



HAL
open science

Ligands macrocycliques de sites abasiques en tant qu'inhibiteurs de la réparation de l'ADN : Synthèse, études biochimiques et biologiques

Coralie Caron

► **To cite this version:**

Coralie Caron. Ligands macrocycliques de sites abasiques en tant qu'inhibiteurs de la réparation de l'ADN : Synthèse, études biochimiques et biologiques. Chimie organique. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS237 . tel-03360700

HAL Id: tel-03360700

<https://theses.hal.science/tel-03360700>

Submitted on 1 Oct 2021

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.

Ligands macrocycliques de sites abasiques en tant qu'inhibiteurs de la réparation de l'ADN : Synthèse, études biochimiques et biologiques.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud

École doctorale n°571 Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 18 octobre 2019, par

Coralie Caron

Composition du Jury :

Dominique Guianvarc'h Professeure, Université Paris-Sud (UMR 8182)	Présidente
Didier Gasparutto Directeur de recherche, CEA (UMR 5819)	Rapporteur
Jean-François Riou Professeur, MNHN (UMR 7196–U 1154)	Rapporteur
Laurent Micouin Directeur de recherche, CNRS, Université Paris Descartes (UMR 8601)	Examinateur
Anton Granzhan Chargé de recherche, CNRS, Institut Curie (UMR 9187–U 1196)	Directeur de thèse
Sophie Bombard Directrice de recherche, CNRS, Institut Curie (UMR 9187–U 1196)	Directrice de thèse

Remerciements

Je veux tout d'abord remercier Marie-Paule Teulade-Fichou de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son unité et ainsi de m'avoir fait accéder à un environnement propice à l'interdisciplinarité m'ayant donné l'opportunité d'allier la synthèse chimique, les études biophysiques et les études biologiques.

Je tiens également à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, Anton Granzhan et Sophie Bombard, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de recherche à l'interface entre la chimie et la biologie correspondant ainsi parfaitement à mes centres d'intérêts. Un grand merci à vous deux pour m'avoir offert l'opportunité de me former à de nouvelles techniques de biologie et de biophysique ainsi que pour vos retours toujours positifs et encourageants sur mon travail.

J'adresse mes remerciements à Didier Gasparutto pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et d'évaluer mon travail en tant que rapporteur. J'associe à ces remerciements Jean-François Riou à ce même titre et je tiens aussi à remercier Laurent Micouin et Dominique Guianvarc'h pour le temps qu'ils consacreront pour examiner le résultat de ces trois années de recherches.

Je souhaite également remercier le Dr. Lukáš Trantírek de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au CEITEC à Brno en République Tchèque me donnant ainsi l'opportunité d'apprendre de nouvelles méthodes. Un grand merci également à Šimon Džatko d'avoir rendu ce séjour très agréable en me faisant découvrir la ville et la gastronomie locale.

Je veux aussi remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'apporter des éléments nouveaux pour mener à bien ce projet. Merci aux Dr. Marcel Hollenstein et Dr. Ivo Sarac pour leurs aides précieuses dans la détermination de la structure de l'adduit ADN – ligand, à Régis Guillot pour les structures cristallographiques, à Jean-Luc Guerquin-Kern et Ting-Di Wu pour la détermination de la localisation des macrocycles *in cellulose* par nanoSIMS, à Carlos Kikuti pour m'avoir permis d'accéder à la technologie MST au sein de son laboratoire ainsi qu'à Christophe Roulin pour la réalisation des tests des comètes.

Je souhaite également remercier Laëtitia Besse, Claire Lovo et Marie-Noëlle Soler pour m'avoir formé à la microscopie mais aussi pour le temps très précieux que j'ai gagné grâce à la macro développée sur-mesure pour le traitement de mes images.

Je remercie Séverine Soille, Flore Migeon, Isciane Commenge et Marie Tagliavini pour avoir contribué dans la cadre de leur stage à l'obtention de nouveaux résultats. Merci pour le temps que j'ai économisé grâce à votre aide.

Je tiens aussi à remercier fortement l'équipe « MISS » et plus particulièrement Valérie, Elisabeth et Sylvie. Un grand merci à vous pour m'avoir permis ces petites escapades hors de la thèse de médiations scientifiques aux contacts des enfants, ce fût une expérience très enrichissante. Et surtout un immense merci pour votre aide précieuse pour résoudre les problèmes administratifs

Remerciements

avec l'université ! Merci aussi aux doctorants et notamment à Sébastien, Aline, Anne-Sophie, Vincent, Ludmilla et Sylvain avec qui j'ai partagé avec grand plaisir l'animation de ces ateliers.

Enfin, je souhaite remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont permis de passer ces trois années de thèse dans une ambiance des plus agréables. Un grand merci à Nathalie, Claire, Delphine, Pauline, Romain, Florence, Corinne, Daniela, Sandrine, Florent, Frédérique ; merci à tous pour votre bonne humeur et pour votre aide.

Je souhaite aussi remercier la team « jeune ». Merci à ceux qui sont déjà partis mais avec qui j'ai partagé de bons moments : Joël, Abhijit, Sounderya et surtout un grand merci à Laura pour toutes ces sessions papotages, ta bonne humeur, tes imitations à la salsa et mes premiers cours de ski ! Mais aussi un grand merci à l'équipe de choc actuelle : Julie, Marie, Thibaut, Oksana, Jaime, Deep, Linda à qui je souhaite tout le meilleur pour la suite de leur thèse, Michela, Céline et mention spéciale pour Anne, ma « work wife », merci pour ces sessions « pause-thé », chants en biophysique (oups !) et mes pKa (finalement pas obtenus !). Merci à vous tous pour ces bons moments papotages, laser game, bowling, etc... sans lesquels la thèse aurait été bien moins agréable !

Et pour finir, je remercie très fortement ma famille et plus particulièrement mes parents et ma sœur, qui ont toujours cru en moi et sans qui je ne serais pas arrivée jusque-là. Merci infiniment pour votre soutien indéfectible !

A tous, un très grand MERCI !

Sommaire

Liste des abréviations	7
Préambule	9
Introduction	11
I- Le système de réparation par excision de base et son rôle dans la lutte contre le cancer	13
1- L'acide désoxyribonucléique, support de l'information génétique	13
2- Des mécanismes indispensables au maintien de l'intégrité génomique	14
3- Le système de réparation par excision de base (<i>Base excision repair</i> - BER)	17
4- Les agents alkylants de l'ADN dans le cadre de la lutte contre le cancer	19
a- Les différentes familles d'agents alkylants et leur mode d'action	19
b- La résistance des cellules cancéreuses aux agents alkylants	28
5- Le rôle de la voie de réparation BER et de l'enzyme APE1 dans le développement de la chimiorésistance	29
6- Les inhibiteurs directs de l'enzyme APE1	34
a- Inhibiteurs identifiés suite à un criblage basé sur le suivi du clivage du site AP par APE1 par fluorescence (HTS).....	34
b- Inhibiteurs identifiés par criblage virtuel	37
c- Inhibiteurs dérivés de la lucanthone et AR03	40
II- Inhibition de la voie de réparation BER en ciblant l'ADN.....	43
1- Interaction des ligands avec l'ADN	43
2- Présentation des sites abasiques et de leurs propriétés	45
3- Stratégie de l'inhibition indirecte d'APE1	51
4- Développement de ligands ciblant les sites abasiques	52
III- Projet de thèse	56
1- Etudes préliminaires.....	56
2- Objectifs du travail de doctorat.....	59
Chapitre I : Synthèse d'une nouvelle génération de ligands de type naphthalénophane	61
I- Synthèse des ligands macrocycliques.....	64
1- Synthèse de deux intermédiaires réactionnels.....	64

2-	Synthèse des cyclophanes	66
a-	Synthèse de la première famille de macrocycles.....	66
b-	Synthèse de la deuxième famille de macrocycles.....	69
c-	Synthèse d'un macrocycle marqué à l'azote 15	72
d-	Etudes cristallographiques de deux macrocycles	73
II-	Synthèse du complexe de rhodium $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$	76

Chapitre II : Etudes *in vitro* de l'interaction des macrocycles avec les sites abasiques.....79

I-	Séquences d'acides nucléiques et composés utilisés au cours des différentes études <i>in vitro</i>	81
II-	Evaluation <i>in vitro</i> de l'affinité et de la sélectivité des macrocycles pour les lésions de l'ADN	84
1-	Principe de la technique du FRET-melting	84
2-	Détermination des conditions expérimentales.....	86
3-	Résultats.....	89
a-	Etudes de l'affinité et de la sélectivité des ligands macrocycliques.....	89
b-	Comparaison de l'affinité des macrocycles avec quelques ligands de la littérature	93
III-	Evaluation <i>in vitro</i> de l'inhibition du clivage enzymatique des sites abasiques par APE1	95
1-	Principe de la méthode et évaluation des conditions expérimentales	95
2-	Résultats.....	99
IV-	Evaluation <i>in vitro</i> du clivage des sites abasiques par les macrocycles	103
1-	Principe de l'étude	103
2-	Résultats.....	105
3-	Etude de l'influence du pH du tampon réactionnel sur la vitesse de clivage des sites AP	111
V-	Etude de la formation <i>in vitro</i> d'un adduit entre le site abasique et le ligand 2,7-BisNP-NH..	114
VI-	Evaluation <i>in vitro</i> d'inhibiteurs connus d'APE1	119
1-	Etude de l'interaction avec l'enzyme APE1	119
a-	Principe de la méthode <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> et conditions de l'étude	119
b-	Résultats	120
2-	Etudes de l'interaction avec l'ADN	122
3-	Comparaison de l'activité inhibitrice de composés connus avec celle des macrocycles et effet de la présence d'ADN compétiteur	124
VII-	Conclusion	128

Chapitre III : Etudes des macrocycles <i>in cellulo</i>	131
I- Etude de la cytotoxicité des macrocycles	133
1- Méthodes	133
a- Evaluation de la cytotoxicité et de l'effet de la combinaison des composés	133
b- Présentation des lignées cellulaires.....	135
2- Evaluation de la cytotoxicité des macrocycles sur la lignée de glioblastome T98G	136
a- Etude de la cytotoxicité des macrocycles seuls	136
b- Etudes de la cytotoxicité des macrocycles en combinaison avec les agents alkylants.....	139
c- Etudes de la cytotoxicité des ligands en combinaison avec les radiations ionisantes	150
3- Evaluation de la cytotoxicité des ligands sur les lignées cellulaires U87MG et HCT116	153
a- Etudes cellulaires sur la lignée U87MG	153
b- Etudes cellulaires sur la lignée HCT116	154
II- Visualisation de la pénétration des ligands au sein des cellules à l'aide de la technique de la nanoSIMS	157
III- Evaluation de la stabilité de complexes ligand - site AP par RMN <i>in cellulo</i>	160
IV- Etudes mécanistiques des dommages à l'ADN induits par les ligands <i>in cellulo</i>	166
1- Quantification des sites abasiques <i>in cellulo</i>	166
2- Evaluation des coupures double-brins au sein de l'ADN par étude de la localisation des protéines γ -H2AX	168
3- Evaluation des dommages à l'ADN par le test des comètes	175
V- Conclusion.....	179
 Conclusion générale et Perspectives	 183
 Partie expérimentale	 193
 Bibliographie	 217

Liste des abréviations

A : adénine

AcOH : acide acétique

ADN : acide désoxyribonucléique

AP : apurinique/aprimidinique

APE1 : endonucléase apurinique/aprimidinique 1 (EC 4.2.99.18)

ARP : *Aldehyde Reactive Probe*

ATA : acide aurintricarboxylique

ATP : adénosine triphosphate

BCNU : bis(2-chloroéthyl)nitrosourée (carmustine)

BER : *base excision repair*, voie de réparation de l'ADN par excision de base

C : cytosine

C.I. : indice combinatoire

ct DNA : *calf thymus DNA*, ADN génomique de veau

DCM : dichlorométhane

DFT : *density-functional theory*, théorie de la fonctionnelle de la densité

DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DSF : *Differential Scanning Fluorimetry*

DTT : dithiothréitol

dU : 2'-désoxyuridine

FRET : *Förster resonance energy transfer*, transfert d'énergie par résonance d'effet Förster

G : guanine

^{me}G : O⁶-méthyl-désoxyguanosine

GI₅₀ : *growth inhibition*, concentration en composé inhibant 50% de la prolifération des cellules

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HR : *homologous recombination*, voie de réparation par recombinaison homologue

HTS : *fluorescence-based high-throughput screen*

IC₅₀ : *inhibitory concentration*, concentration en composé inhibant 50% de l'activité enzymatique évaluée *in vitro*

KWKK : tétrapeptide Lys-Trp-Lys-Lys

LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

MeCN : acétonitrile

MGMT : O⁶-méthylguanine ADN-méthyltransférase (EC 2.1.1.63)

MMR : *mismatch repair*, voie de réparation des mésappariements de l'ADN

MMS : méthanesulfonate de méthyle

MX : méthoxyamine

NanoSIMS : *nano-scale secondary ion mass spectrometry*

NBS : *N*-bromosuccinimide

NER : *nucleotide excision repair*, voie de réparation par excision de nucléotide

NHEJ : *non-homologous end joining*, voie de réparation par jonction d'extrémités non homologues

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PARP : poly(ADP-ribose) polymérase (EC 2.4.2.30)

pb : paire de bases, unité de longueur d'un brin d'acides nucléiques

PBS : *phosphate buffered saline*, tampon phosphate salin

QF : *quenching factor*, facteur d'extinction de fluorescence

RMN : spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

T : thymine

TBS : *tert*-butyldiméthylsilyle

THF : tétrahydrofurane

TMZ : témozolomide

TRIS : tris(hydroxyméthyl)aminométhane

UDG : Uracil-ADN Glycosylase (EC 3.2.2.27)

UV : ultra-violet

Préambule

L'ADN génomique, support de l'information génétique, subit constamment des dommages d'origine naturelle ou induits par l'environnement. Ces lésions conduisent, pour la plupart, à la perte de l'information génétique et peuvent aboutir à la mort cellulaire.

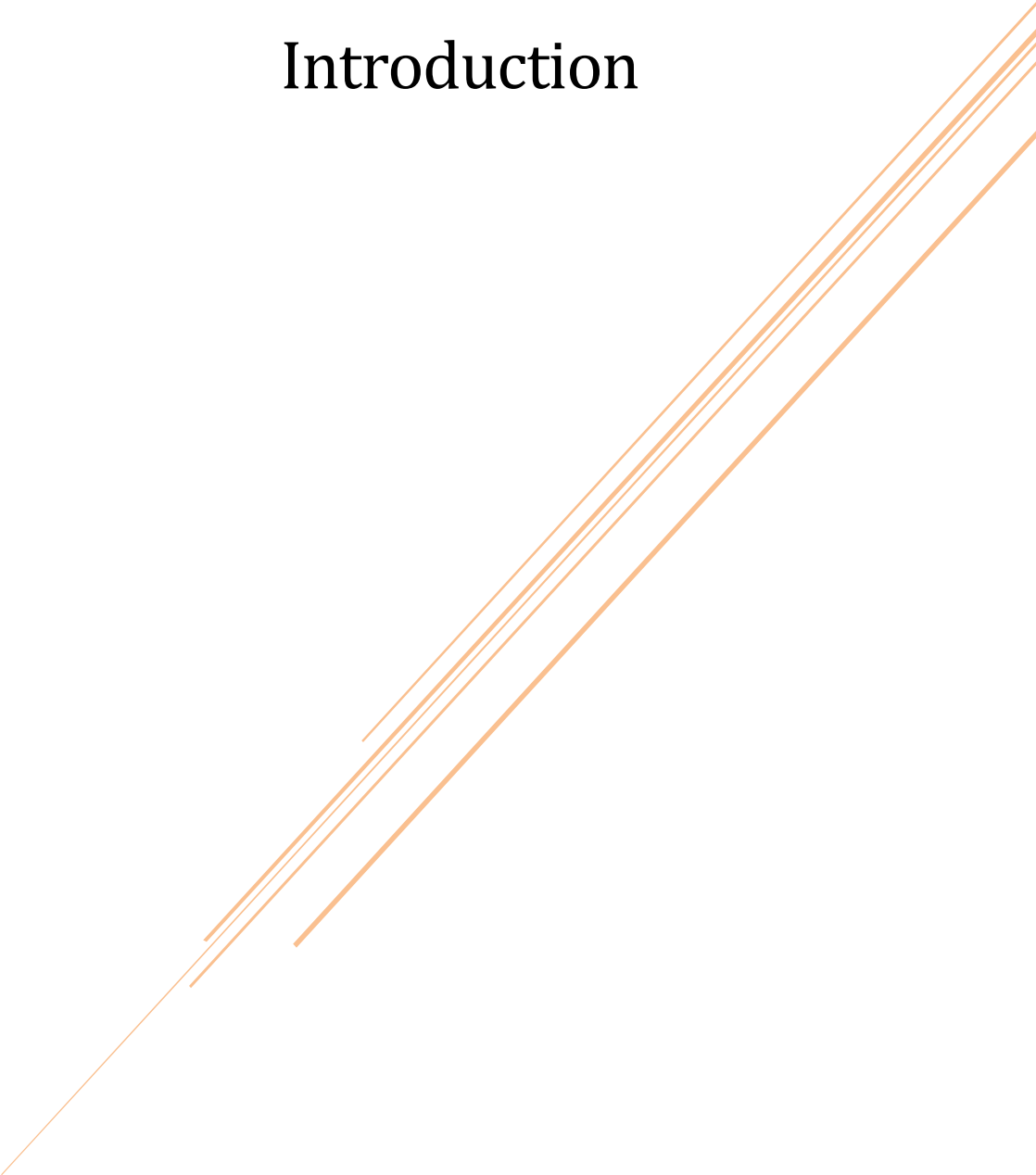
Afin de maintenir l'intégrité du génome, les cellules ont développé de multiples voies de réparation spécifiques aux types de lésions présentes sur l'ADN. Parmi les principales voies de réparation il existe : la réparation par excision de base (*base excision repair* – BER), la réparation par excision de nucléotides (*nucleotide excision repair* – NER), la réparation des mésappariements (*mismatch repair* – MMR), la réparation par jonction d'extrémités non homologues (*non-homologous end joining* – NHEJ) ou encore la réparation par recombinaison homologue (*homologous recombination* – HR).

Parmi les différentes lésions de l'ADN duplexe, la formation de sites abasiques est la plus fréquente. Les sites abasiques, nommés également sites apuriques / apyrimidiniques (sites AP) sont la conséquence de la perte, au niveau d'un nucléotide, d'une base purine (adénine ou guanine) ou beaucoup plus rarement d'une base pyrimidine (thymine ou cytosine), ne laissant alors que le désoxyribose sur le brin d'ADN. Il a été démontré qu'environ 10 000 bases purines sont perdues par jour et par cellule humaine,¹ conduisant ainsi à la formation d'environ 800 sites abasiques par heure au sein d'une cellule humaine (6×10^9 paires de bases).² Le taux de dépyrimidation est lui environ cent fois plus lent. Cependant, la réparation de ce type de lésion, observée *in vitro*³ et *in vivo*,⁴ est un processus rapide et efficace.

Les sites abasiques peuvent être formés spontanément par une hydrolyse de la liaison *N*-glycosidique mais aussi par le retrait d'une base inappropriée ou endommagée par une glycosylase spécifique. Ces bases endommagées peuvent être formées de plusieurs façons : par oxydation, notamment par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), déamination ou alkylation des bases de l'ADN suite à l'action par exemple d'agents anticancéreux. La formation de ces sites abasiques est toxique pour les cellules et peut bloquer la réplication et la transcription de l'ADN. La réparation de ces dommages est ainsi prise en charge par le système de réparation BER.

Cependant la mise en place du processus de réparation BER au sein des cellules cancéreuses réduit fortement l'efficacité des agents anticancéreux utilisés pour endommager l'ADN dans le but d'induire la mort cellulaire. De ce fait, les protéines impliquées dans la voie de réparation sont devenues des cibles privilégiées dans la lutte contre le cancer.

Introduction



I- Le système de réparation par excision de base et son rôle dans la lutte contre le cancer

1- L'acide désoxyribonucléique, support de l'information génétique

Isolé pour la première fois en 1869 par l'allemand Friedrich Miescher, pendant plus de 60 ans de nombreux laboratoires se sont attelés à la découverte de la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Alors qu'en 1935 il est établi que l'ADN peut être décomposé en entités plus petites appelées nucléotides, il faut attendre 1951 pour que la structure primaire de l'ADN comme polynucléotide linéaire soit établie avec certitude. En effet alors que les travaux effectués par Klein et Thannhauser permettent l'obtention pour la première fois de la structure cristalline des quatre désoxyribonucléotides, les recherches entreprises en 1944 par Alexander Todd mettent en valeur la liaison de type phosphodiester reliant ainsi les nucléotides au sein de l'ADN.

L'ADN se caractérise donc par un enchaînement de désoxyribonucléotides constitués de trois parties : un sucre de type pentose relié à une base hétérocyclique azotée formant un nucléoside, ainsi que d'un résidu phosphate (*Figure 1*). Les bases azotées sont séparées en deux grandes familles, les purines de type adénine (A) ou guanine (G) et les pyrimidines de type cytosine (C), thymine (T) mais aussi uracile (U) présent naturellement au sein de l'acide ribonucléique (ARN). La liaison phosphodiester permet d'assurer les liaisons entre les groupements hydroxyles présents en 5' sur un sucre et les groupements hydroxyles présents en 3' sur le sucre du nucléoside voisin.

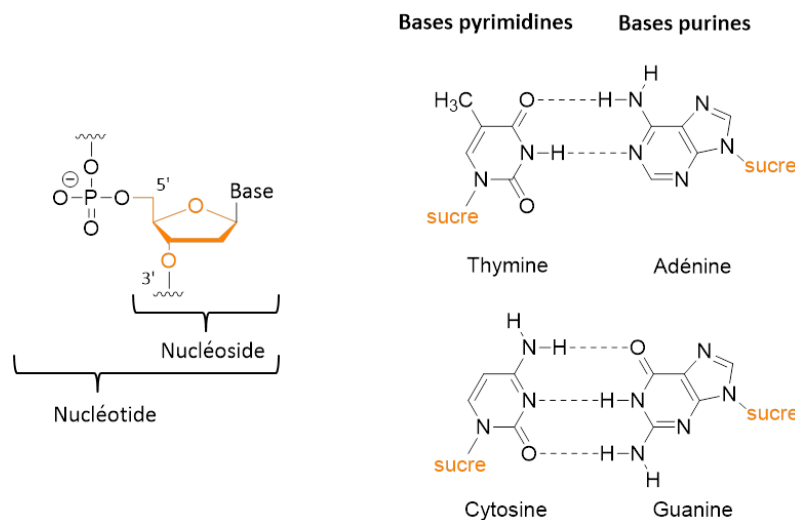


Figure 1- Structure de l'ADN et schématisation des appariements de Watson-Crick des bases azotées au sein de l'ADN.

