en évidence avec le test de réparation excepté pour les cellules HepG2 traitées à l'IFO pendant 24h. Les différences significatives ont été obtenues au niveau des deux doses les plus faibles (IC₂₀/10 et /50) sur les activités de réparation de la voie BER et plus spécifiquement au niveau de 8oxoG.

Suite aux expériences réalisées, nous avons uniquement mis en évidence un effet sur les cellules HepG2 du progénotoxique IFO nécessitant d'être métabolisé avant de conduire à des dommages de l'ADN.

4.3. Etude des conséquences de l'exposition au BPDE et au B[a]P

L'incubation des cellules HepG2 et A549 avec les composés BPDE et B[a]P a révélé des différences avec les deux méthodes utilisées.

Tout d'abord, avec le composé BPDE, nous avons suivi la formation des adduits du BPDE ainsi que les lésions 8oxoG au cours du traitement grâce à la méthode de référence. Nous avons constaté que les adduits BPDE-N²-G se forment très rapidement dans l'ADN des cellules et qu'elles sont également rapidement réparées. De plus, nous avons observé une stimulation des activités de réparation avec le test de réparation sur les deux lignées cellulaires excepté pour la condition de traitement 48h avec les cellules A549. Ces stimulations sont notamment très marquées au niveau de Ethéno et 8oxoG pour les deux lignées cellulaires. Pour les cellules HepG2, les différences majeures ont été observées à la dose intermédiaire (IC₂₀/10) contrairement aux cellules A549 où celles-ci sont observées à la dose la plus forte (IC₂₀).

Pour le précurseur B[a]P, le dosage HPLC-MS/MS a montré la formation des adduits du BPDE et de lésions oxydatives dans les deux lignées cellulaires. Avec le test de réparation, nous n'avons obtenu que des effets sur les activités de réparation de l'ADN pour la lignée HepG2 suite au temps de traitement le plus long soit 48h. Le profil de réparation est très différent de ceux que nous avons obtenus avec le BPDE puisque nous avons constaté une inhibition des activités de réparation de manière dose-dépendante.

4.4. Résumé

L'ensemble des résultats obtenus pour ces quatre composés a soulevé plusieurs questions importantes auxquelles nous allons tenter de répondre dans le prochain chapitre.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus en fonction des quatre composés et des deux lignées cellulaires que nous avons utilisés pour cette étude. Le sigle « Ø » signifie que nous n'avons pas obtenu de différences significatives pour la méthode utilisée et le signe « + » indique des résultats significatifs.

Composés	CAA		IFO		BPDE		B[a]P	
	A549	HepG2	A549	HepG2	A549	HepG2	A549	HepG2
Lignées cellulaires								
HPLC-MS/MS	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+
Test ExSy-SPOT	∅	∅	∅	+ (24h)	+ (24h)	+	∅	+ (48h)

Tableau 16 - Tableau synthétique des différents résultats obtenus au cours de ce projet en fonction des composés et des lignées cellulaires. Le sigle « ∅ » signifie que nous n'avons pas obtenu de différences significatives pour la méthode utilisée. Par exemple, le traitement CAA aux différentes doses testées n'induit aucune augmentation significative du nombre de lésions de type Ethénobases dans l'ADN des deux lignées cellulaires en utilisant la méthode HPLC-MS/MS. Le sigle « + » indique des résultats significatifs aux temps de traitement indiqués ou aux deux temps de traitements lorsque celui-ci n'est pas spécifié dans le tableau. Par exemple, nous avons observé une augmentation significative des activités de réparation à la dose IC₂₀ après 24h de traitement au BPDE avec la lignée A549 en utilisant le test ExSy-SPOT.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Chapitre 4 : Discussion

1. Optimisation du test de réparation pour des applications environnementales et professionnelles

Le test de réparation développé par LXRepair a été adapté pour cette étude en incorporant deux nouveaux substrats plasmidiques en relation avec les agents génotoxiques auxquelles nous nous sommes intéressés.

Nous n'avons pas rencontré de problème pour l'élaboration du substrat plasmidique contenant des Ethénobases. Cependant, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, l'optimisation du substrat contenant les adduits BPDE-N²-G a été plus complexe. Nous avons rencontré deux problèmes majeurs :

- la reproductibilité de la réaction chimique du BPDE avec le plasmide n'est pas bonne lorsque les concentrations en BPDE sont élevées. En effet, nous avons constaté que lorsque la concentration en BPDE augmente, l'écart-type est de plus en plus important témoignant d'une mauvaise reproductibilité de la réaction (Figure 79).
- le niveau de réparation du plasmide BPDE est faible avec un extrait Hela utilisé comme standard au niveau basal. Nous avons cependant trouvé une lignée cellulaire (Huh7) possédant des activités de réparation plus élevées mais qui restent inférieures comparées aux autres lésions présentes sur la puce. Les résultats témoignent donc que ce type d'adduit semble ne pas être réparé efficacement par les extraits cellulaires *in vitro*.

Cette dernière observation nous a interpellé car dans les cellules, les dommages formés suite à l'exposition des lignées cellulaires A549 et HepG2 au BPDE sont efficacement réparés. En effet, au cours du traitement, le nombre d'adduits BPDE-N²-G diminue rapidement.

Il est bien connu que cet adduit est réparé par la voie NER tout comme les dommages photo-induits (CPD et 6-4PP). Or, le substrat plasmidique CPD-64 possède un niveau de réparation correct et homogène vis-à-vis des autres lésions (8oxoG, Glycols, AbaS et Ethéno) prises en charge par la voie BER.

Ces faits ne nous laissaient donc pas présager de la difficulté à mettre en place un test de réparation des adduits du BPDE.

Par ailleurs, si nous comparons la quantité de lésions de chacun des plasmides, le substrat plasmidique CPD-64 possède 150 lésions soit 10 fois plus de lésions que le substrat BPDE. Nous avons donc essayé d'augmenter le nombre d'adduits du BPDE. Cependant, cela s'est avéré difficile puisque le niveau de réparation reste inchangé lorsque le nombre de lésions augmente. La réparation des adduits du BPDE n'est donc pas linéaire en fonction de la quantité de lésions. Ces résultats restent à ce jour difficilement explicables. Cependant, plusieurs éléments peuvent être mis en avant pour comprendre ces résultats.

Bien que la voie de réparation NER soit un processus puissant prenant en charge une large variété de lésions de structures différentes, l'efficacité de la réparation peut varier considérablement en fonction de la lésion. En effet, il y a de plus en plus d'évidences que certaines lésions sont réparées lentement dans les cellules et les tissus (Geacintov and Broyde, 2017; Gunz et al., 1996; Wood, 1999). Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que les protéines de réparation ne détectent pas la base endommagée mais reconnaissent les distorsions et les déstabilisations provoquées par les dommages au niveau de la double hélice de l'ADN (Costa, 2003).

En général pour la voie GG-NER, cette reconnaissance peut avoir lieu par le complexe XPC-hHR23B. Dans le cas de la TC-NER, le dommage est reconnu suite au blocage de l'ARN polymérase II. Toutefois, nous allons voir que d'autres protéines peuvent également intervenir dans la reconnaissance des lésions.

De nombreux travaux ont montré que les deux types de dommages photo-induits CPD et 6-4PP ne sont pas réparés avec les mêmes cinétiques. Les CPD sont réparés plus lentement que les 6-4PP *in vitro* par les extraits cellulaires (Kusumoto et al., 2001), dans les cellules (Choi et al., 2015a) ou encore dans la peau (Mouret et al., 2006). La vitesse de réparation des 6-4PP est 5 à 10 fois plus élevée selon les études (Szymkowski et al., 1993; Tornaletti and Hanawalt, 1999). Cette différence d'efficacité de la réparation entre ces deux types de lésions est due à la différence de distorsions provoquées par les dommages. En effet, la lésion CPD engendre une distorsion de la double hélice de l'ADN moins importante que les 6-4PP (Kusumoto et al., 2001; Sugawara, 2011). Comme nous l'avons décrit au cours du premier chapitre, la reconnaissance des CPD s'effectue tout d'abord par la protéine DDB2 qui va s'associer ensuite avec DDB1. Ce complexe va générer une déformation plus importante au niveau de l'ADN ce qui permet ensuite le recrutement du complexe XPC-hHR23B (Fitch et al., 2003; Spivak, 2015). Ceci est observé pour les CPD et non pour les 6-4PP. La réparation des CPD par la NER n'est pas très efficace en absence de DDB2.

Nous avons pu observer cette différence d'efficacité de la réparation avec le test de réparation utilisé pour ce travail en développant un substrat plasmidique contenant uniquement des CPD. Le niveau de réparation obtenu pour les CPD est bien plus faible comparé au substrat contenant un mélange de CPD et de 6-4PP (résultats non présentés). De plus, le substrat contenant un mélange de CPD et 6-4PP

possède une majorité de 6-4PP (60%). Indirectement, ceci confirme l'aptitude de notre test à mesurer des différences de réparation.

On peut également citer la protéine HMGB1 qui intervient spécifiquement dans la réparation de la voie NER des adduits du cisplatine. HMGB1 reconnaît spécifiquement la déformation induite par les pontages 1,2-intrabrin (Pil and Lippard, 1992). Après avoir reconnu une structure particulière de l'ADN, cette protéine est capable d'induire, seule ou en complexe, une déformation locale encore plus accentuée (McCauley et al., 2007).

Même si les trois lésions que nous venons de citer sont réparées par la même voie de réparation NER, des facteurs spécifiques au type de lésion interviennent dans la réparation et vont impacter l'efficacité de la réparation. Ceci nous laisse supposer que cela pourrait être également le cas des adduits du BPDE étant donné que nous observons un niveau de réparation faible pour ces adduits comparé aux CPD-64. Cependant, aucun facteur spécifique aux adduits du BPDE n'a à ce jour été identifié. En revanche, il a été démontré que selon la configuration stéréochimique d'un même type d'adduit, l'efficacité de la réparation peut varier.

Nous avons évoqué dans le premier chapitre que le composé BPDE existe sous la forme de deux énantiomères (+) et (-) et deux diastéréoisomères : *syn* et *anti*. Chaque isomère du BPDE peut conduire à deux adduits : *cis* ou *trans* selon l'ouverture de l'époxyde lors de la réaction sur l'ADN. De plus, chacun des quatre isomères du BPDE peut ainsi former deux adduits pour chaque site de fixation sur l'ADN, ce qui entraîne la formation potentielle de huit isomères pour chaque adduit. L'adduit majoritairement retrouvé dans les cellules traitées au B[a]P est le (+)-*anti-trans*-BPDE-N²-G (Conney, 1982; Dipple, 1994).

Le composé BPDE utilisé pour traiter les plasmides et les cellules est sous la forme (±)-*anti*-BPDE pouvant donc conduire à quatre conformations différentes d'adduits. Or, plusieurs travaux ont démontré que ces différentes configurations stéréochimiques ont un impact sur l'efficacité de la réparation de ces adduits.

Il a été montré que les activités de réparation NER au niveau de l'adduit (+)-*anti-trans*-BPDE-N²-G sont environ cinq fois moins importantes que pour l'adduit (+)-*anti-cis*-BPDE-N²-G (Geacintov and Broyde, 2017; Hess et al., 1997; Reeves et al., 2011) avec un taux d'excision pouvant varier d'un facteur 100 (Hess et al., 1997). De plus, les adduits (+)-*anti-cis*-BPDE-N²-G et (-)-*anti-cis*-BPDE-N²-G sont considérés comme de bons substrats pour la NER et réparés avec la même efficacité que les photoproduits 6-4PP (Kropachev et al., 2009). Ces résultats seraient corrélés à une reconnaissance des adduits par le complexe XPC-hHR23B qui diffère en fonction de la configuration des adduits (Lee et al., 2014; Mocquet et al., 2007). Les mêmes observations ont été constatées avec le complexe UvrABC qui est le complexe de reconnaissance chez *E. Coli* (Zou et al., 2003).

D'autres facteurs entrent également en compte dans l'efficacité de la réparation de ces adduits comme le contexte de la séquence ou la base appariée (Cai et al., 2010; Geacintov and Broyde, 2017). Par exemple, il a été démontré que la nature des bases sur le brin opposé de la lésions influence l'efficacité de la réparation (Buterin et al., 2000; Kropachev et al., 2009). D'ailleurs, si l'adduit (+)-*anti-trans*-BPDE-N²-G se situe en face d'un site abasique alors les extraits protéiques provenant de cellules HeLa sont incapables de réparer ces adduits (Hess et al., 1997; Liu et al., 2015; Mocquet et al., 2007).

Au cours de cette étude, nous avons choisi de doser l'ensemble des isomères de chaque adduit. En tenant compte des résultats obtenus et de la littérature, il pourrait être envisagé de doser les différents isomères formés dans le plasmide afin de pouvoir examiner le faible niveau de réparation des adduits du BPDE obtenu avec le test de réparation. Ceci est possible puisque des conditions chromatographiques ont été proposées pour permettre de séparer ces isomères (Ruan et al., 2006).

Grâce au test de réparation, nous avons constaté qu'il existe de grandes différences d'efficacité de la réparation pour les substrats réparés par la voie NER. La relation entre la quantité de lésions et le niveau de réparation n'est pas constante et va dépendre de plusieurs facteurs comme la nature du dommage, la distorsion de la double hélice de l'ADN ainsi que de protéines spécifiques à chaque lésion.

La mise au point des substrats plasmidiques est effectuée avec des extraits cellulaires à un niveau basal sans activation des systèmes de réparation. Par la suite, nous nous sommes donc intéressés aux conséquences de l'exposition à des composés conduisant à la formation d'adduits du BPDE afin d'examiner si nous obtenions un niveau de réparation différent.

2. Impact des agents génotoxiques sur la formation des dommages et la réparation de l'ADN

Rappelons que l'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact des deux agents pro-génotoxiques (IFO et B[a]P) et de leurs métabolites (CAA et BPDE) au niveau de la formation des dommages et de la réparation de l'ADN. Pour cela, nous avons choisi deux méthodes : le dosage HPLC-MS/MS et le test de réparation.