En 1950, les recherches menées alors par Erwin Chargaff permettent d'établir que la proportion de bases purines (adénine et guanine) est toujours égale à la proportion de bases pyrimidines (cytosine et thymine) au sein de l'ADN.⁵ Ces premières constatations, enrichies de l'étude par diffraction des rayons X effectuée par Rosalind Franklin, sont reprises et complétées par Francis Crick et James Watson. Elles permettent alors d'aboutir en 1953 à la résolution de la structure secondaire en double hélice de l'ADN, encore appelé ADN duplexe. Cette découverte permet ainsi à Francis Crick, James

Watson et Maurice Wilkins de recevoir le prix Nobel de médecine en 1962. Au cours de leurs recherches, ces derniers montrent que la structuration de l'ADN est rendue possible suite à l'auto-association des bases purines avec les bases pyrimidines entre deux brins d'ADN complémentaires par formation de liaisons non-covalentes. En effet au sein de l'ADN les bases adénines et thymines peuvent s'associer en formant deux liaisons hydrogènes. Les bases guanines s'apparient aux bases cytosines de la même façon en formant cependant trois liaisons hydrogènes. A la suite de la découverte de cette structure secondaire duplexe, il a été mis en valeur que l'ADN peut également adopter différentes conformations telles que des structures en triples hélices, des structures quadruplexes observées au sein de séquences d'ADN riches en guanine, mais également former des boucles dans des zones riches en cytosine appelées alors « i-motif ».

Ce n'est que 75 ans après sa première isolation que l'importance de l'ADN est révélée. En effet, en 1944 les travaux des chercheurs Oswald T. Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarthy mettent en évidence le rôle central de l'ADN dans la transmission des informations génétiques. Au cours de leurs recherches, ils démontrent que l'ADN d'une souche bactérienne pathogène est le seul élément nécessaire et suffisant pour permettre la transformation d'une souche non pathogène en souche pathogène. A une époque où l'hérédité est considérée comme portée par les protéines, cette observation met en valeur pour la première fois le rôle de l'ADN comme support de l'information génétique. Cependant il faut attendre 1953 et la révélation de la structure en double hélice pour que la communauté scientifique prenne en considération cette découverte. Le déchiffrement du code génétique prend ainsi place quelques années après en 1968. Les chercheurs Marshall Nirenberg, Har Gobind Khorana et Robert Holley démontrent alors que des codons formés de trois nucléotides codent pour un des vingt acides aminés naturels, découverte pour laquelle ils obtiennent le prix Nobel. Ces acides aminés, assemblés dans un ordre établi par la séquence d'ADN, prennent alors une configuration complexe pour former une protéine spécifique. Ainsi, la stricte conservation de la séquence nucléotidique est essentielle pour la transmission de l'information génétique.

Cependant l'ADN présente une structure fragile et bien que localisé majoritairement au cœur du noyau des cellules, il est constamment soumis à de nombreux stress endogènes ou exogènes qui peuvent alors altérer son code génétique, introduire des mutations et conduire ainsi à la mort cellulaire ou à des maladies génétiques. Ces facteurs environnementaux peuvent être d'origine chimique comme les espèces réactives de l'oxygène ou les agents alkylants ou bien physique comme les rayonnements ionisants ou ultra-violets. Mais la perte d'information génétique peut également provenir de l'activité métabolique, par exemple la réplication de l'ADN par les polymérases peut conduire à la formation de mésappariements, malgré leur activité de relecture.⁶

2- Des mécanismes indispensables au maintien de l'intégrité génomique

Face aux différents facteurs pouvant altérer leur code génétique, les cellules ont développé des processus de réparation essentiels à leur survie. Les premières observations mettant en évidence l'existence de mécanismes de réparation au sein des cellules apparaissent en 1949. En effet en parallèle Albert Kelner et Renato Dulbecco constatent la multiplication des bactéries *Streptomyces griseus* ou des bactériophages (virus infectant les bactéries) suite à une exposition à la lumière blanche, malgré une inactivation préalable de ces dernières par rayonnements ultra-violets, cependant sans pouvoir apporter d'interprétations.^{7,8} Ce phénomène a été expliqué par la suite par

la prise en charge des dimères de pyrimidines créés au sein de l'ADN suite à l'exposition aux ultraviolets par une enzyme de réparation de type photolyase utilisant la lumière bleue comme source d'énergie. Le maintien de l'intégrité génomique est ainsi assuré par différentes voies de réparation spécifiques aux dommages.⁹⁻¹²

Les lésions de l'ADN sont multiples et dépendantes de la source du dommage (*Figure 2*). Ainsi elles peuvent être classées en différentes catégories, auxquelles correspondent des voies spécifiques de réparation :

- Les bases altérées formées par méthylation, déamination ou oxydation, les sites abasiques résultant de la rupture de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose ainsi que les coupures simple-brins, sont le résultat le plus souvent de l'action des espèces réactives de l'oxygène, des radiations ionisantes ou encore des agents alkylants,
- Les adduits de l'ADN et les pontages intrabrins de type dimère de pyrimidines ou purines obtenus par liaison covalente entre deux bases adjacentes, font suite à une exposition aux rayonnements ultra-violets, à l'action des espèces réactives de l'oxygène ou encore à l'action de composés tels que le cisplatine, les agents bis-alkylants ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques,
- Les mésappariements ou les erreurs de type insertion ou délétion de bases résultent souvent d'erreurs au cours du processus de réplication,
- Enfin les pontages interbrins ou les cassures double-brins apparaissent suite à l'action d'agents ionisants ou alkylants, du cisplatine ou des espèces réactives de l'oxygène.

Afin de garantir la stabilité de leur génome vis-à-vis de ces différents dommages, les cellules ont donc développé cinq principales voies de réparation : la réparation par excision de nucléotides (*nucleotide excision repair*- NER), la réparation des mésappariements (*mismatch repair*- MMR), la réparation par jonction d'extrémités non homologues (*non-homologous end joining*- NHEJ), la réparation par recombinaison homologue (*homologous recombination*- HR) et enfin la réparation par excision de base (*base excision repair*- BER), mais également des mécanismes directs de réparation impliquant des enzymes dites suicides dont la O⁶-méthylguanine méthyltransférase (MGMT).

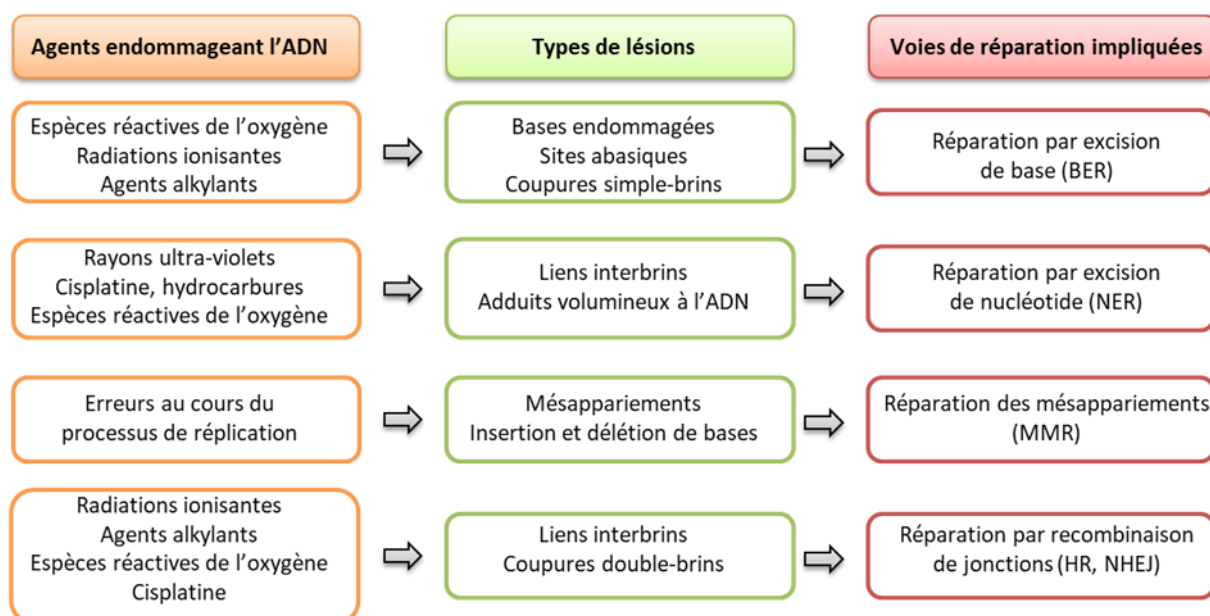


Figure 2- Principales lésions induites par les agents endommageant l'ADN et les systèmes de réparation mis en jeu.

Les adduits volumineux de type benzo[*a*]pyrène par exemple, mais également les pontages intrabrins sont pris en charge par la voie de **réparation par excision de nucléotides (NER)**. Le mécanisme de réparation peut être activé par la cellule à la suite de deux modes de détection. Ainsi ce dernier intervient indépendamment de la localisation du dommage dans le génome dans le cadre du *Global genome NER* (GG-NER) ou suite à la présence des lésions au niveau des régions transcrites de l'ADN empêchant la transcription de l'ADN par les ARN polymérase II, *Transcription coupled NER* (TC-NER). Toutefois malgré deux modes de détection différents les dommages sont pris en charge identiquement par les protéines XP, référencées ainsi car le dysfonctionnement de ces enzymes se traduit par une hypersensibilité aux rayons ultra-violet et une prédisposition au cancer de la peau nommée *xeroderma pigmentosum* chez l'Homme. Le processus de réparation NER débute tout d'abord par l'ouverture de la structure hélicoïdale de l'ADN par des hélicases permettant ainsi l'accès au site de dommage. Les protéines XPG et XPF vont alors inciser le brin endommagé du côté 3' et 5' respectivement de la lésion libérant ainsi un fragment de 24 à 32 nucléotides. Puis dans un second temps des ADN polymérases resynthétisent la partie excisée, en se servant du brin complémentaire comme matrice, qui sera ensuite incorporée au brin d'ADN suite à l'action de protéines ligases.

Le mécanisme de **réparation des mésappariements (MMR)** intervient principalement lors d'insertion ou de délétion de bases ainsi que pour corriger les erreurs formées au cours de la synthèse de l'ADN et non détectées par les polymérases δ et ϵ . Après détection du dommage, des ADN glycosylases non spécifiques aux mésappariements vont procéder à l'hydrolyse du brin défectueux quelques dizaines de nucléotides en aval de la lésion. Puis après retrait du fragment contenant le mésappariement par des exonucléases conduisant alors à une rupture simple-brin, les ADN polymérases resynthétisent la portion d'ADN par complémentarité avec le brin matrice. Enfin comme au cours de tous les processus de réparation le fragment nouvellement synthétisé est lié de façon covalente par des enzymes de type ligase.

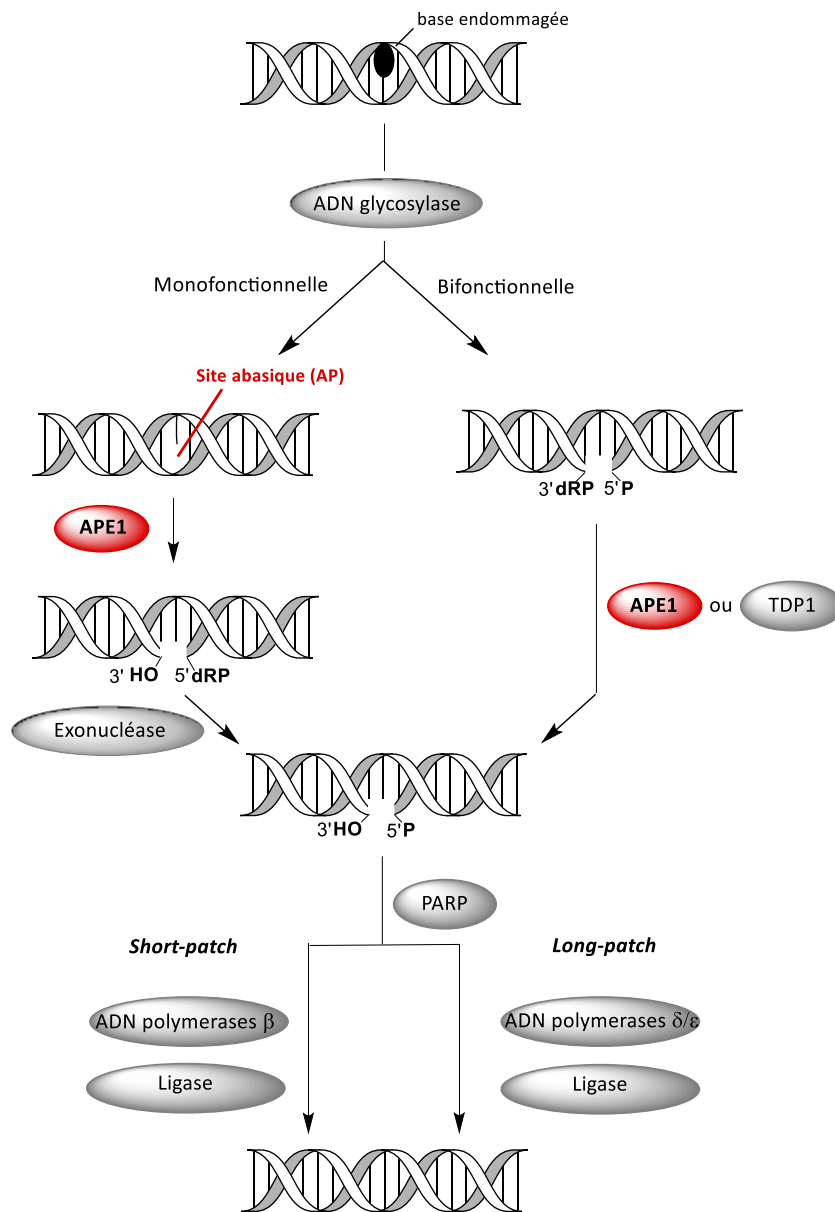
Les coupures double-brins produites en grande majorité après une exposition à des rayonnements ionisants sont des lésions hautement cytotoxiques pour les cellules. Elles peuvent ainsi être prises en charge par deux mécanismes différents impliquant la **réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)** ou la **réparation par recombinaison homologue (HR)**. Le mécanisme NHEJ consiste en la simple réassociation des extrémités d'ADN séparées par la cassure suite à l'action d'une ligase. Ce processus peut ainsi introduire des délétions ponctuelles comme des translocations ou des mutations et est de ce fait moins fiable. Le processus de réparation HR est lui un mécanisme de réparation plus lent mais, en utilisant la séquence chromosomique non endommagée comme matrice pour répliquer l'ADN, présente l'avantage de n'induire aucune perte d'information génétique. L'implication du mécanisme HR ou NHEJ dans la réparation des coupures double-brins dépend fortement de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la lésion apparaît. En effet, le processus HR s'appuie sur les chromosomes or ces derniers ne sont pas présents dans toutes les phases.

Des études plus récentes ont montré l'existence d'une voie alternative aux mécanismes de réparation NHEJ, nommé également NHEJ canonique (C-NHEJ), et HR.¹³ En effet, les coupures double-brins peuvent également être réparées par jonction d'extrémités non homologues mais avec une cinétique de réparation plus lente que dans le cas classique C-NHEJ, en impliquant des enzymes différentes. Cette voie, nommée A-NHEJ ou A-EJ, introduit cependant des erreurs au sein du génome en nombre plus important que la voie C-NHEJ et est considérée comme une source importante de l'instabilité génomique. Bien que les raisons de la mise en place de la voie A-NHEJ ne soient pas totalement élucidées, une défaillance dans les mécanismes de réparation C-NHEJ et HR pourrait en être la cause.

Enfin, le système de **réparation par excision de base (BER)** est impliqué dans la réparation des bases endommagées, des sites abasiques mais également des coupures simple-brins. Son mécanisme est étudié plus en détail dans la partie suivante.

3- Le système de réparation par excision de base (*Base excision repair - BER*)

La réparation de l'ADN par la voie BER a été en premier lieu investiguée par Tomas Lindahl, recherches pour lesquelles il reçoit en 2015 le prix Nobel de Chimie conjointement avec Paul Modrich et Aziz Sançar.¹⁴⁻¹⁶ Les études mécanistiques menées alors ont permis de révéler un processus coopératif entre différentes enzymes conduisant à rétablir la séquence génomique. Ainsi, la voie de réparation BER est divisée en plusieurs étapes (*Figure 3*).^{12,17,18}



dRP: desoxyribose phosphate

Figure 3- Schématisation de la voie de réparation par excision de base (BER).

La première étape est initiée par une ADN glycosylase qui reconnaît puis retire la base endommagée en hydrolysant la liaison *N*-glycosidique reliant le sucre et la base azotée au sein d'un nucléotide. Chez les cellules de mammifères, onze glycosylases différentes ont ainsi été identifiées, caractérisées par des substrats et modes d'action différents.¹⁹ Les ADN glycosylases sont classées en deux catégories différentes. Les enzymes dites monofonctionnelles ou de type 1 comme l'UDG (*Uracil DNA Glycosylase*) et l'AAG (*Alkyladenine DNA Glycosylase*), vont basculer la base endommagée dans le sillon de l'ADN et permettre alors l'hydrolyse de la liaison glycosidique dans leur site actif, aboutissant ainsi à la création d'un site abasique.

Les enzymes dites bifonctionnelles ou de type 2 dont notamment la Fpg (*Formamidopyrimidine DNA glycosylase*), possèdent en plus une activité dite de lyase. Ainsi elles procèdent au retrait de la base

endommagée suivi du clivage du site abasique ainsi formé. En effet, au sein du site actif de l'enzyme, un intermédiaire covalent de type base de Schiff est formé entre le sucre sous sa forme aldéhyde et le groupement amine d'une lysine. Cet intermédiaire peut alors catalyser le clivage du brin d'ADN par β -élimination du côté 3' du site abasique.

Pour les ADN glycosylases de type 1, la coupure de la liaison phosphodiester a lieu du côté 5' du site abasique au niveau du brin d'ADN et est générée par l'action d'une endonucléase AP, nommée APE1, résultant alors en une extrémité 3'-OH et 5'-desoxyribose phosphate (dRP) sur le brin d'ADN. L'extrémité 5'-desoxyribose phosphate est alors retirée par une exonucléase ou une ADN desoxyribophosphodiesterase.

A la suite des enzymes de type 2, la protéine APE1 est également recrutée mais pour sa deuxième activité dite de phosphodiesterase. En effet, elle va ainsi retirer l'aldéhyde β -insaturé et la terminaison 3'-phosphate afin d'obtenir une extrémité du brin 3'-OH. De façon notable, cette étape peut également être effectuée par la phosphodiesterase tyrosyl-ADN (TDP1).²⁰

Le mécanisme de réparation de la voie BER peut alors être divisé en deux voies, dépendantes de la taille de la coupure du brin et des enzymes mises en jeu. La première voie, nommée « *short-patch* », est caractérisée par la synthèse et l'incorporation d'un seul nucléotide au niveau de la lésion par une ADN polymérase β (Pol β). La deuxième voie, nommée « *long-patch* », consiste en la resynthèse d'un oligonucléotide composé de deux à sept nucléotides par les ADN polymérases δ/ϵ . Enfin, l'action d'une ligase permet de rétablir la liaison phosphodiester entre le nucléotide nouvellement synthétisé et le brin d'ADN.

Le fonctionnement de ces deux dernières familles d'enzymes de réparation n'est permis qu'à la suite de la présence d'une poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) au niveau de la lésion. En effet, en se fixant au niveau de la coupure simple-brin, la protéine PARP synthétise un polymère ADP-ribose nécessaire au recrutement des ADN polymérases et des ADN ligases.

4- Les agents alkylants de l'ADN dans le cadre de la lutte contre le cancer

Les différents mécanismes de réparation de l'ADN sont indispensables au maintien de l'intégrité des cellules et permettent ainsi d'éviter la mort cellulaire ainsi que le développement de cellules cancéreuses. Cependant tout comme les cellules saines, les cellules cancéreuses peuvent détecter la présence de lésions au sein de leur ADN et ainsi réparer les dommages formés. La surexpression de ces voies de réparation, au sein des cellules cancéreuses, réduit drastiquement l'efficacité thérapeutique de la plupart des agents anticancéreux qui endommagent l'ADN, ce qui conduit à la chimio- ou radiorésistance.

a- Les différentes familles d'agents alkylants et leur mode d'action

Classiquement les différents traitements anticancéreux sont répartis en plusieurs catégories dont la chimiothérapie, la radiothérapie ou encore l'immunothérapie. Parmi la chimiothérapie est inclus un grand nombre de familles caractérisées par leur mode d'action dont les antibiotiques antitumoraux, les antimétabolites, les inhibiteurs des topoisomérases I et II ou encore les agents alkylants.²¹ Ces

derniers regroupent tous les composés capables d'endommager des molécules biologiques suite au transfert d'un ou plusieurs groupements alkyles conduisant ainsi à la formation d'adduits. Ils représentent la plus ancienne famille de composés utilisée pour traiter le cancer dans le cadre d'une stratégie chimio-thérapeutique.²²

Même si par la suite les différents dommages engendrés par les agents alkylants au sein de l'ADN soient explicités plus en détails, il est important de noter que ces derniers peuvent endommager diverses molécules biologiques comme l'ARN mais également les protéines et les lipides.

Différentes classifications des agents alkylants de l'ADN existent. En effet, ils peuvent être séparés tout d'abord en fonction du nombre de sites réactifs présents au sein de leur structure. On distingue ainsi les agents alkylants dits monofonctionnels, qui ne présentent qu'un seul groupement réactif et les agents alkylants bifonctionnels qui possèdent deux groupes réactifs conduisant pour la plupart à la formation de pontages interbrins. Dans un second temps, ils peuvent également être répertoriés en fonction du type de groupement transféré notamment méthyle, éthyle ou encore chloroéthyle.

Enfin une troisième classification de ces différents agents est basée sur leur réactivité chimique. En effet, alors que certains composés alkylants induisent des adduits à l'ADN par substitution nucléophile de type S_N1 , d'autres affichent un mécanisme réactionnel de type S_N2 (Figure 4). La principale différence entre ces deux modes de réactivité réside dans le type d'adduits ainsi formés. En formant un intermédiaire hautement réactif de type carbocation, les agents alkylants de type S_N1 ne présentent pas de grande sélectivité et ciblent ainsi les groupements amines endocycliques présents sur les bases de l'ADN mais également les atomes d'oxygènes extracycliques, alors que les agents alkylants de type S_N2 ne vont conduire qu'à la formation d'adduits azotés.²³⁻²⁵

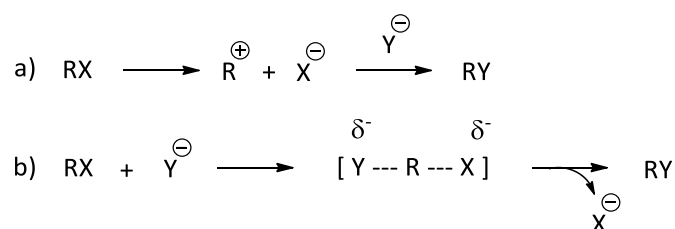


Figure 4- Schématisation du mécanisme réactionnel d'une substitution nucléophile a) de type S_N1 ; b) de type S_N2 . Dans le cas des agents alkylants de l'ADN, Y représente une base azotée.