Avant de discuter des différents résultats obtenus, nous allons évoquer brièvement les différentes étapes depuis l'entrée d'une substance pro ou génotoxique dans une cellule jusqu'à son élimination ainsi que les conséquences au niveau cellulaire.

Dans le cas de la voie des xénobiotiques, le devenir des molécules (IFO et B[a]P) dans la cellule est divisé en quatre phases (Figure 97). La phase 0 qui est caractérisée par l'entrée de la molécule dans la cellule par diffusion passive ou à l'aide de récepteurs. La phase I impliquant les enzymes P450 jouant un rôle central dans la biotransformation de ces molécules. La phase II permet la métabolisation des métabolites de phase I par des enzymes de conjugaison. Enfin, la dernière phase conduit à l'expulsion des métabolites de phase II par l'intermédiaire de transporteurs ABC. De plus, des facteurs de transcriptions tels que AhR, PXR et CAR présents dans le cytosol ou le noyau de certaines cellules sont capables de lier certains xénobiotiques et ainsi moduler l'expression des transporteurs et des enzymes du métabolisme.

Concernant les métabolites que nous avons utilisés (CAA et BPDE), ils ne sont pas concernés par la phase I et ne dépendent donc pas des enzymes P450 présentes au sein de la cellule.

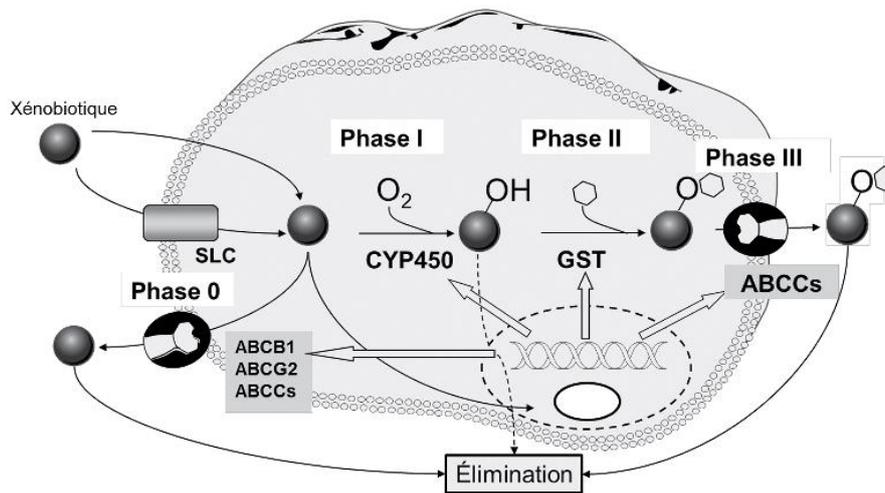


Figure 97 - Schéma général des quatre phases cellulaires du devenir d'un xénobiotique (source : Mémo visuel de Biochimie)

Dans le cadre de notre étude, nous avons sélectionné des agents progénotoxiques qui au cours de leur métabolisation vont former des métabolites responsables d'effets génotoxiques. Ces métabolites sont connus pour altérer la molécule d'ADN et entraîner des modifications covalentes liées à la formation d'adduits qui vont être pris en charge par les voies de réparation. De plus, ces dommages vont activer le mécanisme régulateur de la DDR dont nous avons décrit la complexité au cours du premier chapitre et qui permet d'activer les différentes voies de réparation de l'ADN ainsi que d'entraîner de multiples réponses cellulaires (arrêt du cycle cellulaire, apoptose, sénescence, ...).

Dans le cas de l'exposition des cellules au CAA et au BPDE, ces composés vont pouvoir agir directement et plus rapidement sur l'ADN puisqu'ils n'ont pas recours à la phase I de biotransformation.

Ces agents génotoxiques sont également capables de perturber l'environnement cellulaire et d'affecter d'autres fonctions cellulaires. En effet, les mécanismes d'action et les voies de signalisation activées par les toxiques sont particulièrement nombreux et de nature variée. Ils peuvent influencer des mécanismes cellulaires très variés que ce soit par une interaction directe ou par une régulation génique.

Nous nous sommes ici intéressés uniquement à l'aspect génotoxique de ces molécules en quantifiant le nombre de lésions formées au cours du traitement ainsi qu'en évaluant les activités d'excision et de resynthèse des voies de réparation BER et NER.

Afin d'explorer ces deux voies de réparation, nous avons sélectionné le CAA et l'IFO, connus pour former des lésions Ethénobases prises en charge essentiellement par la voie BER tandis que les deux autres composés BPDE et B[a]P conduisent à des adduits du BPDE réparés par la voie NER.

Par la mesure de ces activités de réparation, le test de réparation permet d'observer la résultante de tous les systèmes de régulation qui ont été mis en place par la cellule afin d'aboutir à la signature enzymatique de réparation. Nous allons voir que cette signature n'est pas toujours simple à interpréter du fait des multiples facteurs que nous venons d'évoquer qui sont à prendre en compte dans la réponse obtenue.

Concernant la démarche expérimentale choisie, nous avons évalué la cytotoxicité des quatre composés utilisés afin de déterminer l'IC₂₀ à partir du test MTT. Nous avons sélectionné trois doses (IC₂₀, IC₂₀/10 et IC₂₀/50) et deux temps de traitement (24 et 48h) pour chacun des composés et pour les deux lignées cellulaires (A549 et HepG2). Cette démarche nous a permis d'analyser trois paramètres (variabilité, seuil et spécificité de la réponse cellulaire) qui vont structurer la suite de ce chapitre. Cependant, avant d'aborder ces trois paramètres, les résultats obtenus avec le composé CAA seront traités indépendamment étant donné que nous n'avons pas mis en évidence d'effets génotoxiques dans les deux lignées cellulaires et avec les deux méthodes.

2.1. Cas particulier du CAA

A travers cette étude, nous avons constaté que la toxicité observée via le test de viabilité cellulaire n'est pas corrélée aux effets génotoxiques du CAA.

Pour rappel, nous nous sommes intéressés à ce composé puisque celui-ci est donné comme responsable avec un autre métabolite (CEO) de la toxicité du chlorure de vinyle (Bartsch et al., 1979). Cette toxicité serait due aux capacités de fixation aux macromolécules (ADN, ARN et protéines) formant ainsi des adduits (Dogliotti, 2006).

Des travaux ont montré l'effet génotoxique du VC chez les rats suite au dosage des Ethénobases (Bolt, 1986; Ciroussel et al., 1990; Morinello et al., 2002). Les rats immatures exposés au VC présentent un taux de lésions six fois plus élevé que les rats non exposés. Ces lésions ont été retrouvées dans différents organes tels que le foie, les poumons, les reins et dans les lymphocytes (Ciroussel et al., 1990).

Dans plusieurs études épidémiologiques, il a été observé une augmentation des aberrations chromosomiques et des micronoyaux dans les lymphocytes, ainsi que des échanges de chromatides sœurs chez les travailleurs exposés au VC (ATSDR, 2005; Dogliotti, 2006; Wong et al., 2003).

Enfin, le caractère cancérigène du VC a également été prouvé par des études épidémiologiques menées sur des travailleurs exposés au VC (Leibach, 1996; Mundt et al., 2000; Ward et al., 2001).

Les effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes du VC sont donc clairement établis. D'autres travaux se sont ensuite intéressés au mécanisme d'action du VC en étudiant le métabolite CAA. Il a été démontré que celui-ci entraîne la formation d'Ethénobases dans l'ADN isolé (Bartsch et al., 1994; Dosanjh et al., 1994; Kusmieriek and Singer, 1992). Nous l'avons également constaté en traitant le substrat plasmidique avec le CAA lors de la phase de conception de la puce.

Etonnamment, il existe peu de données sur l'effet génotoxique de ce composé dans les cellules. Par l'utilisation du test des comètes, Brüggemann et al. ont montré que le composé CAA induit des CSBs sur des cellules humaines MX-1 à la dose IC_{50} (Brüggemann et al., 2006). L'augmentation des Ethénobases dans les cellules de hamster V79 traitées à des concentrations comprises entre 10 et 100 mM de CAA a été démontrée par immunodétection (Foiles et al., 1993). Ces deux études ont été conduites à des concentrations bien plus élevées (de l'ordre du mM) que les doses que nous avons utilisées dans notre étude (de l'ordre du μ M). Toutefois, une étude plus récente a montré une augmentation de ϵ A dans l'ADN de cellules Raji traitées au CAA à des concentrations plus faibles (à partir de 30 μ M) par HPLC et détection par fluorescence (Zielinski and Hergenbahn, 2001).

Par ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées à d'autres aspects toxiques du CAA.

Le CAA inhibe les fonctions mitochondriales en bloquant la phosphorylation oxydative ce qui conduit à une diminution de l'ATP intracellulaire et une déplétion en GSH (Brüggemann et al., 2006; Sood and O'Brien, 1993). Or, le GSH joue des rôles importants dans de nombreuses fonctions biologiques autres que la détoxification comme dans la protection du stress oxydatif et la maintenance du potentiel redox cellulaire (Pompella et al., 2003). La déplétion en GSH conduit au processus de peroxydation lipidique et augmente la formation de MDA (Sood and O'Brien, 1993).

Enfin, le CAA réagit préférentiellement avec les protéines plutôt qu'avec l'ADN dans les microsomes de foie de rats (Guengerich et al., 1981).

Ces résultats suggèrent donc que l'effet toxique du CAA est dû à plusieurs facteurs autres que génotoxiques. Il est également important de souligner que les concentrations en CAA utilisées sur l'ADN isolé et sur les cellules A549 et HepG2 lors de notre étude sont très différentes. Pour former une quinzaine de lésions Ethénobases dans le substrat plasmidique, nous avons utilisé une concentration en CAA de 100 mM alors que pour les cellules, des concentrations très faibles (entre 2 et 40 μ M selon la lignée cellulaire) ont été utilisées entraînant 20% de mortalité cellulaire.

Dans les conditions de stress choisies pour cette étude, nous avons montré que les effets cytotoxiques observés ne sont majoritairement pas dus à des effets génotoxiques. Ces conditions réduites de stress (IC_{20}) ne sont probablement pas suffisantes pour conduire à la formation significative de dommages à l'ADN. L'ensemble des résultats que nous avons obtenu et les données présentes dans la littérature laissent supposer que le CAA n'atteindrait probablement pas le noyau et qu'il impacterait donc le compartiment cytosolique en altérant les fonctions mitochondriales ou les protéines.

Du fait de l'impact du CAA sur les mitochondries, il aurait été intéressant d'utiliser un autre test de viabilité cellulaire que le test MTT qui est basé sur la fonctionnalité d'enzymes mitochondriales ce qui a probablement entraîné des résultats artéfactuels.

Nous aurions également pu adopter une autre démarche qui aurait consisté à traiter les cellules avec différentes concentrations en CAA et ainsi évaluer à partir de quelle concentration nous observons une augmentation de la formation des Ethénobases dans l'ADN.

Dans le cas du CAA, nous avons constaté qu'en l'absence de lésions, nous n'induisons pas d'effet sur les systèmes de réparation ce qui est compatible avec le fait que les lésions activent la réparation de l'ADN.

2.2. Variabilité de la réponse cellulaire

Les tests de viabilité cellulaire indiquent que les cellules A549 sont plus sensibles au composé IFO que les cellules HepG2 alors qu'à l'inverse, les cellules A549 sont très peu sensibles au composé B[a]P aux concentrations testées. Rappelons que la dose IC_{20} 24h choisie pour les cellules A549 correspond à la concentration maximale testée et non à une réelle dose IC_{20} . Les cellules HepG2 quant à elles sont très sensibles au composé B[a]P après 48h de traitement puisque la dose IC_{20} 48h est 150 fois inférieure à la dose IC_{20} 24h.

Au cours du premier chapitre, nous avons décrit que les mécanismes de métabolisation pour ces deux composés diffèrent par les enzymes P450, les facteurs de transcription ou encore les protéines d'efflux impliqués. On peut supposer que la sensibilité des lignées aux composés IFO et B[a]P résulte de ces différences.

Suite à l'exposition au B[a]P, nous obtenons pour les deux lignées cellulaires et aux deux temps de traitement des courbes en cloche pour la formation des adduits BPDE-N²-G. Cependant, le nombre d'adduits formés est différent. Alors que les doses utilisées sont plus fortes dans les cellules A549, le niveau d'adduits est bien plus important dans les cellules HepG2. Par opposition, les dommages oxydatifs sont plus élevés dans les cellules A549 que les cellules HepG2. Ces dommages sont d'ailleurs présents en quantité plus importante que les adduits du BPDE dans les cellules A549. Ces résultats laissent supposer que le métabolite BPDE arrive dans le noyau des cellules HepG2 et visiblement pas dans le noyau des cellules A549.

De manière générale, les cellules A549 possèdent des capacités métaboliques plus faibles que les HepG2. Ces dernières sont largement utilisées dans les études toxicologiques d'évaluation des risques chimiques et environnementaux pour leurs fortes capacités de métabolisation bien que l'expression des enzymes de phase I soit plus faible que dans des hépatocytes primaires (Choi et al., 2015b; Uhl et al., 2000; Valentin-Severin et al., 2003; Wilkening et al., 2003).

Les enzymes de phase I impliquées dans la métabolisation du B[a]P sont principalement CYP1A1, CYP1B1 et CYP1A2 pour la voie des diols époxydes. Or, les travaux de Genies et al. ont démontré qu'à l'état basal, CYP1A1 et CYP1A2 sont plus exprimées dans les cellules HepG2 comparées aux cellules A549. Suite à une exposition au B[a]P, les activités de CYP1A1 augmentent considérablement pour les deux lignées cellulaires et plus particulièrement dans les cellules HepG2. De même, les activités de l'enzyme GST de phase II sont légèrement plus élevées pour les cellules HepG2 que les cellules A549 suite à une exposition au B[a]P (Genies et al., 2013).

Au contraire, l'activité de CYP1B1 est plus élevée à l'état basal pour les cellules A549 mais son expression augmente suite à une exposition au B[a]P pour les deux lignées cellulaires.

Le récepteur AhR qui est un facteur de transcription des gènes impliqués dans les phases I et II est présent en quantité plus faible dans les cellules A549 que les cellules HepG2 (Iwanari et al., 2002). La même observation a été faite en comparant les tranches de foie et de poumons de rats (Harrigan et al., 2006).

Tous ces éléments indiquent que les cellules HepG2 ont une plus forte activité métabolique que les cellules A549 à la suite d'une exposition au B[a]P. Cette forte métabolisation du B[a]P pourrait expliquer le nombre plus important d'adduits BPDE-N²-G formés au niveau de l'ADN.

Concernant les protéines d'efflux, les cellules A549 possèdent une surexpression basale de MRP4 comparées aux cellules HepG2. Ceci entraîne une élimination rapide des métabolites de la cellule limitant la formation d'adduits du BPDE (Genies et al., 2013). Ainsi on peut constater que l'élimination

des métabolites par efflux est une stratégie de protection efficace pour éviter la formation de lésions. Ceci peut également être dû à des différences de cinétique entre les phases I et II de la métabolisation, si la phase II est plus rapide que la phase I alors le nombre de lésions formées sera également plus faible.

La formation des dommages 8oxoG au sein des cellules A549 peut s'expliquer par l'implication d'une autre voie de métabolisation : la voie des o-quinones impliquant les enzymes AKR. Il existe une compétition entre la voie des diols-époxydes et la voie o-quinone. Or, des études ont observé une surexpression de AKR1C1 dans les cellules A549 ainsi que d'autres isoformes AKR1C2 et C3 (Genies et al., 2013; Jiang et al., 2005; Quinn and Penning, 2008). Cette voie est responsable de la formation de ROS et donc de la formation de dommages oxydatifs importants (Jiang et al., 2005; Park et al., 2006a, 2008).

Les enzymes P450 impliquées dans la métabolisation de l'IFO sont différentes de celles du B[a]P. On retrouve les enzymes CYP3A4, 3A5 et CYP2B6 pour les deux voies d'activation et de désactivation de l'IFO (Huang et al., 2000).

Une équipe s'est intéressée à l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie des xénobiotiques pour plusieurs lignées cellulaires dont les cellules A549 et HepG2. Ils ont constaté que l'expression basale de CYP3A4 et 3A5 est plus élevée dans les cellules HepG2 (Garcia-Canton et al., 2013). Une autre étude a montré que le niveau d'expression de CYP2B6 est plus élevée comparé à d'autres CYP450 dans les cellules HepG2 (Choi et al., 2015b). De plus, les cellules A549 ne possèdent pas de récepteurs PXR et CAR entraînant une auto-induction de l'IFO contrairement aux cellules HepG2 (Hukkanen, 2003; Maruyama et al., 2007).

Ces données montrent une nouvelle fois que les capacités métaboliques sont plus importantes pour la lignée HepG2 vis-à-vis du deuxième agent progénotoxique utilisée, l'IFO. Nous avons constaté que les cellules A549 sont plus sensibles que les cellules HepG2 suite aux tests de viabilité cellulaire. Comme nous l'avons mentionné pour le CAA, tout effet toxique est le résultat de nombreuses réactions biochimiques au sein de la cellule. L'effet cytotoxique de l'IFO pour les cellules A549 peut donc être le résultat de plusieurs facteurs et n'est pas forcément lié aux capacités de métabolisation.

Les tests de réparation ont montré une modulation des activités de réparation pour les deux agents progénotoxiques uniquement au niveau des cellules HepG2, soit pour la lignée cellulaire possédant les capacités de métabolisation les plus importantes.

Pour le composé B[a]P, nous avons constaté que le nombre de lésions formées varie fortement en fonction des capacités métaboliques des cellules ainsi que des voies de métabolisation empruntées par la cellule. Cependant, nous ne pouvons pas faire de lien entre capacité de métabolisation, quantité de

dommages et voies de réparation puisque dans le cas de l'IFO nous n'avons pas mis en évidence de différences dans le nombre de lésions formées.

2.3. Seuil de la réponse cellulaire

Dans le cadre du développement de BM, la dose-réponse est un élément essentiel à prendre en considération. Nous savons aussi qu'aujourd'hui, les faibles doses font l'objet de nombreuses recherches car elles sont plus proches des conditions d'exposition potentielle de la population. En toxicologie, les données récentes montrent que la relation entre dose et toxicité n'est pas toujours linéaire et que des effets toxiques chroniques peuvent se manifester à des doses faibles voire très faibles, proches des doses auxquelles certaines populations peuvent être exposées et non prévisibles par les études classiques à forte dose (Bouskine et al., 2009; Vandenberg et al., 2012). Ceci a également été démontré dans le domaine de radiobiologie où de récentes études épidémiologiques ont souligné l'impact des effets des faibles doses d'irradiation sur la cancérogénèse (Leuraud et al., 2015; Richardson et al., 2015). Il est maintenant établi que la cellule réagit à de faibles doses, en stimulant des mécanismes de défense et éventuellement en induisant une mort cellulaire (Moustacchi, 2000).

Afin de prendre en considération tous ces éléments, nous avons choisi d'étudier trois doses de traitement pour chacun des composés : une dose entraînant un faible niveau de toxicité IC_{20} et deux doses n'entraînant pas de toxicité : une dose intermédiaire $IC_{20}/10$ et une dose très faible $IC_{20}/50$. Les résultats obtenus sont différents en fonction des composés, de la lignée cellulaire, du temps de traitement et de la méthode utilisée. Ils sont résumés dans le Tableau 17. Le sigle « \emptyset » signifie que nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives que ce soit pour la quantification des lésions ou le test de réparation.

Concernant la quantification des lésions, le tableau présente l'aspect des courbes de formation des adduits du BPDE à la dose IC_{20} puisque nous avons effectué ces cinétiques uniquement pour cette dose.

Concernant le test ExSy-SPOT, le sigle « + » indique une stimulation significative des activités de réparation. Plus le nombre de « + » augmente plus la stimulation est forte. Le sigle « - » signale une inhibition significative des activités de réparation sur le même principe qu'énoncée précédemment.

	Méthodes	Quantification des lésions		Quantification de la réparation de l'ADN					
	Lignées	A549	HepG2	A549			HepG2		
Composés	Dose	IC ₂₀	IC ₂₀	IC ₂₀ /50	IC ₂₀ /10	IC ₂₀	IC ₂₀ /50	IC ₂₀ /10	IC ₂₀
	Temps								
CAA	24h	∅		∅					
	48h	∅		∅					
IFO	24h	∅		∅			+	++	∅
	48h	∅		∅			∅		
BPDE	24h			∅	∅	+	∅	+++	∅
	48h			∅			∅	+	++
B[a]P	24h			∅			∅		
	48h			∅			∅	∅	---

Tableau 17 - Tableau récapitulatif des différents résultats obtenus en fonction des composés, de la lignée cellulaire, du temps de traitement et de la méthode utilisée. Le sigle « ∅ » signifie que nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives que ce soit pour la quantification des lésions ou le test de réparation. Concernant la quantification des lésions (HPLC-MS/MS), les symboles représentés dans ce tableau correspondent à la forme des courbes obtenues lors de la cinétique de formation des adduits. Pour la quantification de la réparation de l'ADN (Test ExSy-SPOT), le sigle « + » indique une stimulation significative des activités de réparation. Plus le nombre de « + » augmente plus la stimulation est forte. Le sigle « - » signale une inhibition significative des activités de réparation sur le même principe qu'énoncée précédemment.

Pour le composé IFO, nous avons constaté une courbe en cloche en fonction de la dose avec une stimulation des activités de réparation des cellules HepG2 aux deux doses les plus faibles IC₂₀/10 et IC₂₀/50. Cette stimulation est maximale à la dose intermédiaire. Il est à noter qu'aucun dommage n'a été détecté.

Pour le composé BPDE, on obtient une stimulation dose-dépendante des activités de réparation de l'ADN pour les deux lignées cellulaires, sauf pour les cellules HepG2 traitées à 24h où une courbe en cloche est observée. Au sein de cette courbe, l'effet est particulièrement marqué à la dose intermédiaire où l'on obtient une forte stimulation des activités de réparation pouvant aller jusqu'à un facteur 5 pour 8oxoG, par exemple. Ces stimulations des activités de réparation sont associées à la présence d'adduits du BPDE.

Pour le composé B[a]P, nous avons quantifié des lésions pour les deux lignées cellulaires et les deux temps de traitement mais nous avons observé une modulation des activités de réparation uniquement pour les cellules HepG2 au temps de traitement de 48h. Le profil de réparation est une nouvelle fois différent avec une inhibition dose-dépendante des activités de réparation.

Concernant la formation des lésions, on a observé que le nombre de dommages est corrélé à la dose appliquée. Toutefois, le nombre de lésions dépend du type cellulaire puisque, pour le composé BPDE, plus de lésions sont formées dans les cellules HepG2 que dans les cellules A549. Dans le cas des agents progénotoxiques et notamment le B[a]P, le nombre de lésions formées va également dépendre des capacités de métabolisation des cellules comme nous l'avons constaté précédemment.

Au niveau des activités de réparation, nous n'avons pas forcément de corrélation entre la modulation des activités de réparation et le nombre de dommages formés puisque, pour le composé IFO, nous avons constaté une activation des systèmes de réparation en l'absence de dommages mesurés. Par ailleurs, différents cas de figure sont observés en fonction des composés et des doses testées. L'activation des systèmes de réparation n'est donc pas uniquement liée à la présence de lésions.

La diversité des effets observée aux différentes doses reflète l'intervention de multiples facteurs dont nous allons discuter.

Ces multiples facteurs sont principalement regroupés dans le mécanisme régulateur de la DDR. Tout d'abord, les lésions de l'ADN sont détectées par des protéines de signalisation et leur activité est modulée selon le nombre de lésions (donc la dose). Ces protéines activent des transducteurs comme ATM ou ATR qui vont à leur tour moduler l'action de protéines intervenants dans différents événements cellulaires comme le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou le déclenchement de la mort cellulaire.

Une véritable stratégie est donc mise en place afin que la cellule adapte sa réponse grâce à des mécanismes élaborés de signalisation interne que nous venons de citer qui activent des réactions de défense.

Le test de réparation intègre la globalité de ces éléments et révèle la complexité des mécanismes de défense contre les agents génotoxiques en fonction de la dose et du temps. De plus, la rapidité et l'efficacité de la réponse cellulaire dépend des processus moléculaires mis en jeu qui peuvent être « rapides » grâce à des modifications post-traductionnelles ou plus « lents » avec la transcription des gènes de la DDR.

Les résultats obtenus montrent la sensibilité et la réactivité des mécanismes de réparation puisque même à de très faibles doses d'agents génotoxiques (et donc lorsque le nombre de lésions est faible), nous mettons en évidence des effets sur la réparation de l'ADN.

2.4. Spécificité de la réponse cellulaire

Le dernier paramètre que nous avons évalué concerne la spécificité de la réponse cellulaire. L'objectif est d'examiner la relation entre l'agent génotoxique, les lésions formées et les voies de réparation afin d'observer si la signature enzymatique de réparation obtenue nous permet de discriminer la nature de l'agent génotoxique.

Au niveau des tests de réparation, nous n'avons pas mis en évidence de spécificité de la réponse cellulaire pour un agent génotoxique donné. Cependant, nous avons obtenu des signatures enzymatiques de réparation différentes en fonction des composés testés, des deux lignées cellulaires, des doses et des temps de traitement utilisés. La suite de la discussion propose des hypothèses afin d'éclaircir les réponses obtenues.

Suite au traitement à l'IFO des cellules HepG2, nous avons constaté une stimulation des activités de la voie BER qui est notamment plus marquée pour 8oxoG. Néanmoins, nous n'avons pas détecté de dommages de type Ethénobases et 8oxoG. Nous n'avons donc à première vue pas de lien entre les dommages formés et la réparation de l'ADN.

Dans le premier chapitre, nous avons décrit que l'IFO est une molécule prise en charge par la voie des xénobiotiques et que la phase I comporte deux voies distinctes : la N-déchloroéthylation (conduisant au composé CAA) et la 4-hydroxylation. Cette dernière voie conduit à deux autres types de métabolites toxiques : l'IPM et l'acroléine. Or, ces deux métabolites sont également connus pour former des adduits à l'ADN. L'IPM conduit à des pontages inter ou intra-brins (Figure 47) et l'acroléine forme des adduits α et γ -hydroxy-1,N²-propano-G.

Il a été démontré que l'acroléine est responsable de la production de ROS soit directement ou par formation de peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Adams and Klaidman, 1993; Korkmaz et al., 2007; Takabe et al., 2001). Ceci a d'ailleurs été montré spécifiquement pour les cellules HepG2 (Li et al., 2008; Mohammad et al., 2012). ONOO⁻ entraîne un stress oxydatif pouvant entraîner un processus de peroxydation lipidique, d'oxydation des protéines et de dommages à l'ADN (Korkmaz et al., 2007).

Les ROS et la peroxydation lipidique ne se limitent pas à la formation d'Ethénobases et de 8oxoG. Par exemple, même si la 8oxoG est la lésion la plus abondamment produite par les ROS, plus de 100 types de dommages oxydatifs différents peuvent être formés par les ROS (Cadet et al., 2010).

Il aurait été inenvisageable de quantifier l'ensemble de ces dommages, mais nous aurions pu considérer de mesurer la production de ROS intracellulaire avec par exemple, le test H2-DCF-DA utilisé comme

indicateur de ROS. Ce test aurait permis de démontrer l'existence du stress oxydatif et ainsi expliquer la stimulation de la voie BER et en particulier de la 8oxoG.

Il n'existe pas de données sur la modulation des activités de réparation suite à l'exposition à l'IFO. Les seules données qui existent concernent l'acroléine où une équipe s'est intéressée à l'effet de l'acroléine sur la réparation de l'ADN en effectuant le test HCR. Ils ont montré que celui-ci entraînait une inhibition de la voie de réparation NER (Feng et al., 2006). Une autre étude a également montré que l'acroléine provoque la dégradation de protéines de réparation impliquées dans les voies de réparation NER, BER et MMR et entraîne donc une inhibition de ces voies de réparation. Cependant, les doses utilisées entraînent une cytotoxicité importante comprise entre 50 et 90% (Wang et al., 2012).