Le caractère hautement nucléophile de la position N^7 des guanines fait de la base N^7 -méthylguanine la principale lésion engendrée suite à l'action d'une grande majorité des agents méthylants (Figure 5). Elle représente de ce fait 70 à 80% de la totalité des adduits formés. Cependant en préservant les liaisons hydrogènes de Watson-Crick, cet adduit ne présente pas par lui-même une très grande cytotoxicité mais il conduit à la formation de sites abasiques suite à un processus spontané de dépurination,²⁶ lésion qui non réparée est toxique et mutagène par la cellule (Figure 6).

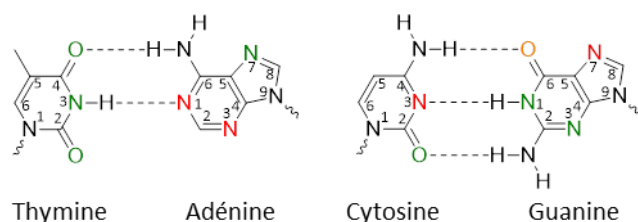


Figure 5- Principaux sites d'alkylation des bases de l'ADN, en rouge par les agents alkylants de type S_N1 et S_N2 , en orange par les agents alkylants de type S_N1 seulement. En vert, sites d'alkylation minoritaires.

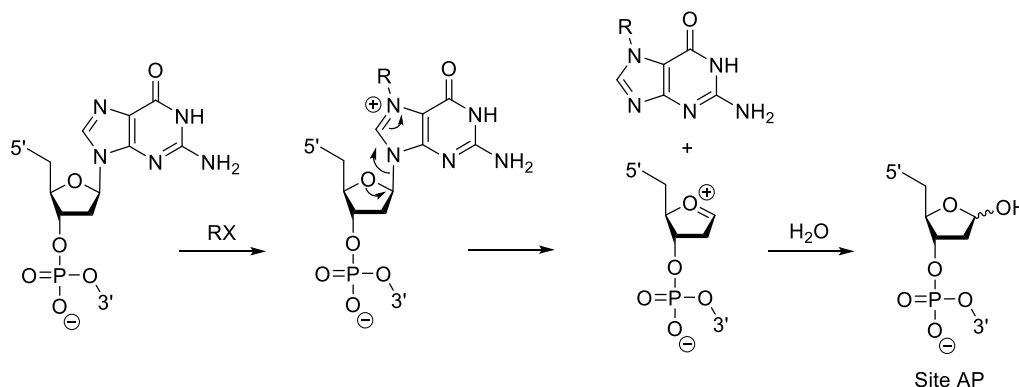


Figure 6- Mécanisme réactionnel de la dépurination spontanée de la base N^7 -alkylguanine conduisant à la formation d'un site abasique.²⁶

L'action des agents alkylants conduit également à la formation de la base N^3 -méthyladénine. Malgré une proportion moindre, de 10 à 15%, cette lésion présente néanmoins une cytotoxicité plus importante. En effet, cette dernière bloque l'action de la plupart des ADN polymérases conduisant ainsi à l'inhibition de la synthèse de l'ADN. Enfin, la position N^1 de la base adénine ainsi que la position N^3 de la base cytosine constituent également des centres nucléophiles privilégiés pour les agents alkylants, conduisant à la formation de la base N^1 -méthyladénine et N^3 -méthylcytosine respectivement. Cependant la structure en double brin de l'ADN contribue à protéger ces positions, en effet celles-ci sont engagées dans la formation de liaisons hydrogènes de Watson-Crick (Figure 5). Néanmoins ces sites deviennent vulnérables au cours des processus impliquant la séparation des brins de l'ADN notamment au cours de la réplication ou encore de la transcription de l'ADN.

Bien que cytotoxiques et plus nombreux, les adduits azotés restent néanmoins moins mutagènes que les adduits formés suite à l'alkylation des atomes d'oxygènes par les agents de type S_N1 . Parmi les sites oxygénés réactifs, la position O^6 de la base guanine est le principal centre de méthylation, conduisant à la formation de la base O^6 -méthylguanine. Malgré que cette lésion ne représente qu'environ 6% de la totalité des adduits formés,^{25,27} elle présente cependant une toxicité bien plus importante que les adduits azotés. En effet elle contribue à la formation d'un mésappariement avec les bases thymine ce qui implique à la suite du processus de réplication un effet biologique hautement mutagène. D'autres sites oxygénés ainsi qu'azotés peuvent également être la cible d'alkylation (Figure 5, en vert) mais ils ne représentent qu'un faible pourcentage sur la totalité des adduits (< 3%).^{24,27}

Au sein des agents alkylants dit monofonctionnels, trois familles de composés se distinguent (Figure 7).²⁸

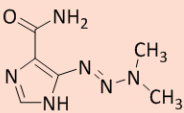
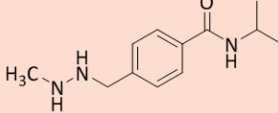
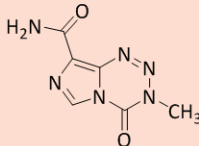
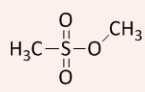
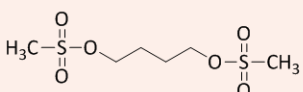
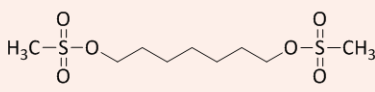
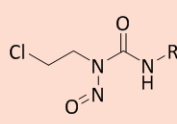
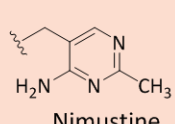
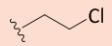

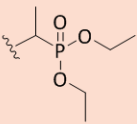
Agents alkylants monofonctionnels					
Triazènes	 Dacarbazine	 Procarbazine	 Témzolomide		
Alkylsulfonates	 Méthanesulfonate de méthyle (MMS)	 Busulfan	 Hepsulfan		
Nitrosourées chloroéthylants		R =  Nimustine	 Carmustine	 Lomustine	 Fotemustine

Figure 7- Exemples d'agents alkylants monofonctionnels de type triazène, alkylsulfonate ou nitrosourée chloroéthylant.

La première catégorie est constituée des molécules de type triazène parmi lesquelles la dacarbazine, utilisée dans le traitement des mélanomes ainsi que la procarbazine et le témzolomide, utilisés pour traiter les tumeurs cérébrales. La métabolisation de la dacarbazine et de la procarbazine induit la formation d'un intermédiaire hautement réactif, le cation méthyldiazonium, qui conduit alors à la méthylation des sites nucléophiles azotés mais également oxygénés suite à un mécanisme de type S_N1 .²⁹ Le témzolomide, stable à pH acide permettant une administration orale, s'hydrolyse lui rapidement à pH supérieur à 7 pour former le 5-(3-méthyltriazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC), qui est lui aussi rapidement dégradé en 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) et en cation méthyldiazonium (Figure 8).³⁰ La dégradation du témzolomide conduit de ce fait à la formation de la même espèce active que la métabolisation de la dacarbazine et de la procarbazine. Le principale avantage du témzolomide réside en sa nature lipophile qui lui permet de pénétrer la barrière hémato-encéphalique, ce qui en fait un traitement de choix dans la lutte contre le cancer du cerveau. Ainsi le témzolomide, commercialisé sous le nom de Témodal par le laboratoire Schering Plough, est autorisé depuis 1999 en France pour traiter le glioblastome chez l'adulte, la forme maligne de cancer du cerveau la plus fréquente chez l'adulte et la plus agressive.

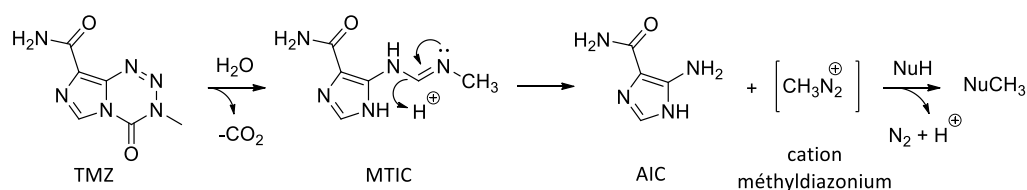


Figure 8- Schéma réactionnel de l'activation du témzolomide. NuH est un centre nucléophile sur l'ADN.

Les composés de type alkylsulfonate sont également des agents monofonctionnels, cependant ils présentent un mécanisme réactionnel de type S_N2 et vont ainsi conduire très majoritairement à la formation de la base N^7 -alkylguanine. Alors que le méthanesulfonate de méthyle (MMS) ne transfère qu'un groupement méthyle, il a été démontré que les alkylsulfonates dont notamment le busulfan³¹ et l'hepsulfan³² permettent la formation de pontages interbrins après une première réaction avec la position N^7 des bases guanines (*Figure 9*).

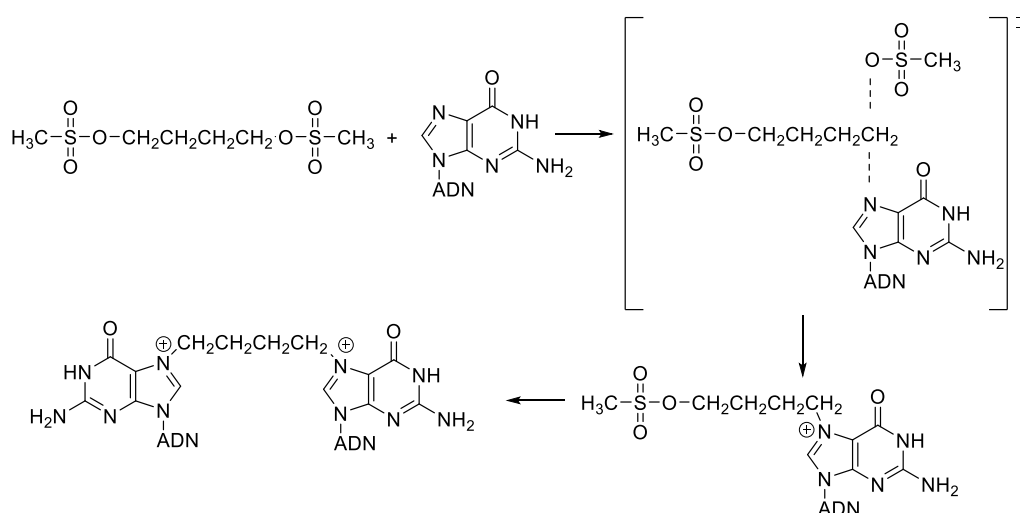


Figure 9- Mécanisme réactionnel de la formation de pontages interbrins par le busulfan.

Enfin, les composés de type nitrosourée chloroéthylant viennent compléter la famille des agents monofonctionnels en ayant la capacité de transférer un groupement chloroéthyle par l'intermédiaire d'un mécanisme de type S_N1 . Ce dernier groupe de molécules favorise la formation de diverses lésions. En effet, instables à pH physiologique, les nitrosourées chloroéthylants se décomposent en différentes espèces dont le chloroéthylidiazohydroxide qui conduit alors à la formation de l'ion chloroéthylcarbonium, l'espèce active (*Figure 10*).^{25,27,33-35} Ce dernier hautement réactif va ainsi alkyler préférentiellement la position N^7 de la guanine conduisant ainsi à la formation de la base N^7 -chloroéthylguanine. Cette dernière, suite à un processus de deshalogénéation spontané, peut dans un second temps conduire à la formation de pontages interbrins de type guanine-guanine cependant en moindre proportion. En intervenant en amont de la formation du chloroéthylidiazohydroxide, le processus de déchlorination génère la formation de l'ion hydroxyéthylcarbonium qui conduit ainsi à la base N^7 -hydroxyéthylguanine, représentant environ 50% de la totalité des adduits formés. Comme observé lors de tous les mécanismes réactionnels de type S_N1 , l'ion chloroéthylcarbonium et l'ion hydroxyéthylcarbonium réagissent également sur la position O^6 des bases guanines pour former la base O^6 -chloroéthylguanine et la base O^6 -hydroxyéthylguanine. De nouveau après déchlorination spontanée, la base O^6 -chloroéthylguanine peut subir un réarrangement intramoléculaire aboutissant à la formation d'un intermédiaire N^1, O^6 -éthanoguanine. Puis suite au clivage de la liaison exocyclique C-O, une réaction avec la cytosine du brin complémentaire en position N^3 aboutit à la formation d'un pontage interbrin guanine-cytosine, lésion hautement cytotoxique pour la cellule bien que ne représentant qu'environ 5% de la totalité des lésions engendrées. Parmi les nitrosourées chloroéthylants couramment utilisées en clinique sont répertoriées la carmustine (BCNU) qui est principalement prescrite pour le traitement des cancers cérébraux^{36,37} mais aussi la lomustine (CCNU)

qui présente une bonne activité afin de lutter contre les lymphomes³⁸ ou les cancers gastro-intestinaux.³⁹

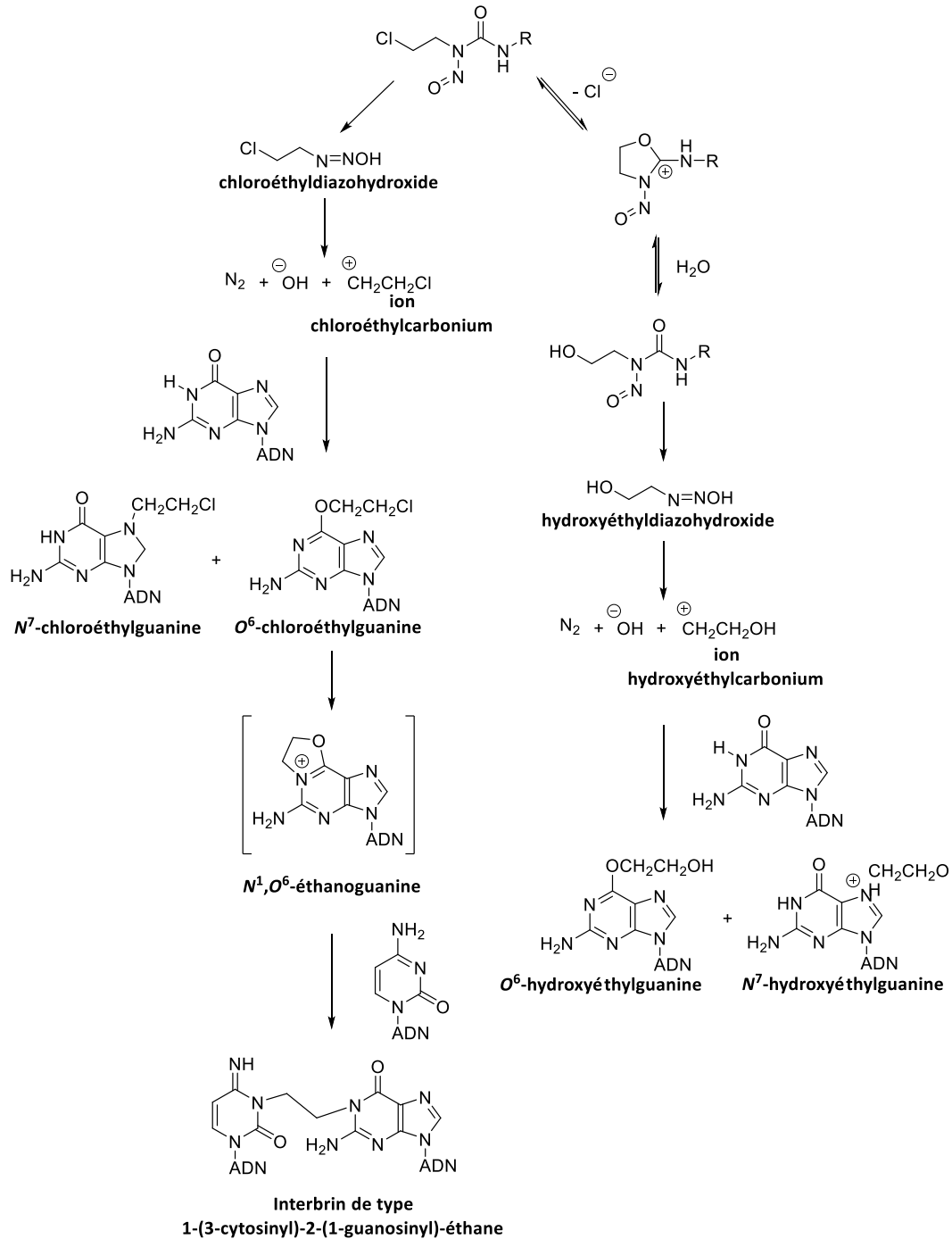


Figure 10- Schéma réactionnel de la formation des principaux adduits observés suite à l'action des nitrosourées chloroéthylantes.

Les agents alkylants bifonctionnels sont eux séparés en deux groupes (Figure 11).

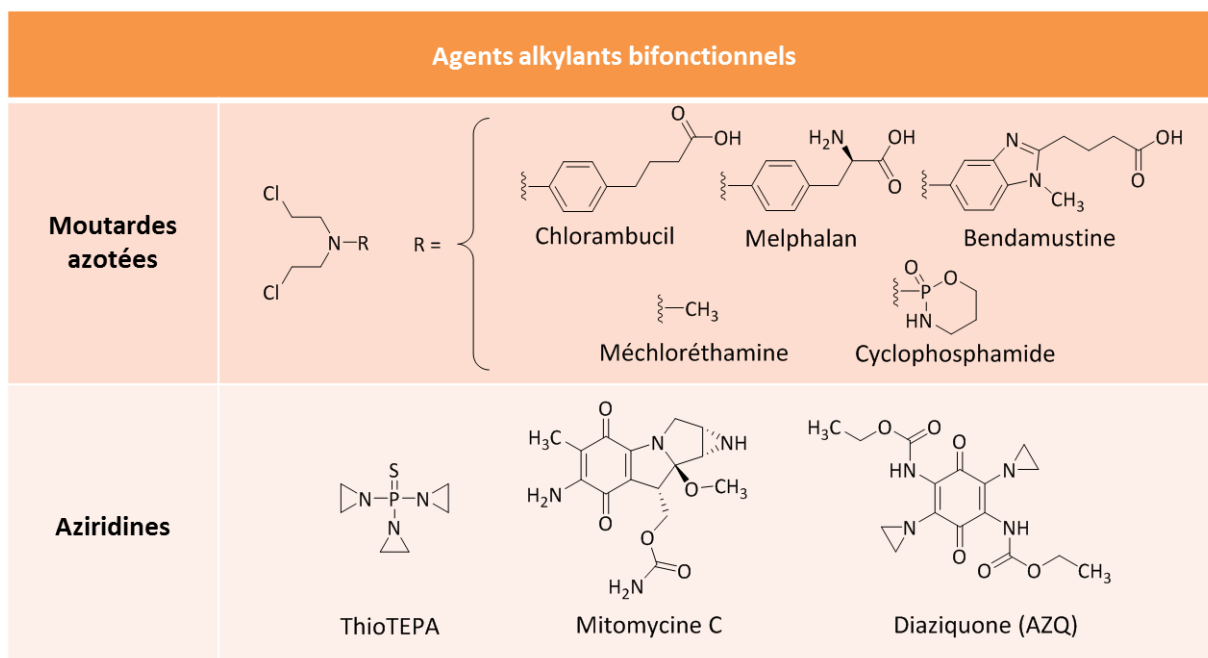


Figure 11- Exemples d'agents alkylants bifonctionnels de type moutarde azotée et de type aziridine.

Le premier rassemble les composés de type moutarde azotée. Ces molécules sont caractérisées par la présence de deux groupements chloroéthyles au sein de leur structure et adoptent ainsi un mécanisme réactionnel passant par la formation d'un intermédiaire de type aziridinium (Figure 12). Ces agents génèrent donc la formation d'adduits encombrants sur les positions azotées réactives des différentes bases mais aussi sur la position O^6 de la base guanine. Ils vont également favoriser, comme les nitrosourées chloroéthylants, la formation de pontages interbrins entre les bases de l'ADN. Cinq composés de type moutarde azotée sont actuellement utilisés dans le cadre d'un traitement chimio-thérapeutique : la méchloroéthamine, le cyclophosphamide, le melphalan, la bendamustine et le chlorambucil.

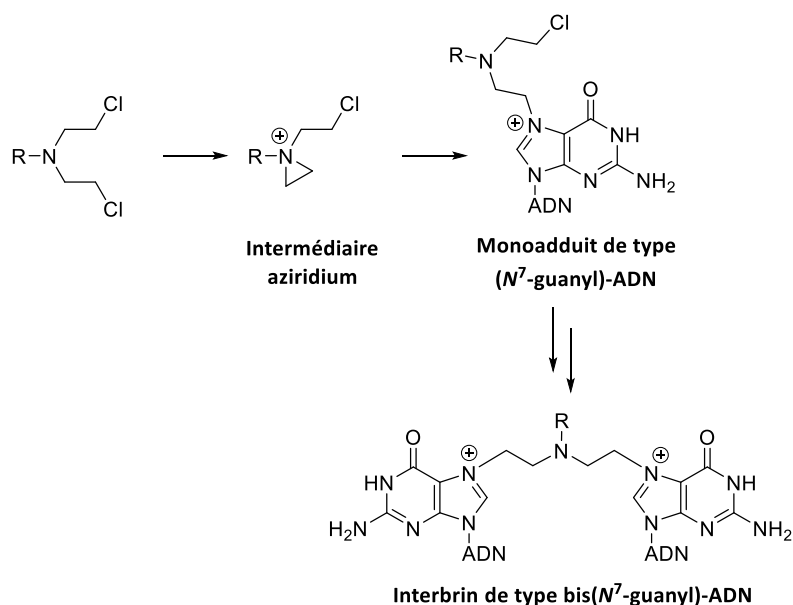


Figure 12- Schématisation de la formation des pontages interbrins de type bis(N^7 -guanyl)-ADN par les composés de type moutarde azotée.

Enfin le dernier groupe est composé des agents de type aziridine. Ces composés sont caractérisés par la présence d'un cycle aziridine structurellement similaire au cycle iminium formé par les moutardes azotées. Cependant, n'étant pas chargé, ce groupement est moins réactif chez les aziridines. L'ouverture du cycle après un processus de métabolisation ou à pH inférieur à 8 permet de générer l'espèce active qui va conduire principalement à la formation de pontages interbrins.⁴⁰⁻⁴³ Trois composés sont utilisés cliniquement, le thioTEPA (triethylenethiophosphoramidate), la mitomycine C et le diaziquone (AZQ). Le thioTEPA est notamment prescrit pour le traitement des cancers des ovaires.⁴⁴ Il a la particularité de présenter deux mécanismes réactionnels conduisant à la formation de monoadduits suite à un clivage hydrolytique libérant le groupement aziridine ou de diadduits (*Figure 13*). La mitomycine C est un produit naturel utilisé notamment dans le traitement du cancer de la vessie ou des poumons⁴⁵ alors que le diaziquone, utilisé pour traiter les tumeurs solides,⁴⁶ est une molécule de synthèse capable de traverser la barrière hémato-encéphalique grâce à sa nature lipophile.