Par ailleurs, il a été démontré que ONOO^- produit par l'acroléine peut conduire à des dommages et entraîner l'activation de PARP qui est une des protéines impliquées dans les premiers événements de la DDR (Korkmaz et al., 2007). PARP peut ensuite entraîner des modifications post-traductionnelles afin d'activer des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Etant donné le peu d'informations existant sur l'impact de l'IFO sur les voies de réparation, il est difficile d'interpréter l'activation de la voie BER que nous observons avec le test de réparation au-delà d'un effet dû au stress oxydatif. Nous aurions pu envisager de doser les lésions créées par l'acroléine ou l'IPM.

Dans le cas du B[a]P, les tests de réparation ont montré une inhibition des activités de réparation au temps de traitement 48h tandis que la cinétique de formation des adduits du BPDE présente une courbe en cloche qui prouve que les voies de réparation ont éliminé les dommages formés au cours du traitement entre 0 et 48h. L'hypothèse permettant d'expliquer ces résultats est liée à une régulation temporelle des systèmes de réparation de l'ADN. En effet, il est tout à fait probable que dans un premier temps, il y ait eu une activation des systèmes de réparation puis que la cellule ait ensuite été « débordée » par la formation des lésions et que le mécanisme de la DDR entraîne un arrêt du cycle cellulaire permettant la reconstitution des activités de réparation ou engendre la mort cellulaire.

Plusieurs études menées sur la lignée cellulaire HepG2 ont montré que suite à l'exposition au B[a]P, on observe une augmentation de la protéine p53 impliquée dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Lin et al., 2008; Park et al., 2006b).

Dans la première étude effectuée par Park et al., les cellules HepG2 ont été exposées à des temps compris entre 6 et 24h et à des doses comprises entre 0.1 et 10 μM de B[a]P. Ils ont montré par Western Blot que la forme phosphorylée de p53 correspondant à son activation est augmentée de manière dose-dépendante suite au traitement B[a]P. Par la suite, ils se sont intéressés à la protéine p21, une des cibles

de p53 impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire dont l'expression est augmentée en fonction du temps de traitement. Son expression est la plus élevée au temps de traitement le plus long soit 24h après traitement au B[a]P. Ils ont également constaté que l'expression des ARNm de ces deux protéines est plus élevée suite au traitement.

Grâce à la cytométrie en flux et aux marqueurs : annexine V-FITC et iodure de propidium, une autre étude a révélé que le traitement des cellules HepG2 au B[a]P entraîne une mort cellulaire par nécrose à partir de 24h de traitement où aucune cytotoxicité n'est observée (Lin and Yang, 2008).

L'étude la plus récente a confirmé l'activation de p53 (sous forme phosphorylée) et a indiqué que celle-ci s'effectuerait par la voie des MAP Kinases. Les MAPK sont impliquées dans plusieurs événements cellulaires et il existe plusieurs types de MAPK. L'exposition au B[a]P induirait spécifiquement les voies p38 et ERK (Lin et al., 2008). Le mécanisme par lequel la voie des MAPK est activée n'est pas encore élucidé.

Par ailleurs, l'implication du récepteur AhR dans l'apoptose reste controversée. Certaines études ont indiqué que AhR joue un rôle dans l'activation de l'apoptose, tandis que d'autres suggèrent que ce récepteur diminuerait l'entrée en apoptose des cellules (Elizondo et al., 2000; Park, 2004).

Tous ces résultats tendent soit vers une entrée en mort cellulaire ou un arrêt du cycle cellulaire suite au traitement au B[a]P et de manière dose-dépendante avec p53 jouant un rôle central dans cette réponse. Ces données expliquent les résultats du test de réparation pour lesquelles nous observons une inhibition des activités de réparation de manière dose-dépendante pouvant refléter d'un arrêt du cycle cellulaire ou éventuellement de l'entrée en mort cellulaire.

Par opposition au profil de réparation obtenu avec le composé B[a]P, le composé BPDE stimule les activités de réparation des deux lignées cellulaires et aux deux temps de traitement excepté pour les cellules A549 (uniquement après 24h de traitement). Pour les trois profils de réparation, on observe une forte stimulation du niveau de réparation de 8oxoG et Ethéno. De plus, la réponse la plus élevée est obtenue suite au traitement des cellules HepG2 à la dose IC₂₀/10 pendant 24h. Dans ce cas-ci, nous constatons une stimulation très élevée au niveau de 8oxoG (facteur 5), de BPDE et Ethéno (facteur 3).

Quelques études se sont intéressées à la comparaison des gènes induits en réponse au traitement au B[a]P et BPDE (Hockley et al., 2007; Souza et al., 2016). Elles ont montré que les gènes induits sont très différents en fonction du composé et des lignées cellulaires. Nous allons nous focaliser sur l'étude menée par Souza et al. puisque celle-ci a été effectuée sur une des lignées cellulaires que nous avons choisi, les cellules HepG2. Ils ont démontré que le BPDE est le seul à activer la voie des pentoses

phosphates (PPP) et la DDR via la voie ATM. Or, ces deux voies sont corrélées et coopèrent notamment dans la réponse aux CDBs. ATM augmente l'activité de l'enzyme G6PD impliquée dans la voie PPP (Cosentino et al., 2011). La voie PPP est active dans toutes les cellules et permet la production de NADPH, la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), de co-enzymes (NAD⁺, FAD, ...) ainsi que des pentoses phosphates. Par ailleurs, NADPH joue un rôle essentiel dans la détoxification, le maintien du pouvoir redox avec la synthèse de GSH ainsi que la production de nucléotides. La voie PPP est donc fortement liée aux défenses antioxydantes. La fonction de ATM ne limite donc pas à la réponse aux CDBs puisqu'elle est également impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Ito et al., 2004; Shackelford et al., 2001) en agissant comme un senseur des ROS (Rotman and Shiloh, 1997).

Ces données suggèrent que contrairement à ce qui se passe avec le B[a]P, les cellules traitées par BPDE sont capables de s'adapter rapidement suite aux dommages formés dans l'ADN via la voie ATM et la stimulation de la voie des PPP permettant d'augmenter le pool de nucléotides nécessaire pour le remplacement des bases endommagées et de se protéger contre le stress oxydant.

Une étude récente a également montré que certains gènes (DDB2, XPC, XPF et XPG) impliqués dans la voie de réparation NER sont fortement induits suite au traitement au BPDE (Christmann et al., 2016). L'induction du gène DDB2 a notamment été montré au cours de précédentes recherches (Hockley et al., 2006, 2008). Ces résultats sont cohérents avec nos observations.

Il n'est pas possible de pouvoir expliquer en intégralité les résultats obtenus avec le test de réparation. Cependant, ces données apportent des pistes quant à la stimulation des voies de réparation BER et NER observée avec le test de réparation. L'implication de la voie PPP et ATM permettrait d'expliquer la forte stimulation constatée au niveau de 8oxoG.

Par ailleurs, il existe une corrélation entre les dommages formés et les activités de réparation de l'ADN pour ce composé puisque parmi les quatre composés testés, le BPDE est celui qui conduit à la quantité d'adduits la plus importante et qui nous a permis d'observer des stimulations très marquées des voies de réparation.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Au cours de ce projet de recherche, nous avons tout d'abord adapté le test de réparation afin de pouvoir étudier l'impact des agents génotoxiques auxquels nous nous sommes intéressés. L'hypothèse de départ était que chaque lésion particulière pouvait présenter une spécificité dans sa réparation, au niveau basal ou en réponse à un stress génotoxique. La mise au point de la puce est une étape délicate car elle conditionne la qualité des résultats obtenus lors des tests. Plusieurs critères essentiels doivent être validés. Concernant la préparation des substrats plasmidiques, nous devons nous assurer que nous formons de manière préférentielle les dommages désirés afin que les activités enzymatiques mesurées correspondent bien à la réparation du dommage d'intérêt. Pour cela, les réactions chimiques doivent être les plus spécifiques possibles, c'est pourquoi nous avons utilisé les agents génotoxiques CAA et BPDE déjà connus au laboratoire. Nous avons quantifié les lésions à l'aide de la méthode HPLC-MS/MS. Cette quantification est essentielle pour adapter le nombre de lésions formées dans le plasmide déterminant ensuite le niveau de réparation obtenu avec le test de réparation. Cependant, nous avons montré que dans le cas des adduits du BPDE, le nombre de lésions présentes n'est pas le seul facteur conditionnant le niveau de réparation dans le substrat plasmidique et que d'autres paramètres sont à considérer. Nous avons notamment souligné qu'outre les protéines de réparation de la voie NER, la configuration stéréochimique de ces adduits peut intervenir dans l'efficacité de leur réparation.

Cette première phase de conception de la puce nous a permis d'élargir la gamme de lésions disponibles pour le test ExSy-SPOT.

Par la suite, nous avons exploré les conséquences de l'exposition à deux types d'agents exogènes : progénotoxiques et génotoxiques. Les agents progénotoxiques nécessitent d'être préalablement métabolisés avant de conduire à la formation de dommages à l'ADN. La voie des xénobiotiques est paradoxale puisque celle-ci a pour objectif de détoxifier la cellule mais qu'elle entraîne également la formation de métabolites génotoxiques conduisant à des dommages à l'ADN.

Deux modèles cellulaires aux capacités de métabolisation différentes ont été choisis pour cette étude. Nous avons constaté que les cellules A549 ne représentent pas forcément un bon modèle pour l'étude des agents progénotoxiques sélectionnés puisque nous n'avons mis pas mis en évidence de différences au niveau des activités de réparation suite à l'exposition avec les composés IFO et B[a]P. De plus, nous avons constaté que malgré l'utilisation de fortes doses en B[a]P très peu de lésions sont formées dans les cellules. Cette lignée cellulaire possède probablement des mécanismes d'efflux importants

permettant de limiter la formation des lésions ou même l'entrée des composés lipophiles. Il est cependant intéressant de constater que l'absence de formation de lésions est associée à une absence d'induction des systèmes de réparation de l'ADN.

Nous confirmons par ailleurs que la lignée cellulaire HepG2 possède de fortes capacités de métabolisation et qu'elle constitue un modèle de choix dans l'étude des agents pro-génotoxiques. En effet, le nombre de lésions formées en cas d'exposition génotoxique au B[a]P est important indiquant que l'étape de métabolisation a bien eu lieu.

Il est généralement admis que suite à la formation de dommages, les voies de réparation sont activées et que si le nombre de dommages est trop important la cellule entre en arrêt de cycle ou même enclenche des processus de mort cellulaire. Or, nous avons vu à travers l'utilisation des tests de réparation que la modulation des activités de réparation de l'ADN est bien plus complexe. Il peut y avoir des activations des voies de réparation lorsque la cellule ne présente visiblement pas ou peu de dommages à l'ADN.

Nous avons obtenu des profils de réparation propres à chaque lignée cellulaire, chaque dose testée, chaque temps de traitement et chaque composé pro ou génotoxique.

Les signatures enzymatiques de réparation dépendent de nombreux paramètres et nous avons constaté qu'elles ne sont pas toujours simples à interpréter. Plusieurs hypothèses ont été avancées afin de pouvoir comprendre les résultats obtenus. Cependant, ils demandent de futures investigations afin de les élucider.

Les progrès des recherches biologiques ont montré la complexité et la puissance des mécanismes de défense contre les agents génotoxiques. En effet, la régulation des systèmes de réparation est très complexe et la cellule ne subit pas passivement les agressions de types endogènes ou exogènes puisqu'elle est capable d'adapter sa réponse de manière fine et contrôlée par de nombreux mécanismes. Nous avons notamment mis en avant le rôle du mécanisme régulateur de la DDR mais également d'autres processus comme les voies de signalisation. L'influence de la métabolisation dans la réponse cellulaire est également un paramètre important à ne pas négliger.

Dans le cadre de ce projet, nous avons remarqué que l'impact des faibles doses n'est pas négligeable et que même si peu de lésions sont formées, il peut tout de même y avoir une modulation des activités de réparation. Les mécanismes conduisant à cette modulation ne sont cependant pas compris et restent un sujet d'investigation intéressant.

A propos des deux outils que nous avons choisis, le dosage des lésions par HPLC-MS/MS est une méthode très spécifique qui nous a permis d'obtenir des informations sur la formation et la réparation des dommages au cours du temps. De plus, c'est un moyen intéressant pour mesurer l'exposition génotoxique et les nouveaux développements en cours devrait permettre d'augmenter la sensibilité de détection des lésions de l'ADN dans un avenir proche.

La complexité de la réparation de l'ADN est ici appréhendée au moyen de l'utilisation d'un test de mesure d'activités enzymatiques de réparation multiplexé. Ce test apporte donc de nouvelles informations par rapport aux tests existants qui ne permettent généralement d'étudier qu'un dommage à la fois. Un même extrait protéique nous permet de quantifier simultanément la réparation de plusieurs types de dommages. C'est donc un outil exploratoire puissant permettant de soulever des pistes de recherches nouvelles. Toutefois, le test présente des limites. En particulier, l'utilisation de substrats plasmidiques ne nous permet pas d'être dans un modèle chromatinien. Or, les modifications de la conformation de la chromatine sont également détectées par des protéines de signalisation et sont très importantes dans le déclenchement des voies de réparation (Lukas et al., 2011).

A travers ce projet, nous avons évalué les capacités de réponses aux dommages à l'ADN en réponse à plusieurs types de stress génotoxique. Or, ce type d'étude n'a jamais été mené auparavant. Etant donné le caractère exploratoire de ce projet avec le test de réparation, nous avons quantifié les lésions formées par HPLC-MS/MS qui est une méthode de référence classiquement employée dans l'étude des agents génotoxiques. Celle-ci nous a permis de vérifier que l'agent génotoxique utilisé entraînait bien la formation du type de dommage lié à ce composé mais également de quantifier les dommages oxydatifs souvent formés en parallèle. Il aurait été difficile d'appréhender les résultats obtenus avec le test de réparation sans avoir d'informations sur le type et le nombre de dommages formés.

Les deux outils utilisés au cours de ce travail nous apportent des informations complémentaires. L'un est basé sur la mesure des adduits dans les cellules et l'autre s'intéresse aux activités enzymatiques des protéines de réparation.

Concernant l'objectif d'identification de biomarqueurs grâce au test de réparation, nous n'avons pas mis en évidence de réponse spécifique à un composé donné. Le test ne nous permet donc pas de discriminer les différents composés suite à l'exposition des modèles cellulaires que nous avons testés. Or, les BM doivent être sensibles et spécifiques. Ici, nous avons montré la sensibilité du test avec une

modulation des activités de réparation même aux très faibles doses testées mais le paramètre de la spécificité n'est pas validé.

Idéalement, un biomarqueur doit être spécifique de l'exposition. Cependant, les BM manquent souvent de spécificité et peuvent refléter de l'exposition à d'autres agents environnementaux ou à d'autres stress tels que l'inflammation ou le stress oxydant.

A ce jour, il n'y a aucun outil idéal et le manque de spécificité des BM ne permet pas de les utiliser seuls. Il est nécessaire d'associer plusieurs tests complémentaires pour évaluer l'exposition à des agents génotoxiques.

L'évaluation des risques sanitaires pour les populations exposées à des contaminants environnementaux ou professionnels est un véritable enjeu de santé publique mais demeure une tâche particulièrement difficile. Il faut aussi considérer le fait que les individus sont rarement exposés à un agent mais souvent à plusieurs contaminants. Par exemple, les HAPs sont émis en mélanges complexes et de compositions variables capables de surcroit de moduler la génotoxicité des composés (Tarantini et al., 2011).

Certains individus sont sans doute plus susceptibles que d'autres aux conséquences néfastes des expositions aux génotoxiques. Les défauts des mécanismes de réparation font partie des mécanismes conduisant à un risque accru d'effets secondaires indésirables et de risques de cancers suite aux expositions génotoxiques environnementales ou professionnelles. Mais ce domaine reste peu exploré, sauf à travers l'étude de polymorphisme de gènes.

La connaissance des réponses et mécanismes cellulaires de défense est indispensable pour mettre au point des méthodes de prévention et pour identifier ces individus à risque. Ce travail se veut un apport à cette connaissance et reste à approfondir.

Plusieurs perspectives se dessinent à la suite de ce travail. Nous pourrions envisager de faire des cinétiques plus fines aux différentes doses testées pour établir sur un lien plus précis entre le nombre initial de lésions formées et les activités de réparation impactées.

La question de l'identification des mécanismes déclenchant l'activation des systèmes de réparation de l'ADN suite aux agressions génotoxiques reste ouverte. La présence de lésions est un mécanisme démontré mais à l'évidence, il n'est pas unique.

De même, la détermination de la modulation des activités de réparation au cours du temps (intervalle entre 0 et 48h voire 72h post-exposition) permettrait d'appréhender la régulation temporelle des différentes activités. En particulier, une analyse en parallèle de la transcription de gènes clés de la réparation ainsi que des protéines serait intéressante, à différentes doses, pour mieux comprendre la régulation des différentes activités et de la DDR.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques :

- Adams, J.D., and Klaidman, L.K. (1993). Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 187–193.
- Adelman, R., Saul, R.L., and Ames, B.N. (1988). Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2706–2708.
- Akbari, M., Peña-Díaz, J., Andersen, S., Liabakk, N.-B., Otterlei, M., and Krokan, H.E. (2009). Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. *DNA Repair* 8, 834–843.
- Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity--Critical Analysis and Update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012641–a012641.
- Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N.M., Abraham, R.T., and Wang, X.-F. (2004). Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev.* 18, 249–254.
- Andressoo, J.-O., Hoeijmakers, J.H.J., and Waard, H. (2005). Nucleotide Excision Repair and its Connection with Cancer and Ageing. In *Genome Instability in Cancer Development*, N. Back, I.R. Cohen, D. Kritchevsky, A. Lajtha, R. Paoletti, and E.A. Nigg, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 45–83.
- ANSES (2017). Les valeurs limites biologiques pour les agents chimiques en milieu professionnel.
- Arab, K., Pedersen, M., Nair, J., Meerang, M., Knudsen, L.E., and Bartsch, H. (2008). Typical signature of DNA damage in white blood cells: a pilot study on etheno adducts in Danish mother-newborn child pairs. *Carcinogenesis* 30, 282–285.
- Arenas-Huertero, F., Apátiga-Vega, E., Miguel-Pérez, G., Villeda-Cuevas, D., and Trillo-Tinoco, J. (2011). Molecular markers associated with the biological response to aromatic hydrocarbons from urban air in humans. In *Air Pollution-New Developments*, (InTech), p.
- ATSDR (2005). TOXICOLOGICAL PROFILE FOR VINYL CHLORIDE (Agency for Toxic Substances and Disease Registry).
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining. *J. Biol. Chem.* 279, 55117–55126.
- Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S.A.S., O'Neill Gaivao, I., and Collins, A. (2014). Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front. Genet.* 5.
- Badouard, C., Ménéz, Y., Panteix, G., Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J., and Favier, A. (2008). Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 16, 9–13.
- Bak, S.T., Sakellariou, D., and Pena-Díaz, J. (2014). The dual nature of mismatch repair as antimutator and mutator: for better or for worse. *Front. Genet.* 5.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499.

- Ball, H.L., Myers, J.S., and Cortez, D. (2005). ATRIP binding to replication protein A-single-stranded DNA promotes ATR–ATRIP localization but is dispensable for Chk1 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2372–2381.
- Barbeau, D., Maître, A., and Marques, M. (2011). Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction. *The Analyst* *136*, 1183.
- Bartsch, H., and Nair, J. (2004). Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* *28*, 385–391.
- Bartsch, H., Malaveille, C., Barbin, A., and Planche, G. (1979). Mutagenic and alkylating metabolites of halo-ethylenes, chlorobutadienes and dichlorobutenes produced by rodent or human liver tissues: Evidence for oxirane formation by P450-linked microsomal mono-oxygenases. *Arch. Toxicol.* *41*, 249–277.
- Bartsch, H., Barbin, A., Marion, M.-J., Nair, J., and Guichard, Y. (1994). Formation, Detection, and Role In Carcinogenesis of Ethenobases in Dna. *Drug Metab. Rev.* *26*, 349–371.
- Bartsch, H., Arab, K., and Nair, J. (2011). Biomarkers for hazard identification in humans. *Environ. Health* *10*.
- Bass, T.E., Luzwick, J.W., Kavanaugh, G., Carroll, C., Dungrawala, H., Glick, G.G., Feldkamp, M.D., Putney, R., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2016). ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity. *Nat. Cell Biol.* *18*, 1185–1195.
- Bauer, N.C., Corbett, A.H., and Doetsch, P.W. (2015). The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res.* gkv1136.
- Beerens, N., Hoeijmakers, J.H.J., Kanaar, R., Vermeulen, W., and Wyman, C. (2005). The CSB Protein Actively Wraps DNA. *J. Biol. Chem.* *280*, 4722–4729.
- Bergink, S., and Jentsch, S. (2009). Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* *458*, 461–467.
- Bernstein, C. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *511*, 145–178.
- Biegging, K.T., Mello, S.S., and Attardi, L.D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* *14*, 359.
- Biola-Clier, M., Beal, D., Caillat, S., Libert, S., Armand, L., Herlin-Boime, N., Sauvaigo, S., Douki, T., and Carriere, M. (2017). Comparison of the DNA damage response in BEAS-2B and A549 cells exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Mutagenesis* *32*, 161–172.
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* *66*, 801–817.
- Boddy, A.V., and Yule, S.M. (2000). Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clin. Pharmacokinet.* *38*, 291–304.

- Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D.J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T.K., Burma, S., and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* *38*, 1821–1831.
- Bolt, H.M. (1986). Metabolic activation of vinyl chloride, formation of nucleic acid adducts and relevance to carcinogenesis. *IARC Sci. Publ.* 261–268.
- Bolt, H.M., Laib, R.J., Kappus, H., and Buchter, A. (1977). Pharmacokinetics of vinyl chloride in the rat. *Toxicology* *7*, 179–188.
- Börner, K., Kiso, J., Brüggemann, S.K., Hagenah, W., Peters, S.O., and Wagner, T. (2000). Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab. Dispos.* *28*, 573–576.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., and Fenichel, P. (2009). Low Doses of Bisphenol A Promote Human Seminoma Cell Proliferation by Activating PKA and PKG via a Membrane G-Protein–Coupled Estrogen Receptor. *Environ. Health Perspect.* *117*, 1053–1058.
- Brandt, H.C.A., and Watson, W.P. (2003). Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann. Occup. Hyg.* *47*, 349–378.
- Breen, A.P., and Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* *18*, 1033–1077.
- Brosselin, and El Yamani (2006). *Guide pratique cancer et environnement*. Afsset.
- Brüggemann, S.K., Radike, K., Braasch, K., Hinrichs, J., Kiso, J., Hagenah, W., Peters, S.O., and Wagner, T. (2006). Chloroacetaldehyde: mode of antitumor action of the ifosfamide metabolite. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *57*, 349–356.
- Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* *141*, 243–254.
- Butenandt, J., Burgdorf, L.T., and Carell, T. (1999). Synthesis of DNA lesions and DNA-lesion-containing oligonucleotides for DNA-repair studies. *Synthesis* *1999*, 1085–1105.
- Buterin, T., Hess, M.T., Luneva, N., Geacintov, N.E., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., and Naegeli, H. (2000). Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Res.* *60*, 1849–1856.
- Byun, T.S. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* *19*, 1040–1052.
- Cadet, J. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *531*, 5–23.
- Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *571*, 3–17.
- Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.-L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* *49*, 9–21.

- Cadet, J., Mouret, S., Ravanat, J.-L., and Douki, T. (2012). Photoinduced Damage to Cellular DNA: Direct and Photosensitized Reactions†. *Photochem. Photobiol.* *88*, 1048–1065.
- Cai, Y., Patel, D.J., Broyde, S., and Geacintov, N.E. (2010). Base Sequence Context Effects on Nucleotide Excision Repair. *J. Nucleic Acids* *2010*, 1–9.
- Campo, L., Fustinoni, S., Buratti, M., Cirila, P.E., Martinotti, I., and Foà, V. (2007). Unmetabolized Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urine as Biomarkers of Low Exposure in Asphalt Workers. *J. Occup. Environ. Hyg.* *4*, 100–110.
- Cao, L., Xu, X., Bunting, S.F., Liu, J., Wang, R.-H., Cao, L.L., Wu, J.J., Peng, T.-N., Chen, J., Nussenzweig, A., et al. (2009). A Selective Requirement for 53BP1 in the Biological Response to Genomic Instability Induced by Brca1 Deficiency. *Mol. Cell* *35*, 534–541.
- Ceccaldi, R., Liu, J.C., Amunugama, R., Hajdu, I., Primack, B., Petalcorin, M.I.R., O'Connor, K.W., Konstantinopoulos, P.A., Elledge, S.J., Boulton, S.J., et al. (2015). Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. *Nature* *518*, 258–262.
- Ceccaldi, R., Sarangi, P., and D'Andrea, A.D. (2016). The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 337–349.
- Chaturvedi, P., Eng, W.K., Zhu, Y., Mattern, M.R., Mishra, R., Hurler, M.R., Zhang, X., Annan, R.S., Lu, Q., Faucette, L.F., et al. (1999). Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* *18*, 4047–4054.
- Chen, Y., Huang, C., Bai, C., Gao, H., Ma, R., Liu, X., and Dong, Q. (2013). Benzo[α]pyrene repressed DNA mismatch repair in human breast cancer cells. *Toxicology* *304*, 167–172.
- Cheng, Q., and Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle* *9*, 472–478.
- Cheng, T.-J., Huang, Y.-F., and Ma, Y.-C. (2001). Urinary thiodiglycolic acid levels for vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *J. Occup. Environ. Med.* *43*, 934–938.
- Cherrie, J., Gorman, M., and Shafrir, A. (2011). Health, socio-economic and environmental aspects of possible amendments to the EU Directive on the protection of workers from the risks related to exposure to carcinogens at work. *Vinyl Chloride Monomer*.
- Cheung, M.C., Jones, R.L., and Judson, I. (2011). Acute liver toxicity with ifosfamide in the treatment of sarcoma: a case report. *J. Med. Case Reports* *5*.
- Choi, J.-H., Kim, S.-Y., Kim, S.-K., Kemp, M.G., and Sancar, A. (2015a). An Integrated Approach for Analysis of the DNA Damage Response in Mammalian Cells: NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR, DNA DAMAGE CHECKPOINT, AND APOPTOSIS. *J. Biol. Chem.* *290*, 28812–28821.
- Choi, J.M., Oh, S.J., Lee, S.Y., Im, J.H., Oh, J.M., Ryu, C.S., Kwak, H.C., Lee, J.-Y., Kang, K.W., and Kim, S.K. (2015b). HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* *38*, 691–704.
- Christmann, M., Boisseau, C., Kitzinger, R., Berac, C., Allmann, S., Sommer, T., Aasland, D., Kaina, B., and Tomicic, M.T. (2016). Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res.* *44*, 10727–10743.

- Chugh, R., Wagner, T., Griffith, K.A., Taylor, J.M.G., Thomas, D.G., Worden, F.P., Leu, K.M., Zalupski, M.M., and Baker, L.H. (2007). Assessment of ifosfamide pharmacokinetics, toxicity, and relation to CYP3A4 activity as measured by the erythromycin breath test in patients with sarcoma. *Cancer* *109*, 2315–2322.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* *40*, 179–204.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 616–627.
- Ciroussel, F., Barbin, A., Eberle, G., and Bartsch, H. (1990). Investigations on the relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl chloride-exposed rats and cancer susceptibility. *Biochem. Pharmacol.* *39*, 1109–1113.
- Clauson, C., Scharer, O.D., and Niedernhofer, L. (2013). Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012732–a012732.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* *26*, 249.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., and Dobson, V.L. (1993). Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* *14*, 1733–1735.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M., and Stětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* *104*, 465.
- Compe, E., and Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 343–354.
- Conney, A.H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* *42*, 4875–4917.
- Cortez, D. (2001). ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science* *294*, 1713–1716.
- Cosentino, C., Grieco, D., and Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* *30*, 546–555.
- Costa, R. (2003). The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* *85*, 1083–1099.
- Danielsen, P.H., Møller, P., Jensen, K.A., Sharma, A.K., Wallin, H., Bossi, R., Autrup, H., Møhlhave, L., Ravanat, J.-L., Briedé, J.J., et al. (2011). Oxidative Stress, DNA Damage, and Inflammation Induced by Ambient Air and Wood Smoke Particulate Matter in Human A549 and THP-1 Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 168–184.
- De Vos, M., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2012). The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 137–146.
- Delaney, J.C., Smeester, L., Wong, C., Frick, L.E., Taghizadeh, K., Wishnok, J.S., Drennan, C.L., Samson, L.D., and Essigmann, J.M. (2005). AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 855–860.