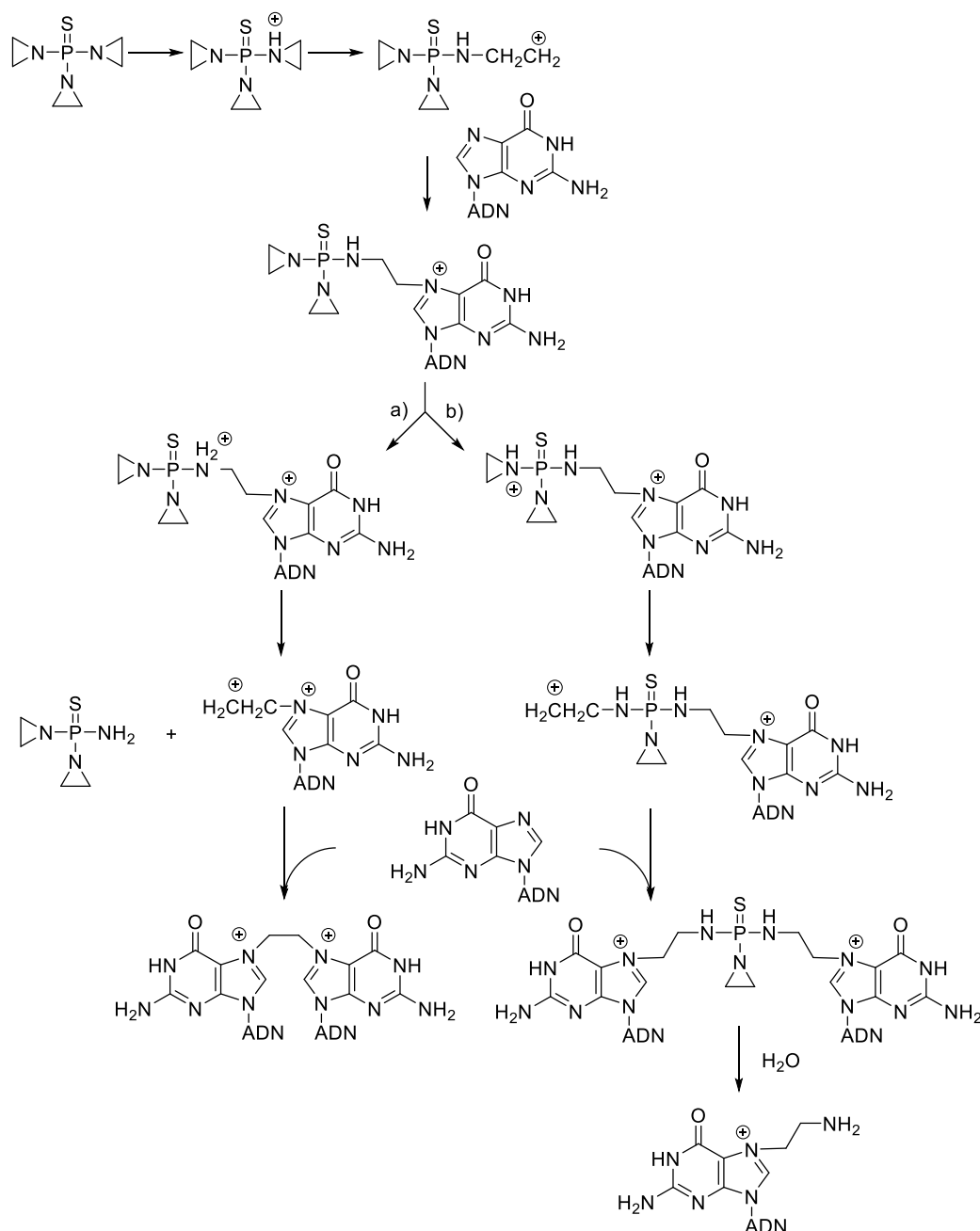


Figure 13- Schématisation du mécanisme réactionnel de la formation a) de pontages interbrins ; b) de monoadduit par le thioTEPA.

Ainsi à ce jour, dans le cadre d'un traitement chimio-thérapeutique du cancer, les agents alkylants monofonctionnels ou bifonctionnels sont utilisés cliniquement sans distinction mais ils adoptent pour la très grande majorité un mécanisme réactionnel de type S_N1 . Cependant, la résistance des cellules à l'action de ces différents agents alkylants représentent la principale source d'échec de la chimiothérapie. Deux mécanismes de réparation sont principalement liés à la chimiorésistance, la voie de réparation directe impliquant la O^6 -méthylguanine méthyltransférase (MGMT) ainsi que la voie de réparation BER.

b- La résistance des cellules cancéreuses aux agents alkylants

Bien que ne représentant qu'environ 6% de la totalité des adduits formés suite à l'action des différents agents alkylants de type S_N1 , la lésion O^6 -alkylguanine est fortement cytotoxique et mutagène pour la cellule. En effet, alors que l'introduction d'adduits sur les bases de l'ADN bloque le plus généralement la réplication de l'ADN, les lésions O^6 -alkylguanine n'inhibent pas l'activité des ADN polymérase. Néanmoins au cours du processus de réplication, ces dernières apparièrent la base alkylée avec une base thymine à la place d'une base cytosine.^{27,47,48} En effet la formation de ce mésappariement est favorisée, conséquence de la stabilisation de ce dernier par liaisons Watson-Crick. Dans un premier cas, le processus de réparation MMR détecte alors le mésappariement et intervient pour réparer la lésion. Cependant, les enzymes impliquées dans cette voie de réparation excisent le brin porteur de la base thymine ainsi la lésion O^6 -alkylguanine persiste sur le brin d'ADN. Après plusieurs cycles de correction qui n'aboutissent pas, la cellule ne survit pas à la lésion. Si la lésion n'est pas prise en charge par les enzymes de la voie MMR, un second processus de réplication conduit au remplacement de la base O^6 -alkylguanine appariée alors avec une thymine, par une base adénine, résultant en une mutation du code génétique (Figure 14).

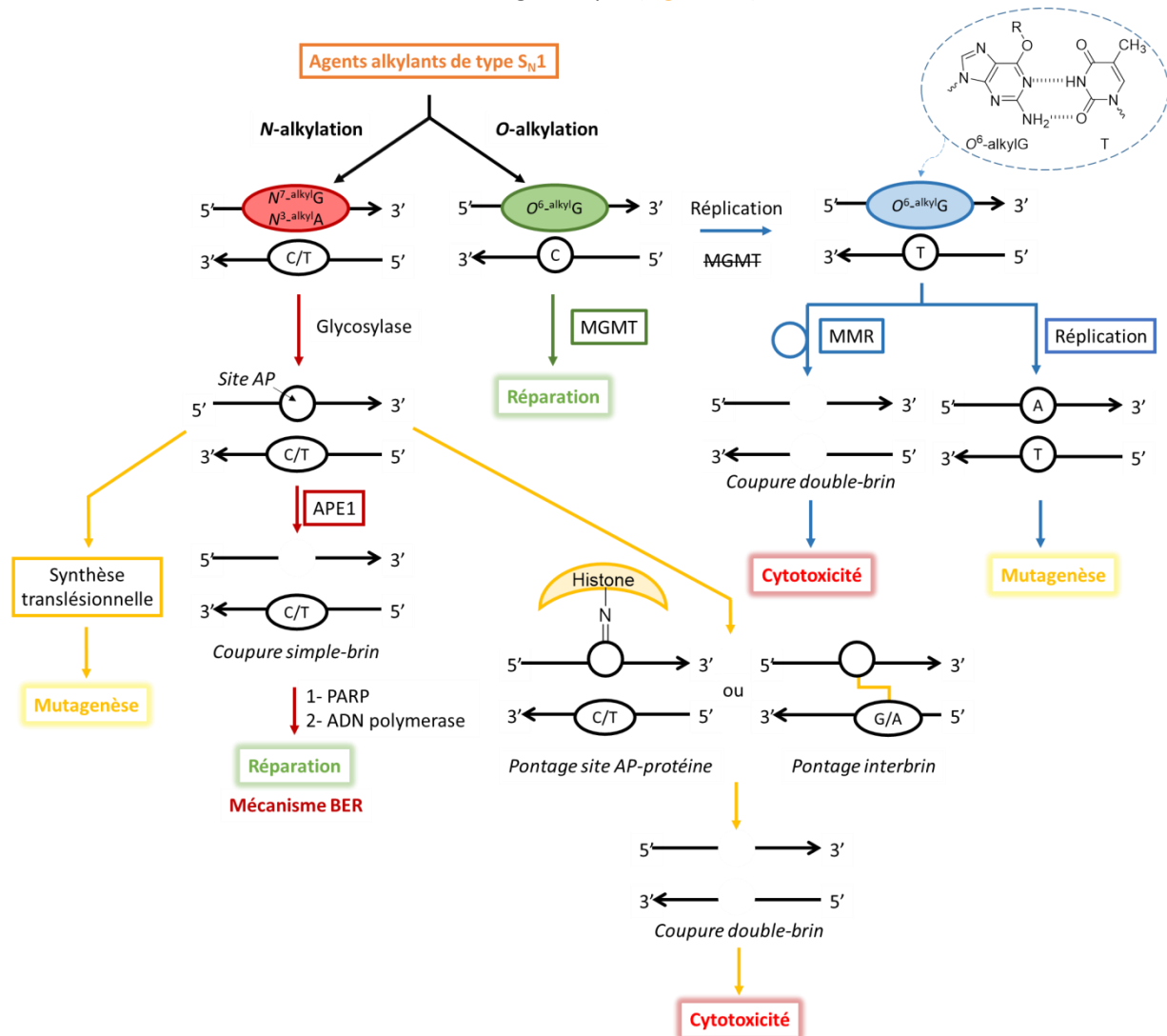


Figure 14- Schématisation des différents mécanismes mis en jeu suite à l'action des agents anticancéreux et leurs conséquences cellulaires.

Pour garantir l'intégrité de leur génome, les cellules ont développé un mécanisme de réparation directe de ce type de lésion.⁴⁷⁻⁵¹ En effet les bases O^6 -alkylguanines peuvent être détectées et ainsi prises en charge par une enzyme dite suicide la O^6 -méthylguanine méthyltransférase (MGMT ou AGT). Cette enzyme retire de façon directe le groupement alkyle présent sur la base lésée, en le transférant sur un résidu cystéine présent dans son site actif. La protéine S -alkylcystéine formée alors est inactive et ne peut pas être réactivée. Ce processus rétablit ainsi la base guanine, ce qui n'induit alors aucune cytotoxicité. La surexpression des MGMT au sein des cellules a été mise en évidence dans de nombreux cancers dont le cancer du côlon, des poumons mais aussi le glioblastome.⁵²⁻⁵⁴ Ce haut niveau d'expression a ainsi pu être mis en corrélation avec la résistance des cellules cancéreuses, notamment de glioblastome, aux agents alkylants tels que les nitrosouées ou le témozolomide.^{30,55-58} L'inhibition de la MGMT a donc trouvé un intérêt tout particulier dans le contexte de la lutte contre le cancer.⁵⁹ En effet, la suppression de l'expression de l'enzyme⁶⁰ ou sa désactivation par des petites molécules, notamment la O^6 -benzylguanine,⁶¹ a permis de montrer une forte sensibilisation des cellules à la cytotoxicité du témozolomide. Par conséquent, de nombreux laboratoires ont concentré leurs efforts dans le développement d'inhibiteurs de MGMT. Plus récemment, Luedtke et al. ont mis en valeur de façon innovante que l'inhibition de l'activité de l'enzyme induisant une augmentation de la cytotoxicité du témozolomide est possible en ciblant directement la base O^6 -méthylguanine, substrat de l'enzyme, avec des complexes métalliques de type porphyrine.⁶²

A l'exception du mécanisme de réparation directe par les enzymes MGMT, les dommages engendrés par les agents alkylants, c'est-à-dire principalement les bases N^7 -méthylguanines et N^3 -méthyladénines formées à hauteur de 70-80% et 10-15% respectivement, sont prises en charge par le système de réparation par excision de base (*Figure 14*).^{25,63} Comme déjà explicité (*Introduction- I-3*), le mécanisme BER est un processus multi-étape nécessitant l'intervention de diverses enzymes. La surexpression d'un certains nombres d'entre-elles a ainsi également été corrélée avec la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimio-thérapeutiques.

5- Le rôle de la voie de réparation BER et de l'enzyme APE1 dans le développement de la chimiorésistance

Bien que fortement représentées suite à l'action des agents alkylants, les lésions de type N -alkyle n'affichent pas une cytotoxicité importante, cependant suite à un processus de dépurination spontané, ces dernières conduisent à la formation de sites abasiques (*Figure 6*), lésions hautement cytotoxiques pour les cellules (*Figure 14*). En effet, dans le cas où la réplication de l'ADN est initiée malgré la présence du site abasique, processus nommé alors synthèse translésionnelle, celle-ci peut conduire alors à l'introduction de mutations. Mais également, il a été mis en évidence que ces derniers peuvent conduire à des coupures double-brins au sein de l'ADN suite à la formation de pontages site AP-protéine⁶⁴⁻⁶⁶ ou de pontages interbrins.^{67,68}

Les sites abasiques sont ainsi pris en charge par le système de réparation par excision de base. De ce fait l'activité des enzymes de la voie a fortement été mise en cause dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements chimio-thérapeutiques. En effet l'implication de la voie BER dans la résistance notamment au témozolomide, principal agent anticancéreux utilisé cliniquement, a pu être démontrée à plusieurs reprises.^{30,69} De plus de nombreuses études ont permis de mettre en

évidence que des cellules n'exprimant pas certaines enzymes indispensables au mécanisme de réparation présentaient une sensibilité accrue à l'action des agents alkylants. En effet, un déficit notamment des ADN glycosylases initiant le mécanisme de réparation,⁷⁰ des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) nécessaires au recrutement des enzymes de réparation⁷¹ mais aussi des ADN polymérases β permettant de resynthétiser le brin d'ADN⁷² conduit à l'apoptose des cellules à la suite du traitement de ces dernières avec un agent anticancéreux. Effectivement, alors que la coopération entre les différentes enzymes permet la régénération de l'ADN, les différents intermédiaires formés au cours de l'enchaînement des étapes de réparation dont les sites abasiques, les résidus de type 5'-déoxyribose ou encore les coupures simple-brins présentent une cytotoxicité souvent plus importante que la lésion initiale. Ainsi l'absence d'activité d'une enzyme de la voie faisant perdurer un intermédiaire cytotoxique entraîne la mort cellulaire.

De nombreuses études ont ainsi validé l'inhibition de l'activité des différentes enzymes des voies de réparation^{73,74} et plus particulièrement de la voie BER afin d'augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimio-thérapeutiques.⁷⁵⁻⁷⁸ Par conséquent ces dernières années, le développement d'inhibiteurs est devenu un enjeu stratégique et un grand nombre de laboratoires a notamment concentré ses efforts sur la synthèse d'inhibiteurs des PARP. Ces nouvelles molécules, évaluées majoritairement en combinaison avec le témozolomide, ont affiché des résultats très prometteurs en augmentant la cytotoxicité de cet agent d'intérêt clinique.⁷⁹⁻⁸³ Certains inhibiteurs de PARP sont ainsi actuellement évalués en phases cliniques I et II en thérapie combinatoire.^{74,84}

Durant ces deux dernières décennies des inhibiteurs de l'ADN polymérase β ont également été identifiés, appartenant à diverses familles de molécules telles que des polypeptides, des acides gras, des sulfolipides ou encore des dérivés de flavonoïdes.^{85,86} Cependant la grande majorité de ces inhibiteurs n'affiche qu'une faible activité d'inhibition, de l'ordre du micro-molaire, ou ne présente pas une spécificité suffisante pour devenir des potentiels candidats-médicaments. Plus récemment en 2017, les recherches effectuées en parallèle par les laboratoires de Greenberg⁸⁷ et Spratt⁸⁸ ont permis de mettre en valeur deux inhibiteurs d'ADN polymérase β beaucoup plus prometteurs améliorant la cytotoxicité du MMS et de la bléomycine respectivement.

Cependant à la fin des années 90, la responsabilité de l'endonucléase apurinique/aprimidinique 1 (APE1) dans la faible réponse aux traitements chimio-thérapeutiques ainsi que sa surexpression dans divers cancers tels que le cancer des poumons, du sein ou encore le glioblastome ont été démontrées par de nombreuses études.⁸⁹⁻⁹² En effet Silber et al. ont notamment montré que, bien que déjà fortement représentée au sein des cellules avec environ 10^5 à 10^6 molécules par cellules,⁹³ APE1 est environ dix fois plus abondante dans 43% des cas de glioblastome.⁹²

APE1 est une protéine α/β globulaire identifiée pour la première fois comme la principale endonucléase AP chez l'Homme par Demple et al. en 1991.⁹⁴ Cette enzyme, présentant une masse moléculaire d'environ 35 kDa, est constituée de 318 acides aminés. En remplissant la cavité formée par les sites abasiques avec les acides aminés de sa partie C-terminale, APE1 reconnaît ainsi ces derniers et intervient dans le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base dans le but de cliver les sites AP formés au cours du processus en hydrolysant la liaison phosphodiester en 5' de ces derniers. L'enzyme se lie ainsi aux sites abasiques après basculement de ces derniers dans le sillon de l'ADN (*Figure 15*).

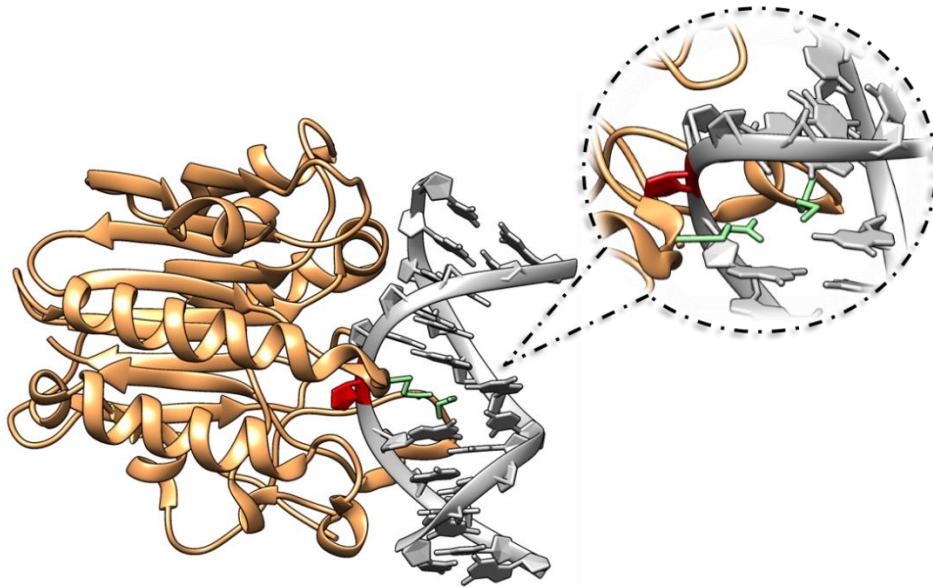


Figure 15- Fixation de l'enzyme APE1 (en orange) sur l'ADN duplexe (en gris) porteur d'un site abasique (en rouge). Insertion des acides aminés (en vert, arginine 177 et méthionine 270) dans la cavité formée par le site abasique. Donnée structurale obtenue à partir du fichier PDB 1DE8.⁹⁵

Le mécanisme réactionnel du clivage du site abasique par APE1 n'est toujours pas totalement élucidé à ce jour et trois mécanismes sont ainsi proposés (*Figure 16*). Son activité catalytique, dépendante de la présence d'ion Mg^{2+} , représente 95% de l'activité totale des endonucléases AP.^{93,96-98}

Introduction

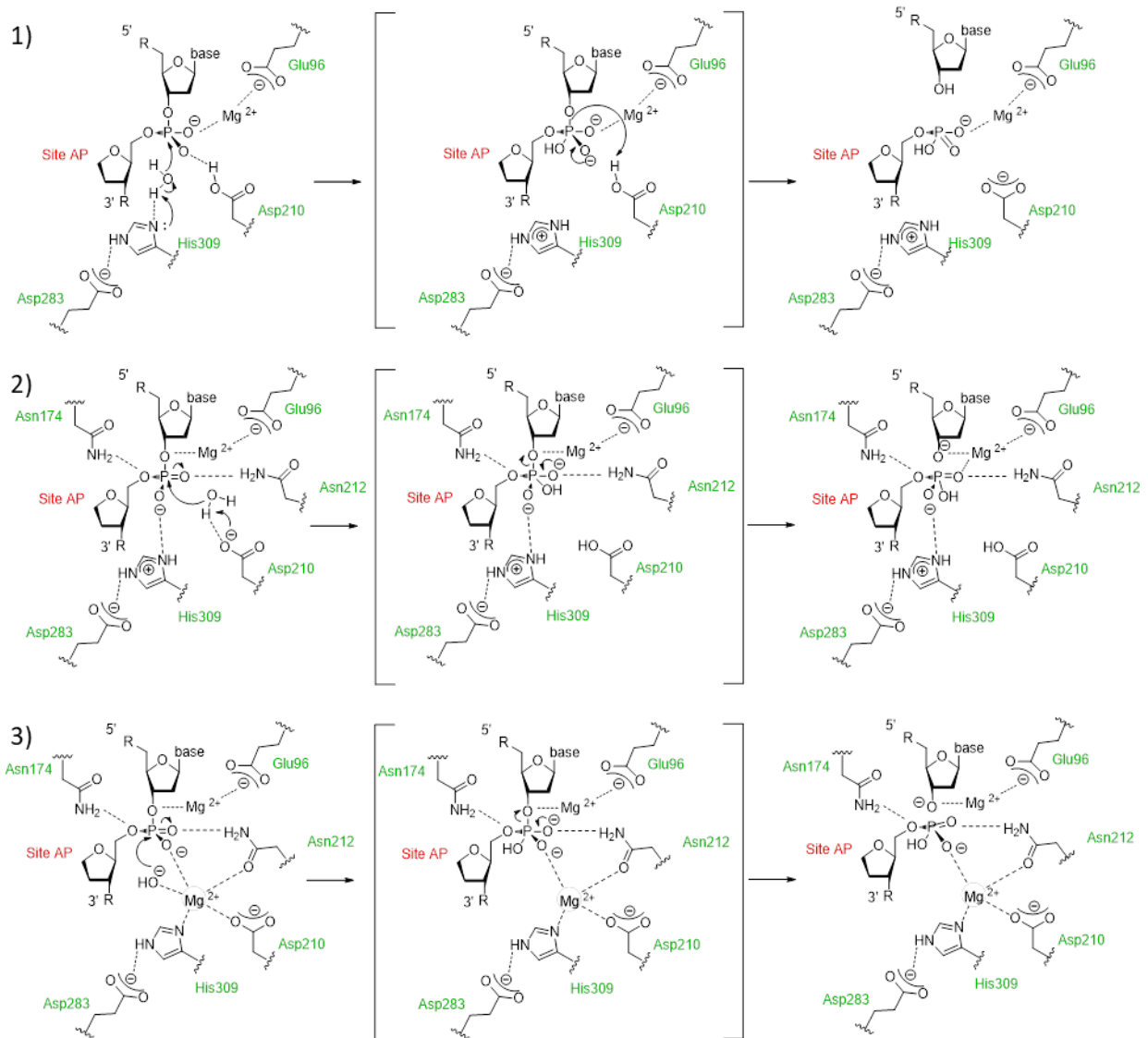


Figure 16- Mécanismes réactionnels proposés pour le clivage enzymatique du site abasique par APE1.⁹³

1) Mécanisme initié suite à l'abstraction d'un proton d'une molécule d'eau par l'acide aminé His309 générant un ion hydroxyde, Asp210 permet de stabiliser le groupe partant et Mg²⁺ assure la bonne orientation du groupement phosphate ; 2) Mécanisme initié suite à l'abstraction d'un proton d'une molécule d'eau par l'acide aminé Asp210, His309 assure la bonne orientation du groupement phosphate et Mg²⁺ stabilise le groupe partant ; 3) Mécanisme initié suite à la coordination d'un ion hydroxyle avec Mg²⁺ permettant l'attaque nucléophile sur le groupement phosphate. La présence d'un deuxième cation Mg²⁺ permet de stabiliser le groupe partant.