- Demple, B., and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 915–948.
- Dianov, G.L., and Hübscher, U. (2013). Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Res.* 41, 3483–3490.
- Ding, Y.S., Zhang, L., Jain, R.B., Jain, N., Wang, R.Y., Ashley, D.L., and Watson, C.H. (2008). Levels of Tobacco-Specific Nitrosamines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mainstream Smoke from Different Tobacco Varieties. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 3366–3371.
- Dipple, A. (1994). Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. *IARC Sci. Publ.* 107–129.
- Dogliotti, E. (2006). Molecular mechanisms of carcinogenesis by vinyl chloride. *Ann.-Ist. Super. SANITA* 42, 163.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell* 136, 435–446.
- Dosanjh, M.K., Chenna, A., Kim, E., Fraenkel-Conrat, H., Samson, L., and Singer, B. (1994). All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1024–1028.
- Downs, J.A., and Jackson, S.P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 367–378.
- Dowty, J.G., Win, A.K., Buchanan, D.D., Lindor, N.M., Macrae, F.A., Clendenning, M., Antill, Y.C., Thibodeau, S.N., Casey, G., Gallinger, S., et al. (2013). Cancer Risks for MLH1 and MSH2 Mutation Carriers. *Hum. Mutat.* 34, 490–497.
- Du, L., Wang, H., Xiong, T., Ma, Y., Yang, J., Huang, J., Zeng, D., Wang, X., Huang, H., and Huang, J. (2013). The polymorphisms in the MGMT gene and the risk of cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol.* 34, 3227–3237.
- Dušinská, M., Barančoková, M., Kažimírová, A., Harrington, V., Volkovová, K., Staruchová, M., Horská, A., Wsóllová, L., and Collins, A. (2004). Does occupational exposure to mineral fibres cause DNA or chromosome damage? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 553, 103–110.
- Edwards, R.A., Witherspoon, M., Wang, K., Afrasiabi, K., Pham, T., Birnbaumer, L., and Lipkin, S.M. (2009). Epigenetic Repression of DNA Mismatch Repair by Inflammation and Hypoxia in Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 69, 6423–6429.
- Elizondo, G., Fernandez-Salguero, P., Sheikh, M.S., Kim, G.Y., Fornace, A.J., Lee, K.S., and Gonzalez, F.J. (2000). Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol. Pharmacol.* 57, 1056–1063.
- El-Khamisy, S.F. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 31, 5526–5533.
- Ersson, C., Moller, P., Forchhammer, L., Loft, S., Azqueta, A., Godschalk, R.W.L., van Schooten, F.-J., Jones, G.D.D., Higgins, J.A., Cooke, M.S., et al. (2013). An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis* 28, 279–286.

- ESCODD (2003). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 1089–1099.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tkáč, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., et al. (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* *49*, 872–883.
- Fackenthal, J.D., and Olopade, O.I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 937–948.
- Feng, S., Zhao, Y., Xu, Y., Ning, S., Huo, W., Hou, M., Gao, G., Ji, J., Guo, R., and Xu, D. (2016). Ewing Tumor-associated Antigen 1 Interacts with Replication Protein A to Promote Restart of Stalled Replication Forks. *J. Biol. Chem.* *291*, 21956–21962.
- Feng, Z., Hu, W., Hu, Y., and Tang, M. (2006). Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 15404–15409.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., and Ford, J.M. (2003). In Vivo Recruitment of XPC to UV-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers by the DDB2/Gene Product. *J. Biol. Chem.* *278*, 46906–46910.
- Flohr, C. (2003). Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res.* *31*, 5332–5337.
- Foiles, P.G., Miglietta, L.M., Nishikawa, A., Kuśmierk, J.T., Singer, B., and Chung, F.L. (1993). Development of monoclonal antibodies specific for 1,N2-ethenodeoxyguanosine and N2,3-ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde. *Carcinogenesis* *14*, 113–116.
- Ford, J.M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *577*, 195–202.
- Forlini, C., Bancel, B., Besson, J.-C., and Fontana, L. (2012). Chlorure de vinyle. EMC - Pathol. Prof. Environ. *7*, 1–11.
- Forster, K., Preuss, R., Rossbach, B., Bruning, T., Angerer, J., and Simon, P. (2008). 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occup. Environ. Med.* *65*, 224–229.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J., and Dogliotti, E. (1999). The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 15230–15236.
- Frei, E., Holden, S.A., Gonin, R., Waxman, D.J., and Teicher, B.A. (1993). Antitumor alkylating agents: in vitro cross-resistance and collateral sensitivity studies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *33*, 113–122.
- Frery, N., Zeghnoun, A., Sarter, H., Volatier, J.L., Falq, G., Pascal, M., Grange, D., Schmitt, M., Berat, B., Fabre, P., et al. (2007). Exposure factors influencing serum dioxin concentrations in the French dioxin and incinerators study. *Organohalogen Compd.* *69*, 1017–1020.
- Fréry, N., Coignard, F., and Viso, A.-C. (2009). La biosurveillance en santé environnementale. *Bull Epidemiol Hebd.*

- Gaivão, I., Piasek, A., Brevik, A., Shaposhnikov, S., and Collins, A.R. (2009). Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 45–52.
- Garcia-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., and Meredith, C. (2013). Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol. In Vitro* 27, 1719–1727.
- Gates, K.S. (2009). An Overview of Chemical Processes That Damage Cellular DNA: Spontaneous Hydrolysis, Alkylation, and Reactions with Radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1747–1760.
- Geacintov, N.E. (1984). CONFORMATIONS OF ADDUCTS AND KINETICS OF BINDING TO DNA OF THE OPTICALLY PURE ENANTIOMERS OF ANTI-BENZO (a) PYRENE DIOL EPOXIDE* Nicholas E. Geacintov, Hiroko Yoshida, Victor Ibanez, Stephen A. Jacobs and Ronald G. Harvey. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33–39.
- Geacintov, N.E., and Broyde, S. (2017). Repair-Resistant DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1517–1548.
- Geacintov, N.E., Cosman, M., Hingerty, B.E., Amin, S., Broyde, S., and Patel, D.J. (1997). NMR Solution Structures of Stereoisomeric Covalent Polycyclic Aromatic Carcinogen–DNA Adducts: Principles, Patterns, and Diversity. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 111–146.
- Gelot, C., Magdalou, I., and Lopez, B. (2015). Replication Stress in Mammalian Cells and Its Consequences for Mitosis. *Genes* 6, 267–298.
- Genies, C. (2013). Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges, une classe majeure de polluants atmosphériques. Grenoble.
- Genies, C., Maître, A., Lefèbvre, E., Jullien, A., Chopard-Lallier, M., and Douki, T. (2013). The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs. *PLoS ONE* 8, e78356.
- Genschel, J., and Modrich, P. (2003). Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol. Cell* 12, 1077–1086.
- Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 411–424.
- Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 70–83.
- Guengerich, F.P., and Strickland, T.W. (1977). Metabolism of vinyl chloride: destruction of the heme of highly purified liver Microsomal cytochrome P-450 by a metabolite. *Mol. Pharmacol.* 13, 993–1004.
- Guengerich, F.P., Mason, P.S., Stott, W.T., Fox, T.R., and Watanabe, P.G. (1981). Roles of 2-haloethylene oxides and 2-haloacetaldehydes derived from vinyl bromide and vinyl chloride in irreversible binding to protein and DNA (AACR).
- Guengerich, F.P., Kim, D.H., and Iwasaki, M. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 168–179.

- Guerniou, V., Rapin, D., Millau, J.-F., Bufflier, E., Favier, A., Cadet, J., and Sauvaigo, S. (2005). 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.
- Gunz, D., Hess, M.T., and Naegeli, H. (1996). Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J. Biol. Chem.* 271, 25089–25098.
- Haince, J.-F., Kozlov, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Hendzel, M.J., Lavin, M.F., and Poirier, G.G. (2007). Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Signaling Network Is Modulated by a Novel Poly(ADP-ribose)-dependent Pathway in the Early Response to DNA-damaging Agents. *J. Biol. Chem.* 282, 16441–16453.
- Hall, D.B., Holmlin, R.E., and Barton, J.K. (1996). Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* 382, 731–735.
- Hall, J., Jeggo, P.A., West, C., Gomolka, M., Quintens, R., Badie, C., Laurent, O., Aerts, A., Anastasov, N., Azimzadeh, O., et al. (2017). Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 771, 59–84.
- Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Sundheim, O., Peña-Diaz, J., Andersen, S., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Wilson, D.M., Akbari, M., and Otterlei, M. (2011). XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 52, 623–635.
- Harmsen, S., Meijerman, I., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2009). Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 64, 35–43.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol. Cell* 28, 739–745.
- Harrigan, J.A., McGarrigle, B.P., Sutter, T.R., and Olson, J.R. (2006). Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro* 20, 426–438.
- Hassett, C., Aicher, L., Sidhu, J.S., and Omiecinski, C.J. (1994). Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum. Mol. Genet.* 3, 421–428.
- Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18, 27.
- Hess, M.T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N.E., and Naegeli, H. (1997). Base pair conformation-dependent excision of benzo [a] pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7069–7076.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2006). Time- and concentration-dependent changes in gene expression induced by benzo(a)pyrene in two human cell lines, MCF-7 and HepG2. *BMC Genomics* 7, 260.
- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Brewer, D., te Poele, R., Workman, P., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2007). AHR- and DNA-Damage-Mediated Gene Expression Responses Induced by Benzo(a)pyrene in Human Cell Lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1797–1810.

- Hockley, S.L., Arlt, V.M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I., and Phillips, D.H. (2008). Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. *Carcinogenesis* 29, 202–210.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.
- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.
- Huang, Z., Roy, P., and Waxman, D.J. (2000). Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.* 59, 961–972.
- Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 11–16.
- Huffman, J.L., Sundheim, O., and Tainer, J.A. (2005). DNA base damage recognition and removal: New twists and grooves. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 577, 55–76.
- Hukkanen, J. (2003). Regulation of CYP3A5 by Glucocorticoids and Cigarette Smoke in Human Lung-Derived Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 745–752.
- Hukkanen, J., Lassila, A., Paivarinta, K., Valanne, S., Sarpo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O., and Raunio, H. (2000). Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 360–366.
- Hustedt, N., and Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 19, 1–9.
- IARC (2008). 1,3-Butadiene, ethylene oxide and vinyl halides (vinyl fluoride, vinyl chloride and vinyl bromide) (Lyon: WHO).
- IARC (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures (Lyon, France : Geneva: IARC Press ; Distributed by World Health Organization).
- INSERM (2005). Cancer : Approche méthodologique du lien avec l'environnement.
- InVS (2010). Note de position sur le chlorure de vinyle.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997–1002.
- Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., and Yokoi, T. (2002). Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.* 76, 287–298.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Jacobs, A.L., and Schär, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121, 1–20.

Jan, A., Benford, D., Cockburn, A., Cravedi, J.-P., Dogliotti, E., Di Domenico, A., Fernández-Cruz, M.L., Fink-Gremmels, J., Fürst, P., and Galli, C. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *Eur. Food Saf. Auth. J.*

Jasin, M., and Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012740–a012740.

Jeffrey, A.M., Weinstein, I.B., Jennette, K.W., Grzeskowiak, K., Nakanishi, K., Harvey, R.G., Autrup, H., and Harris, C. (1977). Structures of benzo(a)pyrene–nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants. *Nature* 269, 348–350.

Jeppesen, D.K., Bohr, V.A., and Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 94, 166–200.

Jiang, H., Shen, Y.-M., Quinn, A.M., and Penning, T.M. (2005). Competing Roles of Cytochrome P450 1A1/1B1 and Aldo–Keto Reductase 1A1 in the Metabolic Activation of (±)-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar Cell Extracts. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 365–374.

Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.

Jiricny, J. (2013). Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012633–a012633.

Kamileri, I., Karakasilioti, I., and Garinis, G.A. (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet.* 28, 566–573.

Kielbassa, C., Roza, L., and Epe, B. (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18, 811–816.

Kim, H.S., Kwack, S.J., and Lee, B.M. (2000). Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo [a] pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo [a] pyrene. *Chem. Biol. Interact.* 127, 139–150.

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13300–13305.

Knouzy, B., Dubourg, L., Baverel, G., and Michoudet, C. (2010). Targets of chloroacetaldehyde-induced nephrotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 24, 99–107.

Kochetkov, N.K., Shibaev, V.N., and Kost, A.A. (1971). New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. *Tetrahedron Lett.* 12, 1993–1996.

Korkmaz, A., Topal, T., and Oter, S. (2007). Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.* 23, 303–312.

Kottemann, M.C., and Smogorzewska, A. (2013). Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature* 493, 356–363.

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818.

- Krokan, H.E., and Bjoras, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012583–a012583.
- Kropachev, K., Kolbanovskii, M., Cai, Y., Rodríguez, F., Kolbanovskii, A., Liu, Y., Zhang, L., Amin, S., Patel, D., Broyde, S., et al. (2009). The Sequence Dependence of Human Nucleotide Excision Repair Efficiencies of Benzo[a]pyrene-derived DNA Lesions: Insights into the Structural Factors that Favor Dual Incisions. *J. Mol. Biol.* 386, 1193–1203.
- Kunkel, T.A., and Erie, D.A. (2005). DNA MISMATCH REPAIR. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681–710.
- Kusmierek, J.T., and Singer, B. (1992). 1,N²-Ethenodeoxyguanosine: properties and formation in chloroacetaldehyde-treated polynucleotides and DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 634–638.
- Kusumoto, R., Masutani, C., Sugawara, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T., and Hanaoka, F. (2001). Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro. *Mutat. Res. Repair* 485, 219–227.
- Laib, R.J. (1986). The role of cyclic base adducts in vinyl-chloride-induced carcinogenesis: studies on nucleic acid alkylation in vivo. *IARC Sci. Publ.* 101–108.
- Laplanche, A., Clavel-Chapelon, F., Contassot, J.-C., and Lanouzière, C. (1992). Exposure to vinyl chloride monomer: results of a cohort study after a seven year follow up. The French VCM Group. *Occup. Environ. Med.* 49, 134–137.
- Lee, J.-H., and Paull, T. (2005). ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* 308, 551–554.
- Lee, Y.-C., Cai, Y., Mu, H., Broyde, S., Amin, S., Chen, X., Min, J.-H., and Geacintov, N.E. (2014). The relationships between XPC binding to conformationally diverse DNA adducts and their excision by the human NER system: Is there a correlation? *DNA Repair* 19, 55–63.
- Lehmann, A. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101–1111.
- Lelbach, W.K. (1996). A 25-year follow-up study of heavily exposed vinyl chloride workers in Germany. *Am. J. Ind. Med.* 29, 446–458.
- Leuraud, K., Richardson, D.B., Cardis, E., Daniels, R.D., Gillies, M., O'Hagan, J.A., Hamra, G.B., Haylock, R., Laurier, D., Moissonnier, M., et al. (2015). Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. *Lancet Haematol.* 2, e276–e281.
- Li, L., Jiang, L., Geng, C., Cao, J., and Zhong, L. (2008). The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. *Free Radic. Res.* 42, 354–361.
- Lin, T., and Yang, M.S. (2008). Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PARP-1 activation and NAD⁺ depletion. *Toxicology* 245, 147–153.
- Lin, T., Mak, N.K., and Yang, M.S. (2008). MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology* 247, 145–153.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.

- Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of Endogenous DNA Damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *65*, 127–134.
- Lindsey-Boltz, L.A., Serçin, Ö., Choi, J.-H., and Sancar, A. (2009). Reconstitution of Human Claspin-mediated Phosphorylation of Chk1 by the ATR (Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related) Checkpoint Kinase. *J. Biol. Chem.* *284*, 33107–33114.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.-S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* *14*, 1448–1459.
- Liu, Y., Li, Y., and Lu, X. (2016). Regulators in the DNA damage response. *Arch. Biochem. Biophys.* *594*, 18–25.
- Liu, Z., Ding, S., Kropachev, K., Lei, J., Amin, S., Broyde, S., and Geacintov, N.E. (2015). Resistance to Nucleotide Excision Repair of Bulky Guanine Adducts Opposite Abasic Sites in DNA Duplexes and Relationships between Structure and Function. *PLOS ONE* *10*, e0137124.
- Longley, M.J., Pierce, A.J., and Modrich, P. (1997). DNA polymerase δ is required for human mismatch repair in vitro. *J. Biol. Chem.* *272*, 10917–10921.
- Lovejoy, C.A., and Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair* *8*, 1004–1008.
- Lowenberg, D., Thorn, C.F., Desta, Z., Flockhart, D.A., Altman, R.B., and Klein, T.E. (2014). PharmGKB summary: ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* *24*, 133–138.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1161–1169.
- MacAllister, S.L., Martin-Brisac, N., Lau, V., Yang, K., and O'Brien, P.J. (2013). Acrolein and chloroacetaldehyde: An examination of the cell and cell-free biomarkers of toxicity. *Chem. Biol. Interact.* *202*, 259–266.
- Manno, M., Viau, C., Cocker, J., Colosio, C., Lowry, L., Mutti, A., Nordberg, M., and Wang, S. (2010). Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA)☆. *Toxicol. Lett.* *192*, 3–16.
- Marie, C. (2007). Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Marie, C., Maître, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A., and Ravanat, J. (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J. Appl. Toxicol.* *28*, 579–590.
- Maruyama, M., Matsunaga, T., Harada, E., and Ohmori, S. (2007). Comparison of basal gene expression and induction of CYP3As in HepG2 and human fetal liver cells. *Biol. Pharm. Bull.* *30*, 2091–2097.
- Masuda, Y., Bennett, R.A., and Demple, B. (1998). Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium. *J. Biol. Chem.* *273*, 30360–30365.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* 316, 1160–1166.

Maya, R., Balass, M., Kim, S.-T., Shkedy, D., Leal, J.-F.M., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., 'ev, Shiloh, Y., et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 15, 1067–1077.

McCauley, M.J., Zimmerman, J., Maher, L.J., and Williams, M.C. (2007). HMGB Binding to DNA: Single and Double Box Motifs. *J. Mol. Biol.* 374, 993–1004.

McCoull, K.D., Rindgen, D., Blair, I.A., and Penning, T.M. (1999). Synthesis and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *o*-Quinone Depurinating N7-Guanine Adducts †. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 237–246.

McCullough, A.K., Dodson, M.L., and Lloyd, R.S. (1999). Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem* 68, 255–285.

Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A., and Hanawalt, P.C. (1986). Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8878–8882.

Mi, J., and Kupfer, M. (2005). The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood* 105, 759–766.

Mihaylova, V.T., Bindra, R.S., Yuan, J., Campisi, D., Narayanan, L., Jensen, R., Giordano, F., Johnson, R.S., Rockwell, S., and Glazer, P.M. (2003). Decreased Expression of the DNA Mismatch Repair Gene Mlh1 under Hypoxic Stress in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3265–3273.

Millau, J.-F. (2006). Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support miniaturisé: mise au point et applications. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

Millau, J.-F., Raffin, A.-L., Caillat, S., Claudet, C., Arras, G., Ugolin, N., Douki, T., Ravanat, J.-L., Breton, J., Oddos, T., et al. (2008). A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab. Chip* 8, 1713.

Ministère de l'emploi (2005). Les expositions aux produits cancérigènes - Enquête SUMER. Ministère Empl.

Mishina, Y., Yang, C.-G., and He, C. (2005). Direct repair of the exocyclic DNA adduct 1, N6-ethenoadenine by the DNA repair AlkB proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14594–14595.

Mistretta, V., and Charlier, C. (2013). Biomonitoring of exposure to chemical products in environmental and workplace toxicology. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 257–267.

Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., and Iliakis, G. (2016). DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* 37–38, 51–64.

Mocquet, V., Kropachev, K., Kolbanovskiy, M., Kolbanovskiy, A., Tapias, A., Cai, Y., Broyde, S., Geacintov, N.E., and Egly, J.-M. (2007). The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions. *EMBO J.* 26, 2923–2932.

- Mohammad, M.K., Avila, D., Zhang, J., Barve, S., Arteel, G., McClain, C., and Joshi-Barve, S. (2012). Acrolein cytotoxicity in hepatocytes involves endoplasmic reticulum stress, mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *265*, 73–82.
- Morinello, E.J., Ham, A.-J.L., Ranasinghe, A., Nakamura, J., Upton, P.B., and Swenberg, J.A. (2002). Molecular dosimetry and repair of N(2),3-ethenoguanine in rats exposed to vinyl chloride. *Cancer Res.* *62*, 5189–5195.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H.F., and Fousteri, M.I. (2007). Sealing of Chromosomal DNA Nicks during Nucleotide Excision Repair Requires XRCC1 and DNA Ligase III α in a Cell-Cycle-Specific Manner. *Mol. Cell* *27*, 311–323.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J., and Douki, T. (2006). Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 13765–13770.
- Moustacchi, E. (2000). DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* *464*, 35–40.
- Mundt, K.A., Dell, L.D., Austin, R.P., Luippold, R.S., Noess, R., and Bigelow, C. (2000). Historical cohort study of 10 109 men in the North American vinyl chloride industry, 1942–72: update of cancer mortality to 31 December 1995. *Occup. Environ. Med.* *57*, 774–781.
- Nagel, Z.D., Chaim, I.A., and Samson, L.D. (2014a). Inter-individual variation in DNA repair capacity: A need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. *DNA Repair* *19*, 199–213.
- Nagel, Z.D., Margulies, C.M., Chaim, I.A., McRee, S.K., Mazzucato, P., Ahmad, A., Abo, R.P., Butty, V.L., Forget, A.L., and Samson, L.D. (2014b). Multiplexed DNA repair assays for multiple lesions and multiple doses via transcription inhibition and transcriptional mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E1823–E1832.
- Narciso, L., Fortini, P., Pajalunga, D., Franchitto, A., Liu, P., Degan, P., Frechet, M., Demple, B., Crescenzi, M., and Dogliotti, E. (2007). Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17010–17015.
- Nay, S., and O'Connor, T. (2013). Direct Repair in Mammalian Cells. In *New Research Directions in DNA Repair*, C. Chen, ed. (InTech), p.
- Neal, J.A., and Meek, K. (2011). Choosing the right path: Does DNA-PK help make the decision? *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *711*, 73–86.
- Nissim, I., Horyn, O., Daikhin, Y., Nissim, I., Luhovyy, B., Phillips, P.C., and Yudkoff, M. (2006). Ifosfamide-Induced Nephrotoxicity: Mechanism and Prevention. *Cancer Res.* *66*, 7824–7831.
- Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V., et al. (2015). PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* *347*, 185–188.
- O'Connell, M.J., Walworth, N.C., and Carr, A.M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* *10*, 296–303.

- O'Connor, P.M., Wassermann, K., Sarang, M., Magrath, I., Bohr, V.A., and Kohn, K.W. (1991). Relationship between DNA cross-links, cell cycle, and apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines differing in sensitivity to nitrogen mustard. *Cancer Res.* *51*, 6550–6557.
- Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R.M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., Nakazawa, Y., Niimi, A., Miki, Y., Jaspers, N.G., et al. (2010). Three DNA Polymerases, Recruited by Different Mechanisms, Carry Out NER Repair Synthesis in Human Cells. *Mol. Cell* *37*, 714–727.
- Orsière, T., Iarmarcovai, G., and Botta, A. (2008). Les micronoyaux, un biomarqueur de susceptibilité ? *Arch. Mal. Prof. Environ.* *69*, 475–484.
- Park, K.-T. (2004). The Aryl Hydrocarbon Receptor Predisposes Hepatocytes to Fas-Mediated Apoptosis. *Mol. Pharmacol.* *67*, 612–622.
- Park, I.S., Lee, H.J., Lee, Y.S., Hwang, J.S., and Lee, M.S. (2005). Ifosfamide-induced encephalopathy with or without using methylene blue. *Int. J. Gynecol. Cancer* *15*, 807–810.
- Park, J.-H., Troxel, A.B., Harvey, R.G., and Penning, T.M. (2006a). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* *19*, 719–728.
- Park, J.-H., Mangal, D., Tacka, K.A., Quinn, A.M., Harvey, R.G., Blair, I.A., and Penning, T.M. (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 6846–6851.
- Park, S.-Y., Lee, S.-M., Ye, S.-K., Yoon, S.-H., Chung, M.-H., and Choi, J. (2006b). Benzo[a]pyrene-induced DNA damage and p53 modulation in human hepatoma HepG2 cells for the identification of potential biomarkers for PAH monitoring and risk assessment. *Toxicol. Lett.* *167*, 27–33.
- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., Arakawa, H., and Iliakis, G. (2013). DNA Ligases I and III Cooperate in Alternative Non-Homologous End-Joining in Vertebrates. *PLoS ONE* *8*, e59505.
- Paull, T.T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 711–738.
- Paustenbach, D., and Galbraith, D. (2006). Biomonitoring and Biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. *Environ. Health Perspect.* *114*, 1143–1149.
- Perera, F.P., and Weinstein, I.B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* *21*, 517–524.
- Pernot, E., Hall, J., Baatout, S., Benotmane, M.A., Blanchardon, E., Bouffler, S., El Saghire, H., Gomolka, M., Guertler, A., Harms-Ringdahl, M., et al. (2012). Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat. Res. Mutat. Res.* *751*, 258–286.
- Petermann, E. (2003). ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair* *2*, 1101–1114.
- Phillips, D.H., Hewer, A., Martin, C.N., Garner, R.C., and King, M.M. (1988). Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature* *336*, 790–792.
- Pil, P.M., and Lippard, S.J. (1992). Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* *256*, 234–237.

- Poehlmann, A., and Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol. - Res. Pract.* 206, 591–601.
- Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* 25, 409–433.
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V.D., and Casini, A.F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499–1503.
- Pons, B., Belmont, A.-S., Masson-Genteuil, G., Chapuis, V., Oddos, T., and Sauvaigo, S. (2010). Age-associated modifications of Base Excision Repair activities in human skin fibroblast extracts. *Mech. Ageing Dev.* 131, 661–665.
- Puga, A., Ma, C., and Marlowe, J.L. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* 77, 713–722.
- Qiao, Y., Spitz, M.R., Guo, Z., Hadeyati, M., Grossman, L., Kraemer, K.H., and Wei, Q. (2002). 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. Mol. Mech. Mutagen.* 509, 165–174.
- Quinn, A.M., and Penning, T.M. (2008). Comparisons of (±)-Benzo[a]pyrene-trans -7,8-Dihydrodiol Activation by Human Cytochrome P450 and Aldo-Keto Reductase Enzymes: Effect of Redox State and Expression Levels. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 1086–1094.
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D.B., Guillén, M.D., Schneider, K., and Weyand, E.H. (2004). Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Int. J. Toxicol.* 23, 301–333.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* 16, 1–10.
- Ravanat, J.-L., Cadet, J., and Douki, T. (2012). Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr. Mol. Med.* 12, 655–671.
- Reeves, D.A., Mu, H., Kropachev, K., Cai, Y., Ding, S., Kolbanovskiy, A., Kolbanovskiy, M., Chen, Y., Krzeminski, J., Amin, S., et al. (2011). Resistance of bulky DNA lesions to nucleotide excision repair can result from extensive aromatic lesion–base stacking interactions. *Nucleic Acids Res.* 39, 8752–8764.
- Rehwagen, M., Müller, A., Massolo, L., Herbarth, O., and Ronco, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Sci. Total Environ.* 348, 199–210.
- Remontet, L., Buemi, A., Velten, M., Jouglu, E., and Estève, J. (2003). Évolution de l'incidence et de la mortalité par.
- Richardson, D.B., Cardis, E., Daniels, R.D., Gillies, M., O'Hagan, J.A., Hamra, G.B., Haylock, R., Laurier, D., Leuraud, K., Moissonnier, M., et al. (2015). Risk of cancer from occupational exposure to ionising radiation: retrospective cohort study of workers in France, the United Kingdom, and the United States (INWORKS). *BMJ* h5359.