En plus de son implication dans le mécanisme BER, APE1 est une protéine multifonctionnelle qui participe également à différents processus cellulaires tels que la réponse au stress oxydatif mais aussi la régulation des facteurs de transcription en mettant en jeu les acides aminés de son domaine N-terminal. En effet APE1 joue également le rôle de régulateur réduction-oxydation (redox). L'enzyme permet ainsi d'assurer la liaison des facteurs de transcription à l'ADN, dont le facteur p53, en maintenant les protéines dans leur état actif c'est-à-dire sous leur forme réduite.⁹⁷ De ce fait, la surexpression d'APE1 a été mise en cause dans l'augmentation du niveau du facteur de transcription p53 notamment impliqué également dans la résistance à la chimiothérapie.

APE1 affiche ainsi deux fonctions principales totalement indépendantes et est donc devenue un objet d'étude préférentiel. Ainsi dès les années 1994 les premiers résultats mettant en évidence que des cellules déficitaires en APE1 affichent une sensibilité accrue à différents agents alkylants sont publiés. En effet, en parallèle les laboratoires d'Olkowki et de Seki utilisent la technologie basée sur la transfection d'ADN antisens au sein des cellules afin d'inhiber la synthèse de l'enzyme. Les recherches démontrent alors que la réduction de l'expression d'APE1 dans des lignées de cellules de mammifère et de glioblastome respectivement est concomitante avec l'augmentation de la sensibilité au MMS.^{99,100}

Suite à ces premières observations d'autres études basées elles aussi sur la méthodologie de l'ADN antisens mais également sur l'utilisation de siARN ont été menées. Les conclusions ont permis de nouveau de valider que l'inhibition de l'expression d'APE1 au sein de cellules cancéreuses, notamment de poumon (A549) et de glioblastome (SNB19 et T98G), permet de sensibiliser les cellules aux agents alkylants tels que le témozolomide, le MMS, la BCNU mais aussi le peroxyde d'hydrogène, le cisplatine et les radiations ionisantes.¹⁰¹⁻¹⁰⁴ Ces constatations ont ainsi révélé le fort intérêt thérapeutique de l'inhibition d'APE1 dans une stratégie chimio-thérapeutique.

Cependant bien qu'établissant la preuve directe de l'implication d'APE1 dans la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques, les différentes technologies utilisées alors ne permettent pas d'identifier l'activité d'APE1 responsable de la résistance thérapeutique. Des études complémentaires ont ainsi été menées et les résultats des recherches ainsi effectuées par McNeill et Wilson III ont permis de mettre en évidence l'implication de la fonction endonucléase d'APE1 dans la résistance aux agents endommageant l'ADN.¹⁰⁵

En parallèle, les recherches menées par le laboratoire de Luo conduisent à l'identification d'une molécule : la lucanthone comme inhibiteur des endonucléases AP. Une étude plus approfondie a permis de révéler une augmentation de la cytotoxicité du MMS et du TMZ suite à un co-traitement des cellules avec cet inhibiteur.¹⁰⁶ Cependant la lucanthone est connue à l'origine pour inhiber l'activité des topoisomérases II^{107,108} ainsi la diminution de la prolifération cellulaire ne peut être attribuée sans incertitude à une inhibition totalement spécifique d'APE1.

Néanmoins en servant de preuve de concept, ces résultats ouvrent alors la porte à l'utilisation combinée d'inhibiteurs de l'activité endonucléase d'APE1 et d'agents endommageant l'ADN afin de surmonter la résistance aux traitements chimio-thérapeutiques. APE1 est ainsi devenue une cible privilégiée ces dernières années¹⁰⁹ et de nombreux laboratoires ont concentré leurs efforts sur le développement de petites molécules inhibitrices. Deux stratégies se distinguent alors, l'inhibition directe d'APE1 en ciblant le site actif de l'enzyme mais également l'inhibition indirecte de l'activité enzymatique en développant des molécules capables d'interagir avec le substrat d'APE1, à l'image de la méthoxyamine ayant la capacité de se lier aux sites abasiques de façon covalente.

6- Les inhibiteurs directs de l'enzyme APE1

a- Inhibiteurs identifiés suite à un criblage basé sur le suivi du clivage du site AP par APE1 par fluorescence (HTS)

Le premier inhibiteur direct de l'activité de clivage d'APE1 a été identifié en 2005 par Madhusudan et al. suite à un criblage effectué sur 5000 potentiels candidats-médicaments.¹¹⁰ Afin de permettre une pré-évaluation rapide de ce grand nombre de composés, les auteurs développent une méthode *in vitro* basée sur le suivi de l'évolution de la fluorescence en temps réel liée au clivage du site abasique par l'enzyme, nommée *fluorescence-based high-throughput screen* (HTS). L'étude ainsi réalisée permet de montrer dans un premier temps que le composé **CRT0044876**, acide 7-nitroindole-2-carboxylique, (*Figure 17*) est capable d'inhiber *in vitro* APE1 à faible concentration ($IC_{50} = 3,06 \mu M$) en interagissant avec le site actif de l'enzyme. De plus, l'augmentation du nombre de sites abasiques *in cellulo* et la diminution de la prolifération cellulaire ont pu être mises en valeur suite à l'incubation combinée du composé à des concentrations subtoxiques avec le MMS mais aussi avec le TMZ. Au cours des études complémentaires réalisées le composé CRT0044876 apparaît alors comme un inhibiteur spécifique de la voie de réparation BER. En effet, les auteurs démontrent que le composé ne permet pas d'améliorer la cytotoxicité d'agents induisant des dommages non pris en charge par la voie BER, dont notamment les rayons ultra-violet ou encore les moutardes azotées. Cependant les résultats obtenus lors de cette étude n'ont pu être dupliqués par d'autres laboratoires pour des raisons non identifiées, ce qui engendre des questionnements sur la réelle capacité d'inhibition du composé CRT0044876.^{111,112}

En permettant l'identification et la validation rapide de potentiels inhibiteurs d'APE1, la méthode HTS développée par Madhusudan et al. devient alors une méthode *in vitro* générale utilisée à plusieurs reprises par d'autres laboratoires dans le but de cribler un grand nombre de composés. Ainsi en utilisant une technique très similaire, Stivers et al. ont concentré leurs efforts dans le but d'identifier de nouveaux composés possédant une capacité d'inhibition de l'activité de clivage d'APE1 de l'ordre du nanomolaire.¹¹³ Le criblage de 2000 molécules issues de l'Institut National du Cancer (NCI) a ainsi permis de mettre en valeur le fort potentiel *in vitro* des molécules de type acide arylstibonique. L'étude plus approfondie des deux meilleurs composés (*Figure 17*, **13755** et **13793**) a ainsi permis de révéler leur potentielle interaction directe avec l'enzyme ainsi qu'avec le complexe enzyme-substrat. Cependant malgré la très bonne inhibition d'APE1 affichée par les deux molécules *in vitro* ($IC_{50} = 4$ et 17 nM), aucune amélioration de la cytotoxicité du MMS n'a été observée *in cellulo*. Cette constatation laisse alors supposer un manque de perméabilité des cellules à ce type de structure mais elle ouvre cependant la voie à l'optimisation de la structure des molécules de type acide arylstibonique dans le but de cibler APE1.

Les recherches effectuées par Simeonov et al., inspirées de celles de ses prédécesseurs, ont également permis d'identifier au sein d'une large librairie plusieurs inhibiteurs potentiels d'APE1 c'est-à-dire la **6-hydroxy-DL-DOPA** (L-DOPA), la **myricétine** et le colorant « **Reactive Blue 2** » (*Figure 17*).¹¹⁴ L'augmentation du nombre de sites abasiques et de la cytotoxicité du MMS par ces composés a ainsi pu être démontrée sur des cellules HeLa. Cependant bien qu'affichant des IC_{50} très prometteuses *in vitro*, ces composés sont connus pour interagir également avec d'autres cibles biologiques^{115,116} comme discuté par les auteurs, de ce fait les résultats biologiques obtenus ne

peuvent être attribués avec certitude à l'inhibition sélective de l'enzyme APE1. Au cours de leur étude, les auteurs mettent également en valeur le potentiel inhibiteur de l'acide aurintricarboxylique (**ATA**). Cependant ce ligand est décrit dans la littérature pour former en solution un polymère anionique qui constitue alors un leurre pour les enzymes interagissant avec l'ADN (*Figure 18*).¹¹⁷⁻¹¹⁹ Ainsi l'inhibition observée par ATA fait suite à une interaction directe mais non spécifique avec l'enzyme APE1.

S'appuyant sur le test fluorimétrique déjà bien établi, Dorjsuren et al. mettent en place un criblage en plaque à plus haut débit (qHST) leur permettant de tester à sept concentrations différentes une très large bibliothèque de molécules bioactives connues.¹²⁰ Après réévaluation du potentiel des molécules prometteuses vis-à-vis d'APE1 ainsi identifiées, les études menées alors permettent de mettre en évidence la capacité d'un certain nombre de composés à améliorer la cytotoxicité du MMS concomitante avec une augmentation du nombre de sites abasiques. Ce nouveau criblage fournit ainsi un panel de molécules présentant une grande variété structurale venant compléter les structures types des potentiels inhibiteurs directs d'APE1. Parmi ces nouvelles structures le fort potentiel de dérivés de type flavonoïde (**MLS000737267**), phénanthrène (**MLS000863573**) ou encore isoxazole-alkylamine (**MLS001105846**) a ainsi été mis en valeur (*Figure 17*). Cependant bien qu'inhibant *in vitro* l'enzyme APE1 purifiée, un grand nombre de ces molécules ou de dérivés a été reporté par les auteurs pour interagir avec de nombreuses protéines. Ainsi une forte optimisation des structures est nécessaire afin d'aboutir à des inhibiteurs sélectifs.

Suite à cette première évaluation, les auteurs ont concentré leurs efforts sur la relation structure-activité du composé **MLS000419194** en synthétisant un panel de dérivés.¹²¹ La capacité de ces nouvelles molécules à inhiber l'enzyme APE1 purifiée mais également au sein d'extraits de cellules HeLa a été évaluée, permettant ainsi de mettre en valeur deux composés, dont le « hit » initial (*Figure 17*, **121.3** et **121.52**), affichant une forte activité d'inhibition ($IC_{50} = 2,0 \mu M$ et $3,3 \mu M$ respectivement). La détermination des différents paramètres cinétiques du clivage enzymatique (k_{cat} , K_M) en présence des composés permet alors aux auteurs de formuler l'hypothèse d'une interaction directe des molécules avec l'enzyme APE1. De plus, la diminution de la formation du complexe APE1-ADN en présence des composés laisse supposer que ces petites molécules agissent comme inhibiteurs compétitifs en se liant sur le même site que l'ADN. Après ces premières évaluations *in vitro*, le potentiel cytotoxique de ces molécules prometteuses a été évalué. Suite à un co-traitement des cellules avec le MMS, les résultats affichés indiquent ainsi que la présence de ces nouvelles molécules engendre une accumulation des sites abasiques au sein de l'ADN, en augmentant leur nombre d'un facteur trois environ. De plus les auteurs démontrent que l'effet cytotoxique des agents alkylants MMS et TMZ est exacerbé en présence des composés *in cellulo*. Suite à ces résultats encourageants, l'évaluation des propriétés pharmaceutiques de ces deux molécules a été réalisée chez les souris. Ainsi bien que le composé **121.3**, nommé par la suite « APE1 inhibiteur III », pénètre plus aisément la barrière hémato-encéphalique (BBB), l'analogue **121.52** présente un meilleur profil cytotoxique en ne démontrant pas d'effets secondaires à 24 heures. De plus il affiche un temps de demi-vie dans le plasma plus favorable. Ces résultats très prometteurs font alors du composé **121.52** un inhibiteur de choix pour les auteurs.

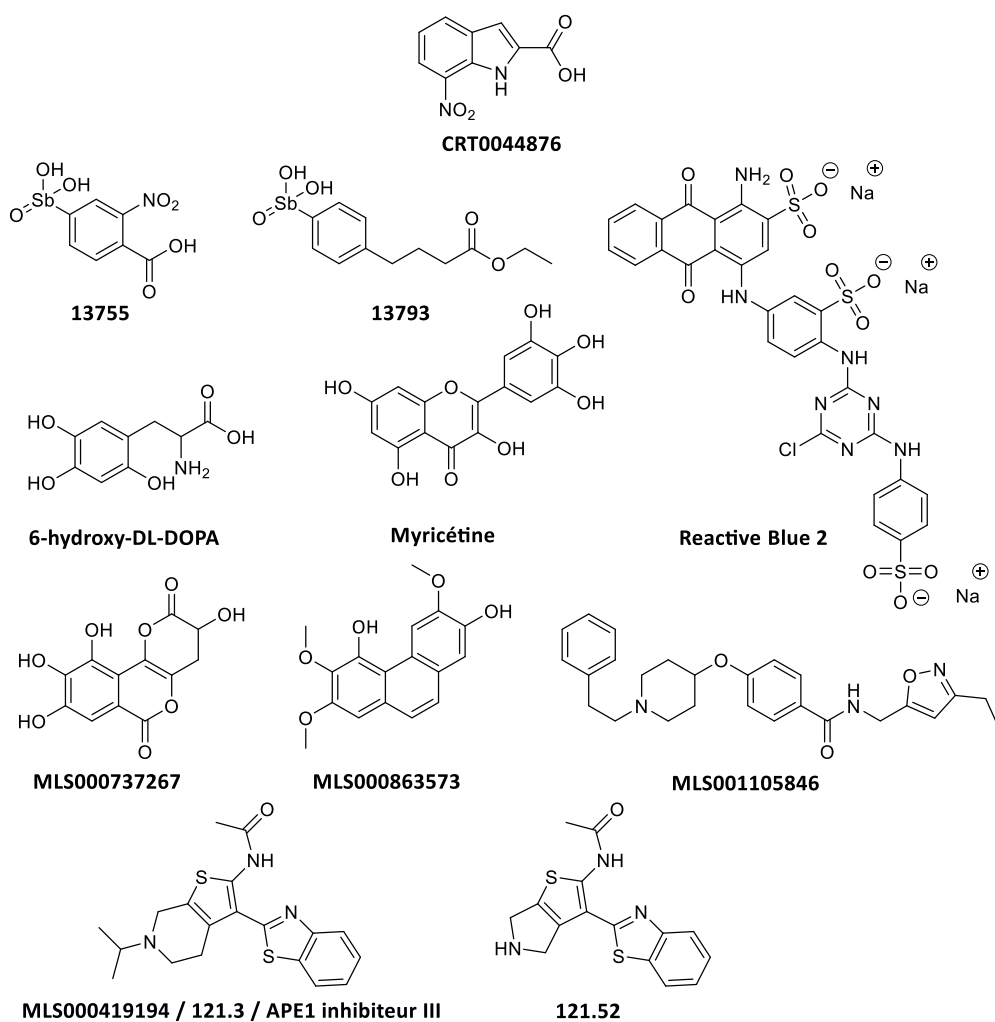


Figure 17- Inhibiteurs d'APE1 identifiés par criblages fluorimétriques.

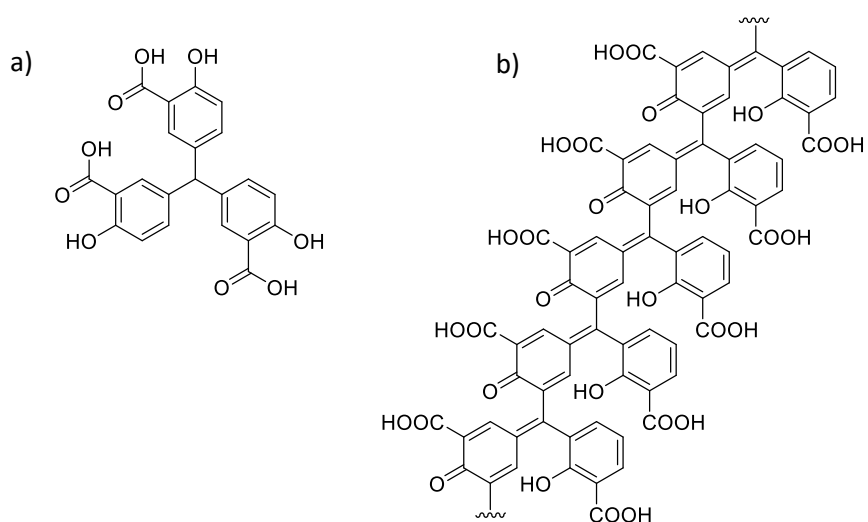


Figure 18- a) Structure du monomère d'acide aurintricarboxylique (ATA) ; b) Structure d'un polymère d'ATA formé en solution aqueuse.

b- Inhibiteurs identifiés par criblage virtuel

Face à la difficulté d'identifier de forts inhibiteurs sélectifs d'APE1, en 2009 Zawahir et al. adoptent une approche différente et tentent ainsi de rationaliser la structure de potentiels inhibiteurs.¹²² Ils développent ainsi un modèle 3D de pharmacophores basé sur l'interaction d'APE1 avec les sites abasiques visualisée suite à la détermination de la structure co-cristallisée de l'enzyme avec son substrat. Le criblage virtuel de 365 000 molécules permet alors l'identification de composés affichant potentiellement une très bonne interaction avec les acides aminés du site actif de l'enzyme. Après sélection, les IC₅₀ des molécules les plus prometteuses ont été évaluées dans un second temps *in vitro*. La rationalisation de la structure des meilleurs inhibiteurs, c'est-à-dire présentant une IC₅₀ inférieure à 10 µM, met alors en avant la nécessité de la présence de deux groupements anioniques sur un corps hydrophobique afin d'interagir au mieux avec l'enzyme. Fort du modèle pharmacophore établi une banque de molécules dérivées de 3-carbamoylbenzyle a été synthétisée par le laboratoire.¹²³ Suite à l'étude structure-activité *in vitro* de ces nouveaux composés, les molécules de type acide 3-benzylcarbamoyl-2-methoxybenzoïque ont présenté l'inhibition la plus forte et la plus sélective de l'enzyme APE1 avec des IC₅₀ inférieures à 20 µM (**Figure 19, F326, F327, F329, F330**). De plus, bien que ne présentant pas *in vitro* la meilleure IC₅₀ (supérieure à 100 µM), un dérivé de type fluoré (**F332D**) a cependant démontré la capacité à augmenter la cytotoxicité du MMS sur la lignée de cellules cancéreuses de colon H630. Les différentes conclusions de cette étude ouvrent ainsi la voie à la synthèse de nouveaux dérivés afin d'optimiser l'activité de tels composés *in vitro* mais aussi *in cellulo*.

D'autres squelettes moléculaires pouvant potentiellement avoir un intérêt dans la recherche d'inhibiteurs directs d'APE1 ont également été découverts à l'aide de criblages virtuels. Des structures de type 2-méthyl-4-amino-6,7-dioxolo[4,5-g]quinoline (**Figure 19, 124.1 et 124.4**) démontrant une activité inhibitrice *in vitro* de l'ordre du nanomolaire ont ainsi été mises en avant par Srinivasan et al.¹²⁴ Bien qu'une faible intercalation avec l'ADN ait été observée, les résultats des études biophysiques laissent supposer une interaction principalement directe entre l'inhibiteur et le site actif de la protéine. Cette hypothèse a pu être validée dans un second temps par les auteurs suite à une étude plus détaillée par simulation informatique de l'interaction entre l'inhibiteur et les acides aminés de la poche de l'enzyme.¹²⁵ Les études *in cellulo* effectuées ensuite sur la lignée de glioblastome (T98G) ont permis de montrer que de telles molécules exacerbent la toxicité des agents alkylants et favorisent l'accumulation des sites abasiques au sein des cellules en fonction du temps, corrélant avec une inhibition de l'activité d'APE1. Cependant les auteurs ont également mis en valeur un effet synergique de ces composés avec d'autres agents anticancéreux n'endommageant pas directement l'ADN, notamment la vemurafenib (inhibiteur de la protéine kinase BRAF), sans pouvoir cependant apporter d'explication.¹²⁵ Ce fait peut laisser supposer d'un manque de sélectivité des composés *in vivo*.

En utilisant une stratégie similaire, le criblage virtuel effectué par Ruiz et al. sur plus de 4 millions de composés a permis l'identification de quinze nouveaux candidats.¹²⁶ Parmi ces potentiels inhibiteurs d'APE1, six composés se sont révélés très intéressants (**Figure 19, 126.1, 126.2, 126.3, 126.4, 126.5, 126.6**), en affichant des IC₅₀ *in vitro* de l'ordre du micromolaire mais également en augmentant la cytotoxicité du MMS *in cellulo*. L'étude mécanistique de l'interaction de ces composés, basée sur le déplacement d'une sonde fluorescente intercalante (bromure d'éthidium), a permis de démontrer

l'absence d'interaction avec l'ADN, complétant ainsi le panel des modèles moléculaires à fort potentiel d'inhibition direct d'APE1.