- Ridley, A.J., Whiteside, J.R., McMillan, T.J., and Allinson, S.L. (2009). Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* *85*, 177–195.
- Rooij, J.G.M. van (1994). Dermal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among workers.
- Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., and Iliakis, G. (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* *36*, 1610–1623.
- Rotman, G., and Shiloh, Y. (1997). Hypothesis: Ataxia-telangiectasia: Is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *BioEssays* *19*, 911–917.
- Ruan, Q., Kim, H.-Y.H., Jiang, H., Penning, T.M., Harvey, R.G., and Blair, I.A. (2006). Quantification of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA-adducts by stable isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *20*, 1369–1380.
- Sage, E. (1993). Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem. Photobiol.* *57*, 163–174.
- Sandret, and Guignon (2005). Sumer 2003 : les expositions aux produits cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques.
- Sauvaigo, S., Guerniou, V., Rapin, D., Gasparutto, D., Caillat, S., and Favier, A. (2004). An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Anal. Biochem.* *333*, 182–192.
- Sayed-Ahmed, M.M., Hafez, M.M., Aldelemy, M.L., Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Hosaini, K.A., Al-Harbi, N.O., Al-Harbi, M.M., and Al-Shabanah, O.A. (2012). Downregulation of Oxidative and Nitrosative Apoptotic Signaling by L-Carnitine in Ifosfamide-Induced Fanconi Syndrome Rat Model. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2012*, 1–9.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 517–528.
- Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H.W., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H.J., Demmers, J.A.A., Fouteri, M., Vermeulen, W., et al. (2012). UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair. *Nat. Genet.* *44*, 598–602.
- Shackelford, R.E., Innes, C.L., Sieber, S.O., Heinloth, A.N., Leadon, S.A., and Paules, R.S. (2001). The Ataxia telangiectasia Gene Product Is Required for Oxidative Stress-induced G sub1 sub and G sub2 sub Checkpoint Function in Human Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *276*, 21951–21959.
- Shafirovich, V., Kropachev, K., Anderson, T., Liu, Z., Kolbanovskiy, M., Martin, B.D., Sugden, K., Shim, Y., Chen, X., Min, J.-H., et al. (2016). Base and Nucleotide Excision Repair of Oxidatively Generated Guanine Lesions in DNA. *J. Biol. Chem.* *291*, 5309–5319.
- Shieh, S.-Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* *14*, 289–300.
- Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 197–210.

- Shinozaki, T., Nota, A., Taya, Y., and Okamoto, K. (2003). Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene* 22, 8870–8880.
- Simpson, C.D., Wu, M.-T., Christiani, D.C., Santella, R.M., Carmella, S.G., and Hecht, S.S. (2000). Determination of 7,8,9,10-Tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene in Human Urine by Gas Chromatography/Negative Ion Chemical Ionization/Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 271–280.
- Slyskova, J., Dusinska, M., Kuricova, M., Soucek, P., Vodickova, L., Susova, S., Naccarati, A., Tulupova, E., and Vodicka, P. (2007). Relationship between the capacity to repair 8-oxoguanine, biomarkers of genotoxicity and individual susceptibility in styrene-exposed workers. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 634, 101–111.
- Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and A. Gillespie, D. (2010). The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 73–112.
- Sobeck, A., Stone, S., Landais, I., de Graaf, B., and Hoatlin, M.E. (2009). The Fanconi Anemia Protein FANCM Is Controlled by FANCD2 and the ATR/ATM Pathways. *J. Biol. Chem.* 284, 25560–25568.
- Sood, C., and O’Brien, P.J. (1993). Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 46, 1621–1626.
- Souza, T., Jennen, D., van Delft, J., van Herwijnen, M., Kyratopoulos, S., and Kleinjans, J. (2016). New insights into BaP-induced toxicity: role of major metabolites in transcriptomics and contribution to hepatocarcinogenesis. *Arch. Toxicol.* 90, 1449–1458.
- Speidel, D. (2010). Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol.* 20, 14–24.
- Spivak, G. (2015). Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 36, 13–18.
- Srivastava, S.K., Watkins, S.C., Schuetz, E., and Singh, S.V. (2002). Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol. Carcinog.* 33, 156–162.
- Stadler, R.H., Staempfli, A.A., Fay, L.B., Turesky, R.J., and Welti, D.H. (1994). Synthesis of multiply-labeled [15N3, 13C1]-8-oxo-substituted purine bases and their corresponding 2'-deoxynucleosides. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 784–791.
- Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M.R., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961–966.
- Stracker, T.H., Usui, T., and Petrini, J.H.J. (2009). Taking the time to make important decisions: The checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair* 8, 1047–1054.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., and Coglianò, V. (2005). Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol.* 6, 931–932.
- Sugasawa, K. (2011). Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. *Biochem. Mosc.* 76, 16–23.

- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., and Price, B.D. (2005). A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13182–13187.
- Surova, O., and Zhivotovsky, B. (2013). Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* *32*, 3789–3797.
- Svilar, D., Goellner, E.M., Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 2491–2507.
- Szymkowski, D.E., Lawrence, C.W., and Wood, R.D. (1993). Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 9823–9827.
- Takabe, W., Niki, E., Uchida, K., Yamada, S., Satoh, K., and Noguchi, N. (2001). Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis* *22*, 935–941.
- Tarantini, A., Maître, A., Lefèbvre, E., Marques, M., Rajhi, A., and Douki, T. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* *279*, 36–44.
- Taylor, J.-S., Lu, H.-F., and Kotyk, J.J. (1990). Quantitative conversion of the (6–4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem. Photobiol.* *51*, 161–167.
- Toniolo, P., Boffetta, P., Shuker, D., Rothman, N., Hulka, B., and Pearce, N. (1997). Application of Biomarkers in Cancer Epidemiology - Workshop Report (Lyon (France)).
- Tornaletti, S., and Hanawalt, P.C. (1999). Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* *81*, 139–146.
- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., and Wagner, J.R. (1999). 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.* *274*, 20833–20838.
- Tyson, J., Caple, F., Spiers, A., Burtle, B., Daly, A.K., Williams, E.A., Hesketh, J.E., and Mathers, J.C. (2009). Inter-individual variation in nucleotide excision repair in young adults: effects of age, adiposity, micronutrient supplementation and genotype. *Br. J. Nutr.* *101*, 1316.
- Uhl, M., Helma, C., and Knasmüller, S. (2000). Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat. Res.* *468*, 213–225.
- Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.-C., Le Bon, A.-M., and Chagnon, M.-C. (2003). Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat. Res.* *536*, 79–90.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., et al. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* *33*, 378–455.
- Verrier, A., Bretin, P., and Fréry, N. (2009). Santé environnementale : surveiller pour connaître et prévoir. *Bull Epidemiol Hebd.*
- Wagner, J.R., and Cadet, J. (2010). Oxidation Reactions of Cytosine DNA Components by Hydroxyl Radical and One-Electron Oxidants in Aerated Aqueous Solutions. *Acc. Chem. Res.* *43*, 564–571.

- Wang, H. (2005). DNA Ligase III as a Candidate Component of Backup Pathways of Nonhomologous End Joining. *Cancer Res.* *65*, 4020–4030.
- Wang, W. (2008). A major switch for the Fanconi anemia DNA damage–response pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1128–1130.
- Wang, D., Li, L., Fuhrman, J., Ferguson, S., and Wang, H. (2011). The Role of Constitutive Androstane Receptor in Oxazaphosphorine-Mediated Induction of Drug-Metabolizing Enzymes in Human Hepatocytes. *Pharm. Res.* *28*, 2034–2044.
- Wang, H.-T., Hu, Y., Tong, D., Huang, J., Gu, L., Wu, X.-R., Chung, F.-L., Li, G.-M., and Tang, M. (2012). Effect of Carcinogenic Acrolein on DNA Repair and Mutagenic Susceptibility. *J. Biol. Chem.* *287*, 12379–12386.
- Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* *34*, 6170–6182.
- Ward, E., Boffetta, P., Andersen, A., Colin, D., Comba, P., Deddens, J.A., De Santis, M., Engholm, G., Hagmar, L., Langard, S., et al. (2001). Update of the follow-up of mortality and cancer incidence among European workers employed in the vinyl chloride industry. *Epidemiol. Camb. Mass* *12*, 710–718.
- Wilkening, S., Stahl, F., and Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab. Dispos.* *31*, 1035–1042.
- Wilson, D.M., Kim, D., Berquist, B.R., and Sigurdson, A.J. (2011). Variation in base excision repair capacity. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *711*, 100–112.
- Winczura, A., Zdzalik, D., and Tudek, B. (2012). Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic. Res.* *46*, 442–459.
- Wong, R.-H., Wang, J.-D., Hsieh, L.-L., and Cheng, T.-J. (2003). XRCC1, CYP2E1 and ALDH2 genetic polymorphisms and sister chromatid exchange frequency alterations amongst vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *Arch. Toxicol.* *77*, 433–440.
- Wood, R.D. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* *81*, 39–44.
- Wood, R.D., and Doublié, S. (2016). DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair* *44*, 22–32.
- Wood, R.D., Robins, P., and Lindahl, T. (1988). Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts. *Cell* *53*, 97–106.
- Xue, W., and Warshawsky, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *206*, 73–93.
- Yi, C., and He, C. (2013). DNA Repair by Reversal of DNA Damage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012575–a012575.
- Zanger, U.M., and Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* *138*, 103–141.

Zhang, J., Tian, Q., Yung Chan, S., Chuen Li, S., Zhou, S., Duan, W., and Zhu, Y.-Z. (2005). Metabolism and Transport of Oxazaphosphorines and the Clinical Implications. *Drug Metab. Rev.* 37, 611–703.

Zhang, J., Tian, Q., and Zhou, S.-F. (2006). Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Curr. Drug Ther.* 1, 55–84.

Zhang, L., Jin, Y., Huang, M., and Penning, T.M. (2012). The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Front. Pharmacol.* 3.

Zhou, B.-B.S., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.

Zielinski, B., and Hergenahm, M. (2001). 2-Chloroacetaldehyde induces ϵ DA DNA adducts in DNA of Raji cells as demonstrated by an improved HPLC–fluorimetry method. *Fresenius J. Anal. Chem.* 370, 97–100.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* 300, 1542–1548.

Zou, Y., Shell, S.M., Utzat, C.D., Luo, C., Yang, Z., Geacintov, N.E., and Basu, A.K. (2003). Effects of DNA adduct structure and sequence context on strand opening of repair intermediates and incision by UvrABC nuclease. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 12654–12661.

Résumé

Les êtres humains sont constamment confrontés à des agents génotoxiques issus de l'environnement ou liés aux activités humaines. Ces agents induisent différents types de lésions sur l'ADN et peuvent conduire à un risque accru de développer des cancers. Pour préserver son intégrité génétique, la cellule possède divers mécanismes de réparation permettant leur élimination. L'impact de ces agents exogènes sur l'organisme a conduit à l'émergence d'un nouveau domaine, la biosurveillance. Elle vise à évaluer l'exposition des individus par l'identification d'indicateurs biologiques de l'exposition. Cependant, à ce jour, une des limites principales dans ce domaine est le manque de méthodes et de biomarqueurs disponibles. Afin de définir de nouveaux biomarqueurs, les conséquences de l'exposition de deux agents cancérigènes reconnus, le benzo[a]pyrène et le chlorure de vinyle, ainsi que leurs métabolites toxiques ont été évaluées dans deux modèles cellulaires. Pour cela, deux méthodes ont été utilisées : la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse pour la quantification des lésions formées ainsi qu'un test de mesure des activités enzymatiques de réparation développé par la société LXRepair. Cette approche permet d'appréhender de manière globale l'exposition à ces composés en étudiant différents paramètres comme le seuil de déclenchement, la variabilité ainsi que la spécificité de la réponse cellulaire. L'étude a montré la difficulté de mettre en évidence une réponse spécifique à un agent donné. Cependant, les profils de réparation obtenus ont souligné la complexité des régulations mises en jeu et permettent de soulever de nouvelles pistes de recherches.

Mots-clés : biopuce, réparation de l'ADN, génotoxicité, biomarqueur, surveillance biologique, lésions de l'ADN

Abstract

Humans are constantly exposed to environmental genotoxic agents. These agents can cause different types of DNA damage, which have been associated with an increased risk of developing cancer. In order to maintain genomic integrity, cells have multiple DNA repair mechanisms that can remove these lesions. The investigation of the impact of these exogenous genotoxic agents on individuals has led to the emergence of a new field, biomonitoring. This field allows researchers to evaluate individual exposure to genotoxic agents based on the detection of biological markers of exposure. However, up to now, the major limitations in this area are the lack of relevant biomarkers, as well as the availability of methods to detect them. In order to identify new biomarkers for the well-established carcinogenic compounds, benzo[a]pyrene and vinyl chloride, two cell lines were exposed to these agents or their toxic metabolites in order to determine the genotoxic consequences. Two methods were used: DNA lesions were quantified by HPLC-MS/MS and DNA repair activities were evaluated using a microarray assay developed by the start-up company, LXRepair. This approach allowed us to gain a global understanding of how the cells responded to this exposure by considering different parameters including the minimum concentration needed to observe a toxic effect, the inter-cell line variability in this response and the profile of DNA repair capacity. Whilst this study underlines the complexity of these responses to a given genotoxic agent, the DNA repair signatures identified may open up research avenues to identify new biomonitoring endpoints.

Key words: microarray, DNA repair, genotoxicity, biomarker, biomonitoring, DNA damage