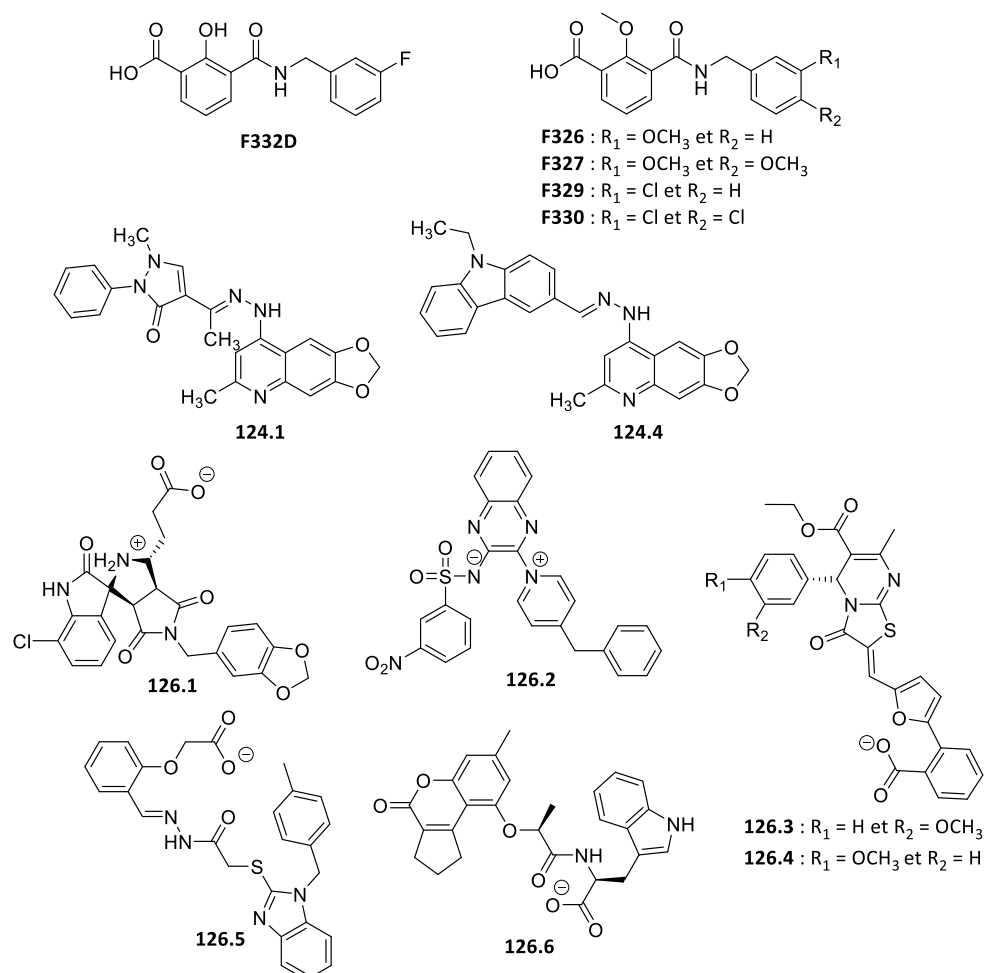


Figure 19- Inhibiteurs d'APE1 identifiés par criblages virtuels.

Beaucoup plus récemment, deux nouveaux criblages virtuels basés également sur l'interaction des ligands avec le site actif ont été réalisés. Les résultats obtenus *in silico* par Guerreiro et al. en 2016 permettent dans un premier temps l'identification d'une cinquantaine de composés présentant une structure optimale pour interagir avec la poche de l'enzyme.¹²⁷ Suite à l'étude *in vitro* de trente d'entre eux, trois sels de disodium se sont alors démarqués en affichant de bonnes IC₅₀, le composé **127.22** avec une IC₅₀ de 0,25 µM et les composés **127.37** et **127.41** avec des IC₅₀ de 7,76 et 8,85 µM respectivement (Figure 20). La structure de ces molécules, en accord avec le modèle 3D du pharmacophore établi par Zawahir, présente notamment deux groupements anioniques de type sulfonate. Ces composés représentent ainsi les premiers exemples d'inhibiteurs directs d'APE1 de ce type. Cependant, aucune étude de toxicité sur des cellules cancéreuses n'a été envisagée par les auteurs.

Au début de cette année 2019, le laboratoire de Georgiadis s'est intéressé pour la première fois à des structures de type macrocyclique comme potentiel ligand de la poche enzymatique d'APE1.¹²⁸ Le criblage virtuel effectué sur une soixantaine de macrocycles ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'inhibition de l'activité d'APE1 par les meilleurs composés ont permis d'identifier quatre structures

macrocycliques de type lactone. Après dérivation de ces dernières et une étude de la relation structure-activité de ces nouveaux composés, trois macrocycles ont affiché une activité cellulaire intéressante (**Figure 20**, **128.13**, **128.21** et **128.24**). En effet suite à une étude *in cellulo*, les auteurs mettent en avant une diminution des dommages à l'ADN, suggérant ainsi l'inhibition du clivage enzymatique par APE1. Cependant aucune évaluation de la toxicité de ces molécules en combinaison avec des agents alkylants n'a été effectuée.

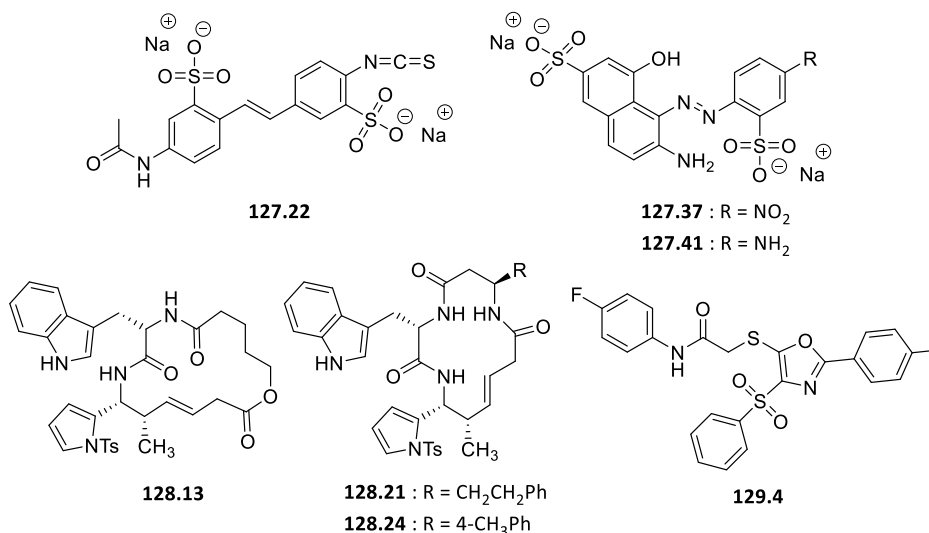


Figure 20- Nouveaux squelettes moléculaires identifiés comme potentiels inhibiteurs directs d'APE1.

En parallèle à ces différents criblages virtuels et fluorimétriques, en 2011 Mohammed et al. ont adopté une démarche différente afin de permettre l'identification d'inhibiteur d'APE1 dans le but de lutter contre le mélanome et le glioblastome notamment, en délaissant l'étude de la structure du site actif de l'enzyme.¹²⁹ En effet en s'aidant de la structure du premier inhibiteur connu d'APE1, CRT0044876, ils réalisent une étude virtuelle basée en premier lieu sur la ressemblance structurelle (« *Similarity screen* »). Cette étude conduit alors dans un premier temps à l'identification de trois modèles moléculaires s'insérant parfaitement dans le site actif de l'enzyme (**Figure 21**, M1, M2, M3).

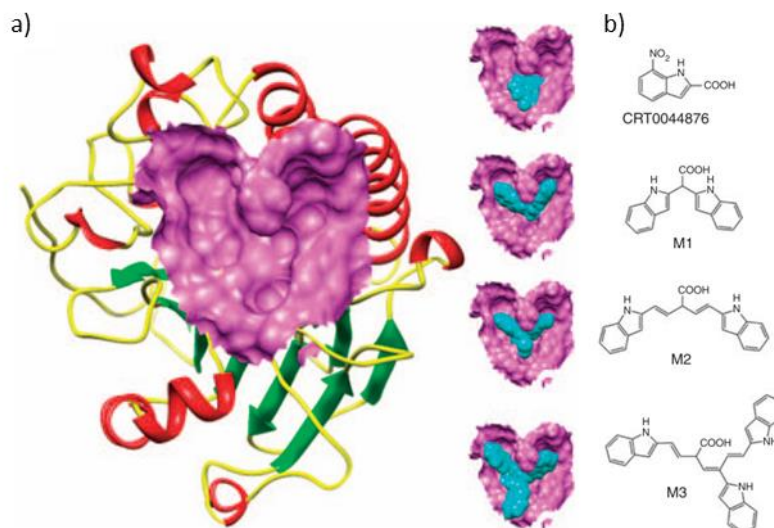


Figure 21- Modélisation moléculaire a) du site actif d'APE1 impliqué dans la réparation de l'ADN ; b) Structure chimique et placement supposé dans le site actif de l'enzyme de CRT0044876 et des modèles moléculaires (M1, M2, M3). Image reproduite avec permission à partir de la publication de Mohammed et al.¹²⁹ © 2011, Springer Nature.

Le criblage virtuel d'une banque de candidats-médicaments permet alors dans un second temps l'identification de molécules structurellement proches des modèles moléculaires. Après évaluation de l'inhibition de l'activité enzymatique des hits *in vitro*, l'étude a permis l'identification de sept potentiels inhibiteurs présentant des IC_{50} entre 2 et 25 μ M. L'étude plus approfondie sur des lignées cellulaires de mélanome et de glioblastome a alors permis de mettre en avant un composé (**Figure 20, 129.4**). En effet, l'accumulation des sites abasiques a pu être démontrée *in vivo* suite à l'exposition des cellules à cet inhibiteur, preuve de la cible biologique du composé. De plus tout en affichant une faible cytotoxicité sur les cellules endothéliales HUVEC notamment, il démontre une bonne capacité à diminuer la prolifération des cellules en combinaison avec le MMS et le TMZ.

c- Inhibiteurs dérivés de la lucanthone et AR03

Dans le but d'augmenter la variété structurale de potentiels inhibiteurs du clivage enzymatique d'APE1, Naidu et al. approfondissent en 2012 l'interaction entre la **lucanthone** et ces dérivés de type **hycanthone** avec APE1 (**Figure 22**).¹³⁰ Ces molécules sont bien connues depuis les années 1980 pour différentes propriétés telles que l'intercalation avec l'ADN, l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques ou encore l'inhibition d'enzymes comme les topoisomérases mais aussi APE1, mettant en avant leur très faible sélectivité. En approfondissant le mécanisme inhibiteur de ces composés sur l'activité d'APE1, les auteurs ambitionnent ainsi de mettre en avant l'intérêt de développer des molécules adoptant un tel squelette. Bien que l'effet observé par la lucanthone soit attribué dans un premier temps à un équilibre entre une interaction directe avec l'enzyme mais aussi avec son substrat l'ADN, les résultats démontrent que la capacité d'APE1 à se lier à l'ADN n'est que très peu altérée par la présence de la lucanthone. De ce fait les auteurs suggèrent que l'activité inhibitrice observée serait liée à une interaction principalement directe avec l'enzyme, faisant de la lucanthone un modèle moléculaire intéressant dans le développement d'inhibiteurs d'APE1.

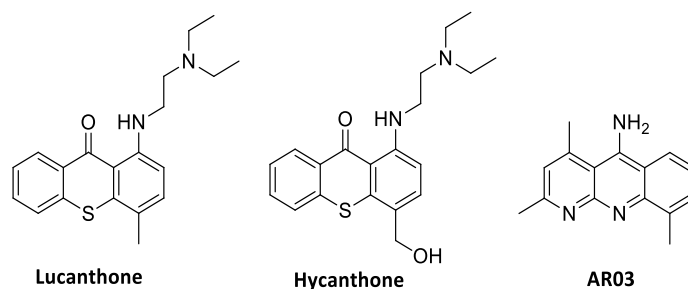


Figure 22- Structure de la lucanthone, hycanthone et du composé AR03.

A ce jour l'inhibiteur d'APE1 le plus prometteur en présentant une IC_{50} de 2 μ M est nommé **AR03** (Figure 22). Il a été identifié par Bapat et al. en 2010 lors d'un criblage HTS.¹³¹ Les études cellulaires effectuées ont permis de montrer une réduction de la prolifération des cellules de glioblastome (SF767) suite au traitement avec AR03 à une concentration de l'ordre du micromolaire mais aussi l'augmentation de la cytotoxicité des agents alkylants MMS et TMZ. De plus l'augmentation de la durée de vie des sites abasiques formés suite à l'action du MMS a été mise en valeur suite à un co-traitement des cellules avec l'agent alkylant et le composé AR03, résultats ainsi en faveur d'une inhibition de la réparation de l'ADN par le composé. Afin de valider le mode d'action de la molécule, les auteurs réalisent alors des expériences complémentaires sur l'enzyme APE1 purifiée mais également avec des extraits cellulaires et démontrent ainsi une inhibition sélective de l'activité endonucléase d'APE1 par AR03. De plus afin d'exclure l'hypothèse d'une interaction d'AR03 avec l'ADN duplexe, une étude basée sur le déplacement d'une sonde fluorescente (FID) est dans un second temps également réalisée. Pour cela, les auteurs évaluent la capacité d'AR03 à déplacer le bromure d'éthidium. Les données montrent alors un déplacement de 13% du bromure d'éthidium par AR03. Suite à ces résultats, les auteurs affirment alors le manque d'affinité du composé AR03 pour l'ADN. Cependant, il est intéressant de noter que les recherches menées par le laboratoire de Laiho ont mis en évidence la capacité d'AR03 à activer l'expression de la protéine p53 suite à l'intercalation du composé au sein de l'ADN.¹³² De plus, indépendamment de ces résultats, l'inhibition de la transcription de l'ARN polymérase I par AR03 a également été mise en valeur.¹³³ Ces études soulèvent donc des questionnements sur la réelle capacité d'AR03 à interagir directement et de façon spécifique avec APE1.

Pour conclure, deux grandes méthodes de criblage se détachent dans le but de permettre une pré-évaluation rapide de potentiels inhibiteurs directs d'APE1 : un criblage basé sur l'étude de la fluorescence et les criblages virtuels. Mais dans un contexte où la découverte rapide de nouveaux candidats-médicaments est devenue un enjeu crucial, les techniques de criblages virtuels prennent une place de plus en plus importante dans la pré-sélection de composés. Deux stratégies se distinguent alors, la première est basée sur l'étude des interactions possibles avec les acides aminés constituant le site actif de l'enzyme mais elle nécessite cependant des données cristallographiques 3D de la structure de la poche de l'enzyme. La deuxième se concentre sur la structure d'inhibiteurs déjà identifiés. Ces techniques appliquées à la découverte d'inhibiteurs directs de l'enzyme APE1 ont permis de mettre en valeur le potentiel de différents squelettes moléculaires. Cependant un manque d'études approfondies est généralement à déplorer afin de valider l'activité de ces composés *in vivo*. De plus, bien qu'un grand nombre de modèles moléculaires ait été mis en valeur, un effort d'optimisation est nécessaire afin d'améliorer notamment la sélectivité pour l'enzyme cible.

Enfin, il est intéressant de noter que quelques inhibiteurs spécifiques à l'activité enzymatique redox d'APE1 ont également été développés^{134,135} mais ils ne seront pas détaillés dans cette partie.

Devant la difficulté de développer de forts inhibiteurs directs spécifiques à l'activité endonucléase d'APE1, une deuxième stratégie prend une place de plus en plus importante. En effet l'inhibition indirecte de l'activité enzymatique en ciblant son substrat c'est-à-dire les sites abasiques, apparait alors comme une stratégie prometteuse dans le but de bloquer la réparation de l'ADN par la voie BER.

II- Inhibition de la voie de réparation BER en ciblant l'ADN

1- Interaction des ligands avec l'ADN

Outre la formation de liaisons covalentes avec les bases de l'ADN, trois modes principaux d'interaction de petites molécules avec l'ADN double hélice sont référencés : l'intercalation entre les bases, le placement dans un sillon de l'ADN ou l'insertion au sein de l'ADN (Figure 23). Ces différents modes d'interaction non covalents sont permis par une stabilisation thermodynamiquement favorable due à la formation de liaisons électrostatiques, de liaisons hydrogènes, d'interactions hydrophobiques ou encore par π -stacking.^{136,137}

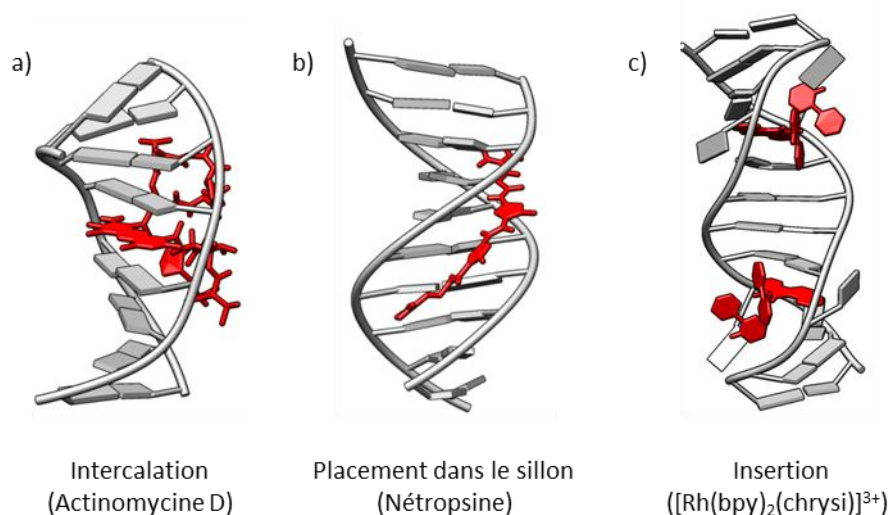


Figure 23- Schématisation des trois principaux modes d'interaction non covalents entre un ligand (en rouge) et l'ADN. Données structurales obtenues à partir des fichiers PDB a) 316D ; b) 2LWH ; c) 3GSK.

Le premier modèle de l'intercalation de petites molécules au sein de l'ADN a été proposé par Leonard Lerman au début des années 1960.¹³⁸ Ses travaux le conduisent à postuler l'hypothèse que des structures planaires de type polycyclique aromatique peuvent s'insérer entre les paires de bases adjacentes de l'ADN, en se basant sur l'étude des aminoacridines et de la proflavine. Validée à la suite de nombreuses reprises, la présence d'un système plan de noyaux aromatiques (≥ 3 , typiquement), classiquement cationique, permet au composé de s'insérer perpendiculairement à l'axe de l'hélice de l'ADN induisant cependant une distorsion ainsi qu'une élongation de l'hélice. La formation de ce complexe ADN-ligand est favorisée par des interactions de π -stacking avec les bases de l'ADN, sans impliquer nécessairement la formation de liaisons hydrogènes. Les exemples classiques d'intercalants non spécifiques de l'ADN sont le **bromure d'éthidium** et les dérivés d'acridine dont le **9-aminoacridine** mais il est intéressant de relever que des bis-intercalants ont également été décrits, par exemple le **ditercalinium** (Figure 24).¹³⁹ Ces derniers présentent très souvent une meilleure affinité pour l'ADN, de ce fait leur cinétique de dissociation avec l'ADN est très généralement plus lente, ce qui peut être de fort intérêt dans le cadre de développement thérapeutique.

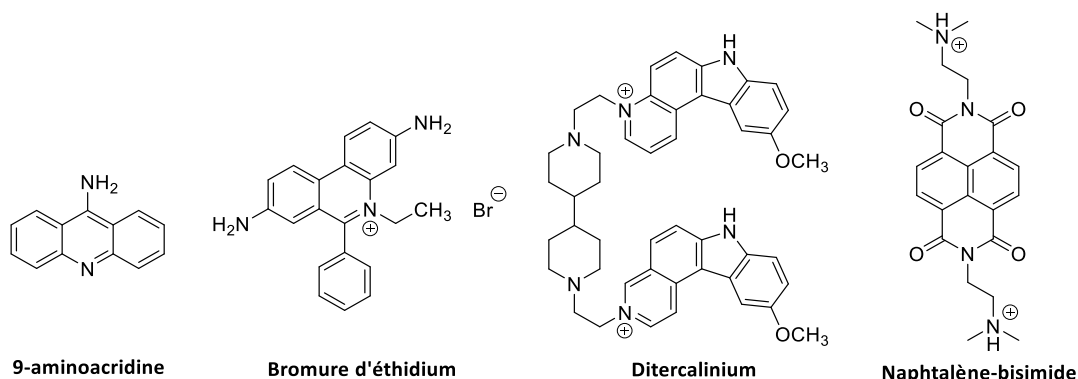


Figure 24- Exemples d'intercalant de l'ADN.

Le placement de ligand dans un sillon de l'ADN est lui favorisé par des interactions électrostatiques et/ou des liaisons hydrogènes du composé avec différents groupements réactifs présents en périphérie des bases de l'ADN. Ces composés, dont les polyamines constituent une grande famille, présentent très généralement une structure « en croissant ». A pH physiologique, ces dernières affichent des groupements cationiques qui vont alors interagir avec les groupements anioniques présents sur les bases et les groupements phosphates localisés dans les sillons de l'ADN. Bien que les intercalants simples de l'ADN souffrent très généralement d'une manque de spécificité, les ligands des sillons de l'ADN se localisent eux le plus généralement dans des zones riches en paires de bases de type adénine-thymine, conséquence du potentiel électrostatique négatif plus important de ces dernières par comparaison aux zones présentant des paires de bases de type guanine-cytosine. Cependant cette spécificité reste trop faible ainsi ce mode d'interaction seul n'est pas privilégié dans le développement de ligands à visée thérapeutique.

Mais certains ligands peuvent allier ces deux modes de fixation avec l'ADN, conduisant ainsi à une interaction appelée « *threading binding* ». En effet des composés comme les naphthalène-bisimides (*Figure 24*), sont constitués d'un système aromatique plan, s'intercalant au niveau des bases de l'ADN, substitué par des chaînes alkyles présentant des groupements favorisant les interactions électrostatiques dans les sillons de l'ADN. Malgré un mode de fixation plus complexe de tels composés au niveau de l'ADN entraînant des cinétiques plus lentes, ces molécules affichent très généralement une meilleure affinité pour l'ADN que de simples intercalants. De nos jours de nombreux efforts sont fournis dans le but d'allier ces différents modes d'interaction pour développer des ligands spécifiques de certaines lésions de l'ADN pour des applications médicales.

Enfin, un nouveau mode d'interaction non-covalent avec l'ADN a récemment été mis en valeur suite à l'étude de complexe métallique de rhodium.^{140,141} Ce mode de fixation implique l'insertion d'un hétérocycle aromatique encombrant au niveau des bases de l'ADN spécifiquement au niveau de sites induisant une déstabilisation de l'ADN, notamment les bases mésappariées. Le composé en s'insérant dans le petit sillon de l'ADN éjecte alors les bases mésappariées dans le grand ou le petit sillon et positionne ainsi un de ces ligands dans l'emplacement occupé précédemment par les deux bases. Ce mécanisme, en n'induisant qu'une légère distorsion de l'ADN suite au déplacement des bases dans les sillons de l'ADN, se différencie ainsi du mode de fixation des intercalants qui engendre un écartement au niveau des bases de l'ADN.

2- Présentation des sites abasiques et de leurs propriétés

Les sites abasiques, nommés également sites apuriniques / apyrimidiniques (sites AP), résultent du clivage hydrolytique de la liaison *N*-glycosidique reliant la base azotée au sucre, ne laissant que le pentose sur le brin d'ADN. Ce processus peut intervenir spontanément, être provoqué suite à une exposition aux radiations ionisantes ou aux agents alkylants mais également faire suite à l'action d'enzymes glycosylases au cours des mécanismes de réparation de dommages. Le clivage de la liaison glycosidique est fortement dépendante du pH et de façon intéressante, le taux de dépurination est plus élevé que celui de dépyrimidination.¹

En utilisant la spectroscopie RMN, Manoharan et al. ont ainsi montré que le site abasique peut adopter trois conformations différentes.¹⁴² En effet, en solution ce dernier existe en équilibre entre une forme cyclique hémiacétale (α et β), une forme ouverte de type aldéhyde et une forme hydratée (Figure 25). Parmi ces différentes conformations, il a été démontré que la forme hémiacétale est prépondérante au sein de l'ADN. Cependant bien que ne représentant qu'un pourcent des structures totales, la forme ouverte de type aldéhyde rend le site abasique très vulnérable dans des conditions alcalines comme mis en valeur pour la première fois par Bailly et Verly.^{143,144} Leurs recherches révèlent que le site abasique peut subir une réaction de type β -élimination suite à l'action de différentes molécules présentant des groupements basiques dont notamment les histones ou encore la polyamine spermine conduisant à la formation d'un produit de type aldéhyde α,β -insaturé. En condition fortement alcaline une seconde élimination de type δ -élimination est également observée à la suite.

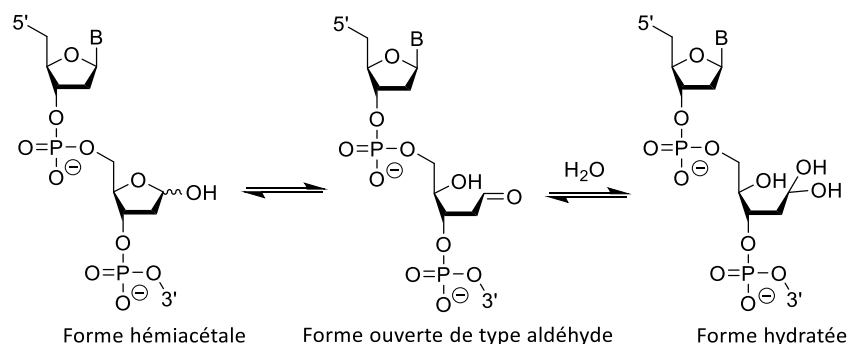
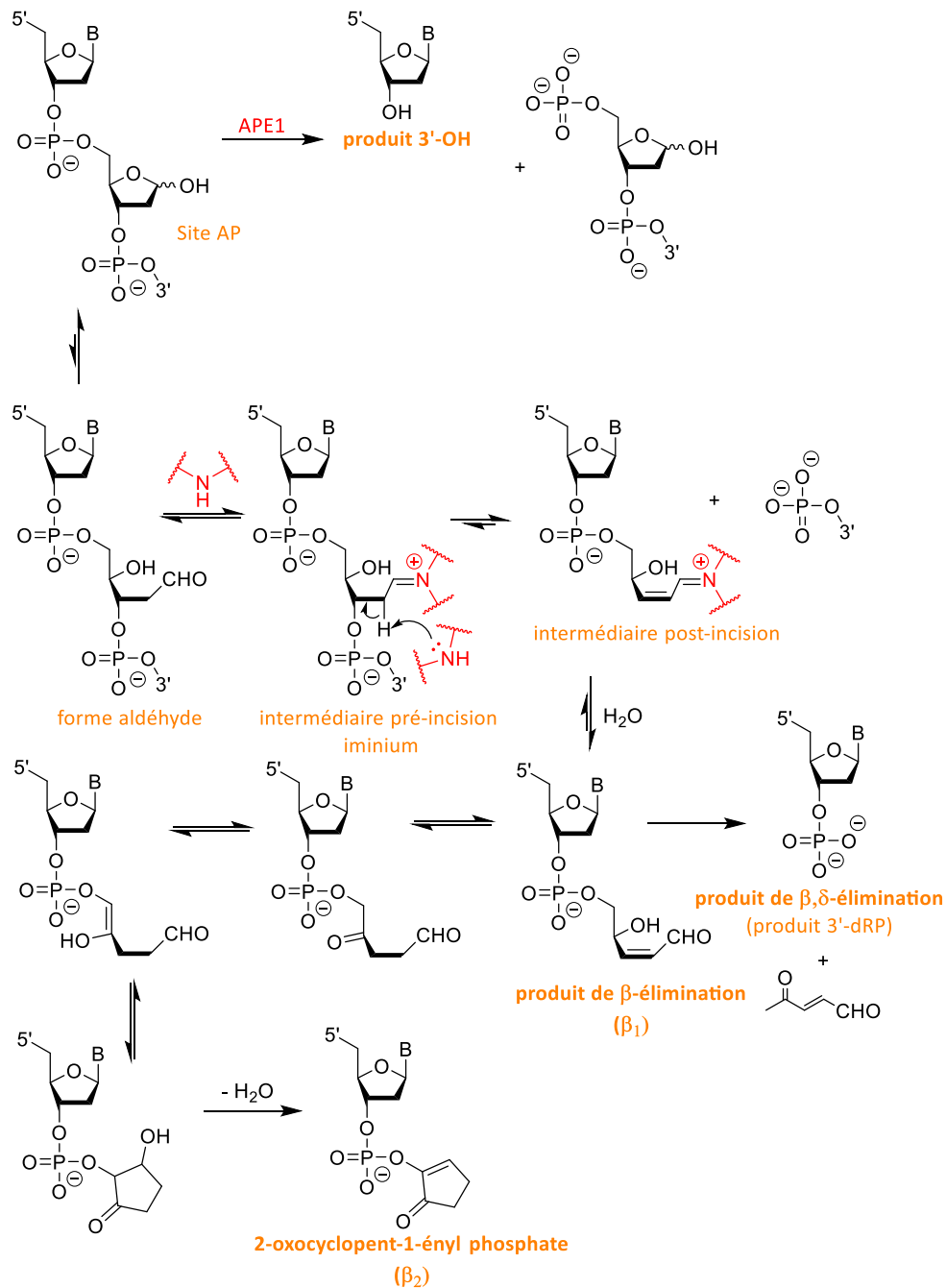


Figure 25- Structure des différentes formes du site abasique.

Le mécanisme réactionnel a été validé quelques années plus tard par le laboratoire de Lloyd grâce à l'isolation des différents intermédiaires réactionnels, suite au clivage du site abasique en condition réductrice.¹⁴⁵ Les recherches ont permis de démontrer que le groupement aldéhyde de la forme ouverte du site abasique subit une attaque nucléophile de la part d'un premier groupement amine conduisant à la formation d'un intermédiaire iminium de type base de Schiff (Figure 26). Puis dans un second temps un deuxième groupement amine permet de catalyser la réaction de β -élimination par abstraction d'un proton en position 2' sur le désoxyribose, conduisant à la formation d'un nouveau produit α,β -insaturé porteur également d'une fonction aldéhyde. Dans certains cas, une deuxième base de Schiff peut alors se former entre cette dernière et un groupement amine présent sur la molécule conduisant alors au clivage de type δ -élimination et à la formation d'un produit de type β,δ -élimination. De façon notable, il a été mis en valeur que le produit de coupure de type β -

élimination (**Figure 26, β_1**) subit en condition alcaline un réarrangement conduisant à la formation d'un produit de type 2-oxocyclopent-1-enyl phosphate (**β_2**),^{146,147} visible notamment par gel d'électrophorèse par un dédoublement de la bande correspondant aux produits de coupure de type β -élimination.

Il est intéressant de relever que les différents produits de clivage induits par les molécules ne sont pas les mêmes que le produit de clivage enzymatique d'APE1 formé au cours du processus de réparation par la voie BER (**Figure 26, produit 3'-OH**). Ainsi les molécules catalysant la formation de produits de coupure de type β -élimination et β,δ -élimination permettraient d'augmenter les dommages induits par les agents anticancéreux favorisant la formation de sites abasiques.



Des études effectuées par différents laboratoires ont permis de montrer qu'outre le clivage par des petites molécules, le site abasique peut subir un clivage enzymatique.^{143,145,147-149} En effet, les endonucléases III et V notamment mais aussi la protéine Fpg (*Introduction- I-3*) peuvent également catalyser le clivage du site abasique par un mécanisme similaire de type β -élimination suite à la formation d'un intermédiaire de type iminium enzyme-ADN.¹⁵⁰ Cependant la stéréochimie de la réaction mise en avant au cours des études est différente. En effet, le clivage moléculaire intervient par un mécanisme de type *anti* conduisant alors à la formation de l'aldéhyde α,β -insaturé *trans* alors que le clivage enzymatique s'effectue lui par un mécanisme *syn* impliquant alors la formation de l'aldéhyde α,β -insaturé *cis*.¹⁵¹ Cette différence de stéréochimie a été attribuée à la rotation de la liaison C₂-C₃ du sucre par les enzymes, cette réorientation permettant une dissociation plus rapide de ces dernières avec le substrat.¹⁴⁵

Devant l'intérêt dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse d'augmenter les dommages des agents alkylants, des laboratoires ont concentré leurs efforts sur le développement de nouvelles molécules clivantes. Ainsi en plus du fort potentiel clivant de différents dérivés peptidiques incluant le peptide **Lys-Trp-Lys**,^{145,151-153} les capacités de clivage de composés tels que la **9-aminoellipticine**^{154,155} ou différentes polyamines dont la **spermine** et des composés de type intercalant-amine (**158.4**)¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ ont pu être démontrées à plusieurs reprises (*Figure 27*). Pour la grande majorité de ces composés, l'intercalation de la molécule ou le placement dans un sillon de l'ADN au niveau du site abasique favorise la formation d'une base de Schiff avec la forme ouverte du désoxyribose permettant alors le clivage de type β -élimination par les groupements nucléophiles présents sur les composés.

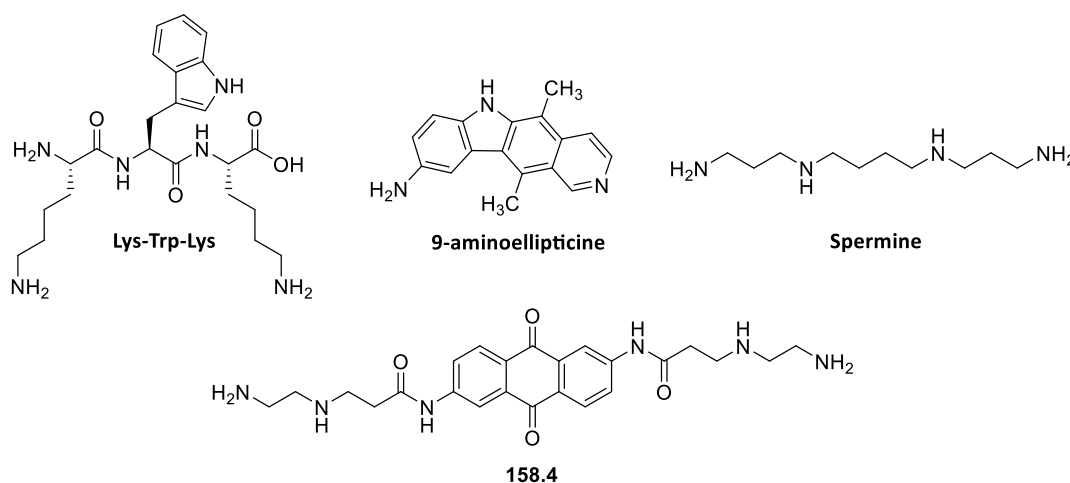


Figure 27- Exemples de composés clivant le site abasique suivant un mécanisme de β -élimination.

Au début des années 1990, J. Lhomme et al. se sont attelés au développement de molécules hybrides présentant des critères favorables à la bonne interaction ainsi qu'au clivage du site abasique.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Les molécules ainsi synthétisées sont constituées de trois parties : une unité de type base nucléique permettant la reconnaissance avec le site abasique en favorisant l'interaction avec la base opposée à celui-ci ; une unité possédant des capacités d'intercalation avec l'ADN afin d'augmenter l'affinité des molécules pour ce dernier et enfin une chaîne possédant des groupements nucléophiles pour permettre le clivage du site abasique de type β -élimination. La molécule la plus active, nommée **DTAC** (*Figure 28*), présente une unité 2,6-diaminopurine interagissant avec les bases nucléiques, une

partie 9-aminoacridine favorisant l'intercalation au sein de l'ADN et deux groupements amines secondaires au sein de la chaîne reliant les deux premières unités. L'étude de cette molécule a permis de mettre en évidence son fort potentiel. En effet, elle présente une activité plus importante que le peptide Lys-Trp-Lys en clivant les plasmides d'ADN à une concentration de l'ordre du nanomolaire. A la suite, une collaboration entre les laboratoires de J. Lhomme et J.-M. Lehn a permis de mettre en évidence que le macrocycle de type cyclo-bis-acridine (**BisA**) possédait également la capacité de cliver le site abasique, cependant avec une efficacité moindre par comparaison avec le composé DTAC et son dérivé **ATAC** (Figure 28).¹⁶²

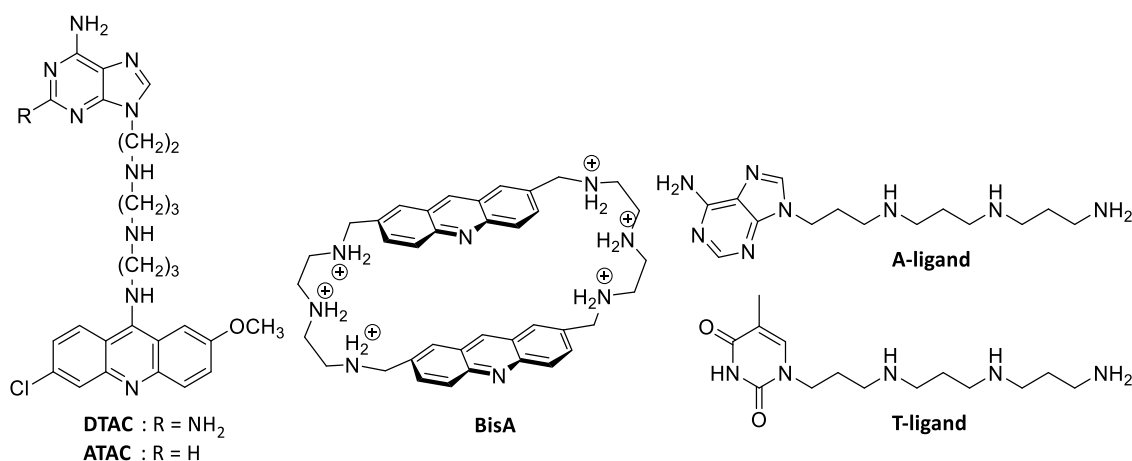


Figure 28- Structure des ligands DTAC et ATAC, du macrocycle BisA et de deux ligands de type nucléobase-polyamine.

Inspirées des travaux de J. Lhomme et al., des molécules de type nucléobase - polyamine ont été développées par le laboratoire de Sasaki par conjugaison des différentes bases de l'ADN avec une chaîne 3,3'-diaminodipropylamine (Figure 28, **A-ligand** et **T-ligand**).^{163,164} Basée sur la complémentarité Watson-Crick, la présence des différentes unités de type nucléobase permet une stabilisation sélective de l'ADN en fonction de la base opposée au site abasique. Cette interaction place alors les fonctions amines présentes sur la chaîne de la molécule dans un environnement proche du site abasique, favorable à la formation d'une base de Schiff et ainsi au clivage de type β -élimination. Enfin plus récemment, des nouvelles classes de petites molécules catalysant la coupure du site abasique ont été mises en valeur par les laboratoires de Lloyd (Figure 29, **C1**)¹⁶⁵ mais également de Décout.¹⁶⁶ En effet, dans le but de découvrir de nouveaux antibiotiques, les recherches menées par ce dernier ont conduit à mettre en valeur la capacité de clivage des sites abasiques des aminoglycosides et notamment de la **néomycine B** (Figure 29), constituant de nombreux traitements pharmaceutiques. Ces résultats novateurs permettraient ainsi d'expliquer en partie l'effet pharmaceutique observé avec cette famille d'antibiotiques. De plus, de façon remarquable des dérivés de type aminoglycoside néamine synthétisés à la suite ont démontré une activité de clivage des sites AP *in vitro* plus importante, faisant ainsi de cette famille de molécules une base d'étude très intéressante pour de futurs développements thérapeutiques.

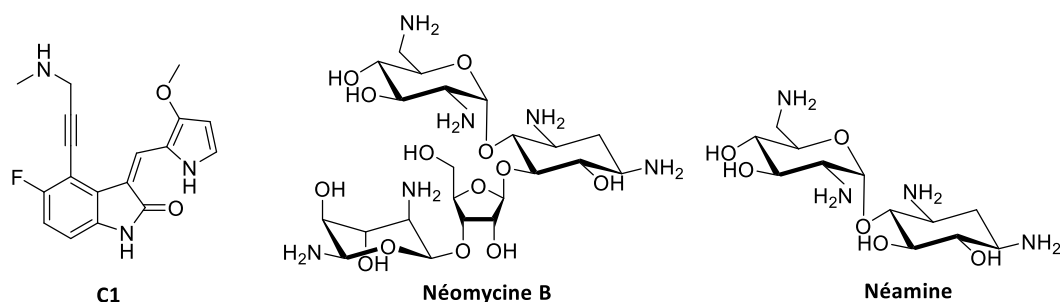


Figure 29- Ligands clivant les sites abasiques récemment mis en valeur.

Outre au cours du processus de clivage, la condensation des amines nucléophiles sur le groupement aldéhyde présenté par la forme ouverte du site abasique a été de nombreuses fois utilisée dans le but de détecter les sites abasiques. En effet, la formation des sites abasiques intervenant notamment suite à l'action d'agents anticancéreux, il est d'intérêt de pouvoir les quantifier afin d'évaluer l'efficacité des traitements thérapeutiques. Ainsi de nombreuses sondes ont été synthétisées par différents laboratoires.

Dans un premier temps le composé 9-aminoellipticine (*Figure 27*) a présenté des caractéristiques intéressantes. En effet ce dernier forme avec la forme ouverte du site abasique une base de Schiff fluorescente dont l'émission de luminescence peut ainsi être quantifiée.¹⁶⁷ Mais la diminution de la fluorescence à forte concentration en composé a été observée par les auteurs. Ainsi dans le but de développer des méthodes plus sensibles, de nombreux laboratoires se sont principalement basés sur la capacité des groupements oxyamines à former des oximes (analogues stables de la base de Schiff) avec les groupements aldéhydes pour synthétiser de nouvelles sondes (*Figure 30*).

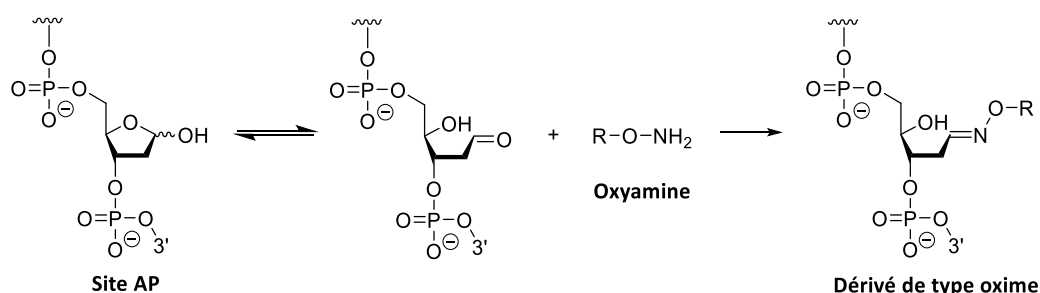


Figure 30- Schéma de la réaction d'oxyamine sur la forme ouverte du site AP conduisant à la formation d'un groupement de type oxime.

Différentes sondes fluorescentes (*Figure 31*, **168.3**, **170.5**, **AHA**)¹⁶⁸⁻¹⁷¹ mais également des dérivés de la biotine porteurs d'un groupement oxyamine, nommés **ARP** (*Aldehyde Reactive Probe*) ont ainsi été synthétisés afin de quantifier les sites abasiques *in vitro*¹⁷² et au sein des tissus de mammifères.⁴ La détection des sites AP à l'aide d'anticorps spécifiques au groupe nitrobenzyle par test ELISA a également été développée après réaction de ces derniers avec l'O-4-nitrobenzylhydroxylamine (*Figure 31*, **NBHA**).¹⁷³ Mais preuve du besoin croissant de techniques sensibles permettant la détection des sites abasiques, les laboratoires ont concentré leurs efforts sur l'élaboration de nouvelles techniques de détection au début des années 2010. Ainsi des méthodes de quantification des sites abasiques par microscopie¹⁷⁴, par électrochimie¹⁷⁵, par détection de nanopores¹⁷⁶ ou encore par spectrométrie de masse^{177,178} ont été décrites. Plus récemment, de nouvelles sondes innovantes

ont été développées. La première est constituée d'une partie oxyamine permettant la réaction avec le site abasique ainsi que d'une unité alcyne (**Figure 31, AA3**).¹⁷⁹ Cette sonde présente plusieurs avantages. En effet, plus petite, elle affiche une meilleure sensibilité que les sondes ARP précédemment développées en présentant une réactivité plus importante à pH physiologique. Après réaction de la sonde avec le site abasique, l'unité alcyne laisse le choix à l'utilisateur du marqueur le plus adapté pour la quantification des sites AP, basé sur le principe dit de la « *click chemistry* ». Mais également le laboratoire de Carell reporte le développement d'un nouveau réactif de type oxyamine (**Figure 31, 180.1**) qui, couplé avec les techniques de détection par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), permet d'accroître fortement la sensibilité de détection.¹⁸⁰ De plus cette sonde permet la quantification des produits de coupure de type β -élimination en plus des sites AP. Enfin, les sondes fluorescentes précédemment conçues présentent l'inconvénient de fluorescer dans la gamme de longueurs d'ondes de l'UV-visible, rendant leur utilisation en profondeur dans les tissus impossible. Ainsi devant la nécessité croissante de techniques permettant la quantification des sites AP *in vivo* dans le cadre des recherches cliniques, une sonde de type cyanine (**Figure 31, 181.7**) fluorescente dans le proche infrarouge a été développée.¹⁸¹

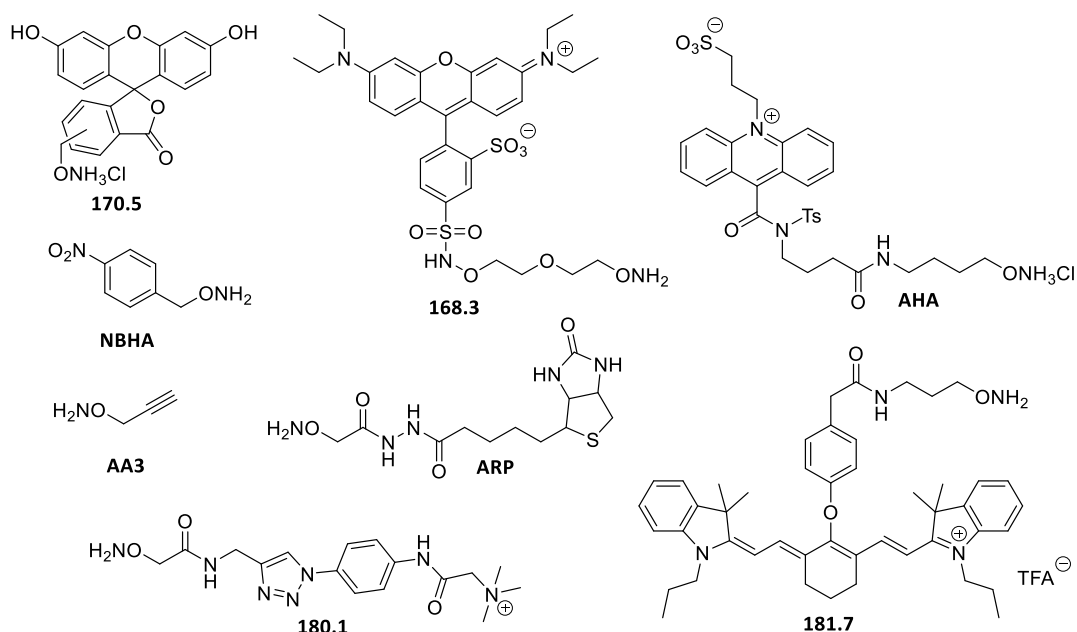


Figure 31- Exemples de différentes sondes de type ARP développées pour quantifier les sites abasiques.

La réactivité des sites abasiques avec des petites molécules présentant des groupements nucléophiles, exploitée à de nombreuses reprises, n'est ainsi plus à démontrer. Il est également intéressant de noter que, bien que moins décrite, la formation d'adduits entre le site abasique et des protéines a également été constatée.⁶⁴⁻⁶⁶ Mais également, inspirée de la réactivité des molécules avec les sites abasiques, des études plus récentes effectuées dans le laboratoire de Gates ont mis en évidence pour la première fois la formation de pontages interbrins au sein de l'ADN due à la présence d'un site abasique. En effet, caractérisée notamment par spectrométrie de masse ou encore par gel d'électrophorèse, la formation d'une liaison covalente entre le groupement aldéhyde de la forme ouverte du site abasique et le groupement amine présent en position N^2 sur la base guanine opposée au site abasique a été démontrée, conduisant ainsi à un pontage interbrin de type guanine - site AP (**Figure 32, a**).⁶⁷ Fort de ces résultats, les recherches approfondies menées alors ont

révélé la capacité des bases adénines à former également un pontage interbrin avec cependant le produit de clivage du site abasique opposé de type β -élimination via une réaction de type addition de Michaël (*Figure 32, b*).⁶⁸

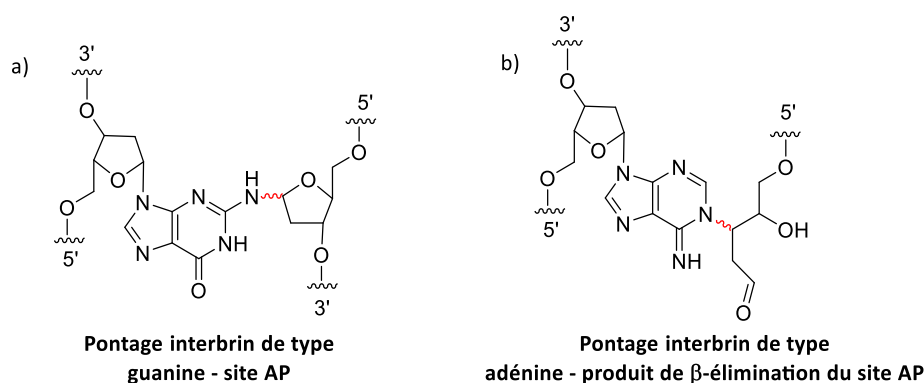


Figure 32- Structure des pontages interbrins de type : a) guanine–site AP ; b) adénine–produit de β -élimination du site AP. En rouge, liaison assurant le pontage interbrin.

3- Stratégie de l'inhibition indirecte d'APE1

Les sites abasiques, intermédiaires réactionnels au cours du processus de réparation de l'ADN, sont un sujet d'étude privilégié depuis de très nombreuses années. Afin de développer des méthodes de quantification de ces derniers, divers composés se fixant sur la forme ouverte du site abasique ont été conçus comme détaillé précédemment. Au cours des efforts effectués dans le but de développer de nouvelles techniques d'analyse, en 1985 Liuzzi et al. mettent en évidence pour la première fois que la réaction chimique d'une molécule avec le site abasique empêche la prise en charge enzymatique de celui-ci.¹⁸² En effet en formant un groupement oxime stable avec l'aldéhyde de la forme ouverte du site AP (*Figure 30*) une petite molécule dérivée d'alkoxyamine, la méthoxyamine (*Figure 33, MX*), inhibe la coupure de ce dernier par l'enzyme APE1 impliquée dans la voie de réparation BER. Suite à ces premières constatations, les conséquences de la réaction de la méthoxyamine avec le site abasique ont été de nouveau étudiées, permettant ainsi de revalider l'inhibition de la réparation de ce dernier.^{183,184}

Fort de ces résultats, des études plus approfondies du composé ont permis de montrer que la méthoxyamine pouvait augmenter la cytotoxicité de l'agent anticancéreux témozolomide sur les cellules cancéreuses notamment d'ovaire (IGROV-1), de colon (SW480 et HCT116) et de glioblastome (T98G).^{69,185,186} En effet, les résultats mettent en évidence que le co-traitement des cellules avec la méthoxyamine permet une diminution de l' IC_{50} du témozolomide sur la lignée d'ovaire d'un facteur deux environ (MX à 20 mM), sur la lignée T98G d'un facteur sept (MX à 20 mM) et sur les lignées de colon d'un facteur deux à trois (MX à 6 mM). Cependant, les données obtenues par le laboratoire de Gerson révèlent alors que l'augmentation de la cytotoxicité du témozolomide par la méthoxyamine ne serait pas liée à la cytotoxicité intrinsèque de la molécule mais principalement due à la persistance des sites abasiques au sein de l'ADN suite à l'inhibition de l'activité enzymatique d'APE1, bloquant ainsi la voie de réparation BER.¹⁸⁴ La sensibilisation des cellules de colon à la BCNU par la présence de la méthoxyamine a également pu être démontrée dans un second temps.¹⁸⁷

Dans un effort de compréhension plus approfondie du mécanisme de sensibilisation de la méthoxyamine, des recherches précliniques ont permis de démontrer qu'en bloquant le processus de réparation BER mis en place suite au traitement avec le TMZ, la méthoxyamine sensibilise également les cellules à la toxicité des topoisomérases II. Bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé, il a été mis en avant que la présence de l'adduit MX-ADN stimule l'expression des topoisomérases II dont la forte activité conduit à la mort cellulaire suite à la formation de coupures double-brins.¹⁸⁸

Donnant un aspect plus thérapeutique à l'utilisation de la méthoxyamine, ces résultats ainsi que ceux mis en avant par de nombreux autres laboratoires apportent la preuve que l'inhibition de la voie de réparation BER en ciblant directement l'ADN avec des petites molécules et notamment les sites abasiques est une stratégie efficace afin d'augmenter la sensibilité des cellules aux agents anticancéreux.^{189,190} Entre 2008 et 2009, la méthoxyamine, développée sous le nom TRC102 par la société TRACON Pharmaceuticals, a été testée pour la première fois en phase clinique I et la bonne tolérance du composé par les patients a ainsi été démontrée.¹⁹¹ A ce jour, plusieurs phases cliniques I et II sont en cours notamment pour tester la combinaison du composé avec plusieurs agents anticancéreux (incluant le témozolomide) sur des patients ayant développés diverses tumeurs.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Les premiers résultats ainsi obtenus sont encourageants sur la capacité de la méthoxyamine à augmenter la sensibilité des patients aux traitements chimio-thérapeutiques.

4- Développement de ligands ciblant les sites abasiques

Face aux résultats prometteurs obtenus avec la méthoxyamine de nombreux laboratoires ont concentré leurs moyens dans le développement de nouvelles molécules ayant la capacité de bloquer la voie de réparation BER en interagissant fortement et sélectivement avec les sites abasiques.

Après la méthoxyamine, la première molécule mise en avant pour sa potentialisation de l'effet cytotoxique des agents alkylants a été la **9-aminoellipticine** (*Figure 33*).¹⁹⁶ En effet, Malvy et al. ont mis en valeur la capacité de cette molécule à augmenter la cytotoxicité du sulfate de diméthyle. Les recherches précédemment effectuées avaient permis de démontrer la formation d'une base de Schiff entre la molécule et le site abasique sous sa forme ouverte. Suite à l'approfondissement de son mécanisme d'action, les auteurs ont ainsi pu démontrer l'inhibition de la réparation des sites AP suite à formation d'un adduit covalent du côté 3' du site abasique après clivage de ce dernier.^{155,197}

Plus récemment, la formation d'un adduit covalent entre le site abasique et une molécule de type hydrazine aromatique a été décrite.¹⁹⁸ En effet, les études menées par le laboratoire de Gates ont permis de mettre en évidence pour la première fois la formation d'un adduit de type hydrazone en conditions physiologiques après réaction des sites abasiques avec l'**hydralazine** (*Figure 33*). Bien que cette molécule soit très utilisée cliniquement pour lutter contre l'hypertension, le mécanisme d'action de cette dernière n'est cependant pas élucidé. Ainsi en se basant sur leurs résultats et sur les constatations faites avec la méthoxyamine, les auteurs émettent l'hypothèse que la formation de l'adduit pourrait bloquer la voie de réparation BER, ce qui expliquerait la cytotoxicité observée de l'hydralazine. Cependant des études approfondies sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

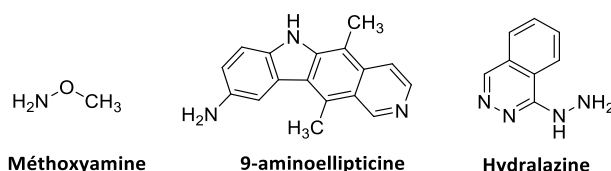


Figure 33- Exemples de molécules d'intérêt thérapeutique formant des adduits covalents avec les sites AP.

Bien que partageant l'objectif d'inhiber la voie de réparation BER en ciblant les sites abasiques, deux stratégies se distinguent cependant : la conception de molécules pouvant se fixer de façon covalente à l'ADN à l'instar de la méthoxyamine mais également le développement de ligands pouvant interagir par liaisons non covalentes telles que par π -stacking ou interactions électrostatiques.

Pionniers dans le domaine, Lhomme et al. ont diversifié la structure des molécules hybrides de type base nucléique – acridine dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs, structure précédemment conçue pour cliver les sites abasiques suite à une interaction électrostatique spécifique avec ces derniers. Les premières recherches effectuées avec les composés DTAC et ATAC (Figure 28) ont permis d'établir le fort potentiel de ce type de molécule à inhiber la voie de réparation BER ainsi qu'à augmenter la cytotoxicité du MMS et de la BCNU.¹⁹⁹ Ainsi une nouvelle famille de molécules hybrides a été développée dans laquelle les groupements amines présents sur la chaîne ont été remplacés par des groupements guanidiniums ou par des groupements amides, dans l'hypothèse de supprimer l'activité de clivage des molécules et / ou d'augmenter l'affinité pour l'ADN.^{200–202} Parmi les nouvelles molécules ainsi synthétisées, le dérivé du composé ATAC présentant deux groupements guanidiniums a montré une meilleure affinité pour les sites abasiques que son analogue ATAC sans avoir la capacité de les cliver (Figure 34, 200.3). De plus, les recherches biologiques ont également mis en valeur que ce dérivé potentialise la cytotoxicité de la BCNU *in cellulo* et *in vivo*. Cependant ce composé présentant une forte cytotoxicité intrinsèque *in vivo*, des efforts de synthèse sont fournis afin de moduler sa toxicité tout en maintenant l'effet synergique observé avec la BCNU.²⁰³ Ces résultats ont permis de mettre remarquablement en valeur que l'interaction électrostatique d'une molécule avec le site abasique permettait d'augmenter la cytotoxicité des agents alkylants de manière comparable aux composés se liant de façon covalente aux sites AP.

Beaucoup plus récemment, de nouveaux ligands de sites abasiques de type métallohélice ont été décrits.²⁰⁴ Ces composés sont constitués de trois chaînes de type NN-NN-bis(bidentate) complexées à deux cations métalliques Fe²⁺ présentant ainsi une structure en triple hélice (Figure 34, [Fe₂L₃^{1a}]⁴⁺). Au cours de l'étude, ces complexes de fer nommés flexicates ont affiché une forte affinité pour les sites abasiques et plus spécifiquement pour les sites apuriques. Bien que le mode d'interaction de tels composés reste à être déterminé, cette constatation est notamment justifiée par les auteurs par la conformation extrahélicoïdale adoptée par les bases pyrimidines au sein de tel site abasique. Approfondissant le potentiel de ces métallohélices, les auteurs ont dans un second temps démontré l'inhibition de l'activité enzymatique d'APE1 *in vitro* par ces molécules. Ainsi même si des études plus approfondies sont nécessaires, ces complexes présentent une nouvelle architecture moléculaire intéressante dans le but d'inhiber la voie de réparation BER.

D'autres ligands ciblant les sites abasiques ont été décrits pour diverses applications, sans qu'aucune étude sur une potentielle activité d'inhibition d'APE1 n'est cependant été effectuée. Ainsi des dérivés de type **quinolizinium**,²⁰⁵ carboxamidoacridizinium (**206.8c**),²⁰⁶ **berberine**²⁰⁷ ou encore naphthyridine (**ATMND**)²⁰⁸ ont été mis en avant pour leur capacité à interagir sélectivement avec les sites abasiques (*Figure 34*). Le potentiel de dérivés acridines a été de nouveau mis en avant sous la forme d'hétérodimères de type acridine - benzamide (*Figure 34*, **209.4**)²⁰⁹ mais aussi avec le macrocycle bis-acridine (*Figure 28*, **BisA**),¹⁶² molécule ayant démontré dans un premier temps une forte sélectivité pour les structures de l'ADN dites en « épingle à cheveux ».^{210,211}

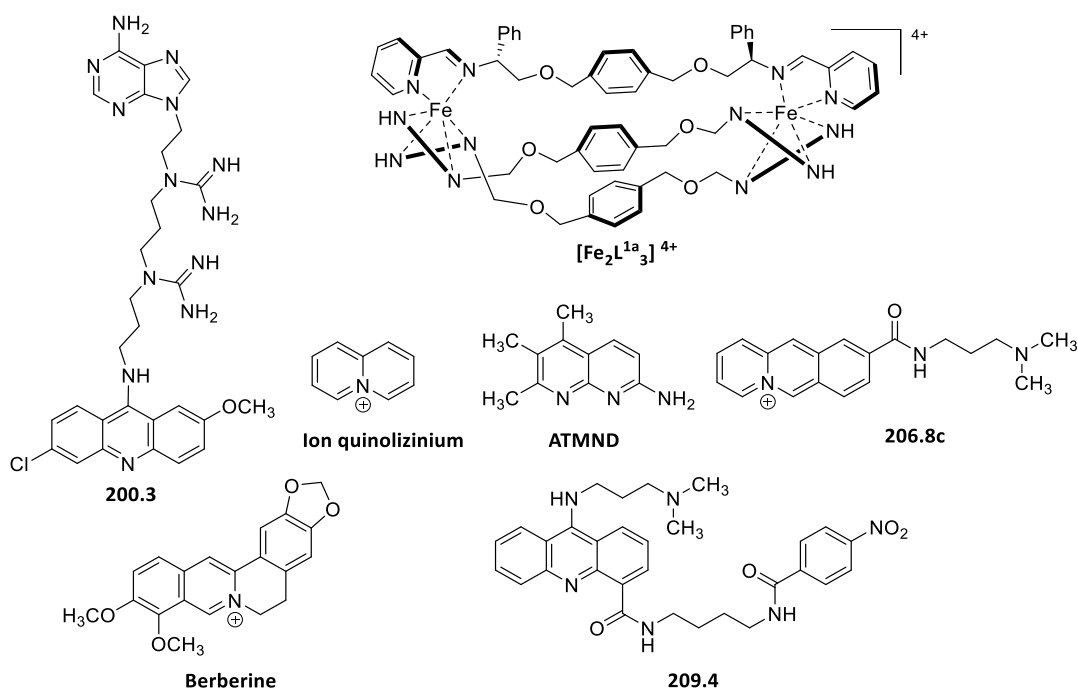


Figure 34- Exemples de composés interagissant par liaisons électrostatiques avec les sites abasiques.

Initialement décrits pour leur affinité pour les sites mésappariés au sein de l'ADN, les complexes métalliques de rhodium ont également affiché une affinité pour d'autres lésions de l'ADN dont notamment les sites abasiques.^{212,213} Ces complexes présentent deux ligands de type bipyridine ainsi qu'un ligand encombrant de type chrysène-5,6-quinone diimine (chrysi) ($[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$) ou benzo[*a*]phenazine-5,6-quinone diimine (phzi) ($[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})]^{3+}$) (*Figure 35*). L'étude de leur interaction avec l'ADN suggère alors l'insertion du ligand encombrant au niveau de la lésion favorisée par des interactions par π -stacking entre les bases de l'ADN et les unités aromatiques du ligand énergétiquement favorables. La discrimination des lésions présentes au sein de l'ADN par rapport aux bases bien appariées est notamment permise par la taille importante du ligand. En effet l'espace présenté entre les bases bien appariées ne permet pas d'accueillir ce dernier sans conduire à des modifications structurales de l'ADN énergétiquement défavorables (*Figure 23*). Cependant, la sélectivité de tel composé pour les sites abasiques par rapport aux mésappariements n'est pas démontrée par les auteurs et les récents développements menés avec ces complexes se concentrent sur les lésions de type mésappariement.^{140,214–216}

Cependant inspirés de ces travaux, des composés porteurs de ligands de type biaryle cationique (**Figure 35**, **217.1a**, **217.1b**, **217.1c**) pouvant s'insérer au niveau des sites abasiques suivant un mécanisme similaire aux complexes de rhodium ont été conçus.²¹⁷ La forte stabilisation de duplexe d'ADN présentant un site abasique par comparaison à l'ADN bien apparié a pu être démontrée *in vitro* mettant en évidence la sélectivité de telles molécules.

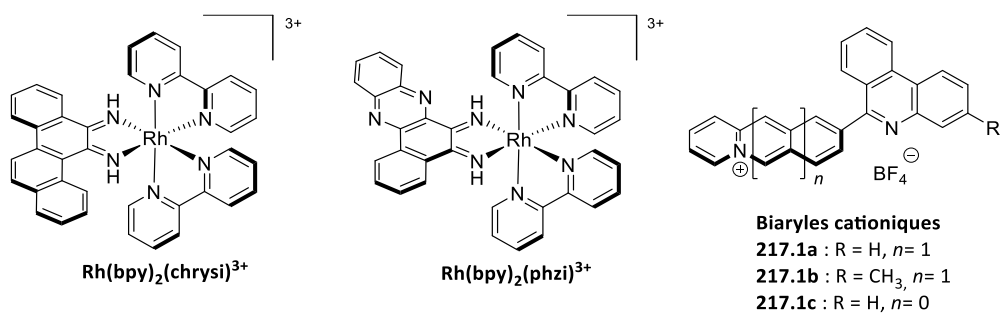


Figure 35- Exemples de molécules interagissant par insertion au niveau des sites abasiques.

III- Projet de thèse

1- Etudes préliminaires

Comme évoqué précédemment, les cyclophanes polyamines, incluant notamment le macrocycle bis-acridine (BisA), représentent une famille de composés qui à plusieurs reprises a démontré une bonne capacité à cibler différentes lésions au sein de l'ADN dont les mésappariements,²¹⁸ les sites abasiques¹⁶² ou encore une hybridation particulière de l'ADN en « épingle à cheveux ».^{210,211} Ces composés sont constitués de deux unités aromatiques planes reliées entre elles par des chaînes polyamines. Cette structure particulière permet alors l'encapsulation d'hôtes aromatiques. En effet, des études par résonance magnétique nucléaire ont permis de démontrer une interaction de type « *threading binding* » entre le macrocycle bis-acridine et l'ADN (Figure 36).²¹⁹ Le modèle proposé, suite à l'étude de l'interaction de la molécule avec un site abasique, met en avant la localisation d'une unité acridine dans la poche formée par le site abasique ainsi que l'intercalation de la deuxième unité acridine au niveau de la paire de bases flanquant ce dernier. Les deux chaînes polyamines sont alors positionnées dans le petit et le grand sillon de l'ADN. L'étude similaire effectuée sur l'ADN non porteur d'un site abasique ne révèle pas la formation d'un complexe ligand-ADN, mettant de nouveau en évidence la sélectivité du macrocycle pour les lésions de l'ADN. Quelques années plus tard, les travaux menés par Marie-Paule Teulade-Fichou et Elmar Weinhold conduisent à l'hypothèse que le macrocycle BisA peut également se localiser au niveau des mésappariements suite au basculement d'une des bases mésappariées dans le sillon de l'ADN.²¹⁸

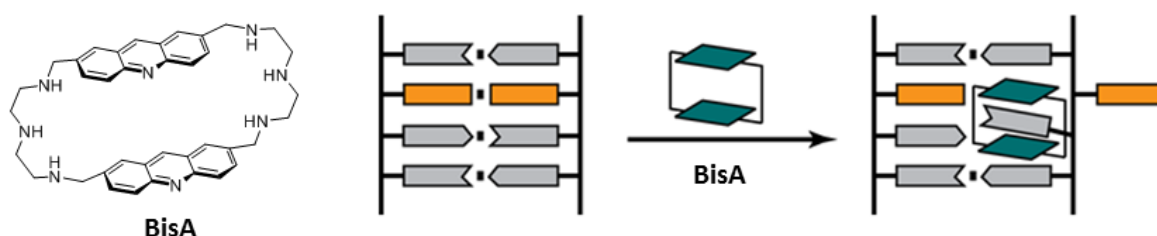


Figure 36- Schématisation de l'interaction du macrocycle bis-acridine (BisA) avec un site de mésappariement.

Afin de développer la sélectivité de telle structure pour les mésappariements dans un premier temps, des dérivés du macrocycle bis-acridine ont été conçus (Figure 37). Ainsi une nouvelle molécule de type bis-naphtalène substituée en position 2 et 6 par deux chaînes polyamines (**2,6-BisNP**) a alors démontré une plus forte affinité et sélectivité pour les mésappariements de type pyrimidine - pyrimidine que le macrocycle initial BisA.²²⁰ Cependant l'analogue de type bis-anthracène substitué en position 9 et 10 (**9,10-BisAN**) a, lui, affiché une sélectivité moins importante pour ce type de mésappariement en se fixant également sur l'ADN bien apparié.²²¹ Ces différentes études ont ainsi permis de mettre en évidence l'importance de la nature de l'unité aromatique des macrocycles et ainsi, hypothétiquement, la taille présentée par les unités naphtalènes serait plus favorable à une insertion au niveau des bases de l'ADN.

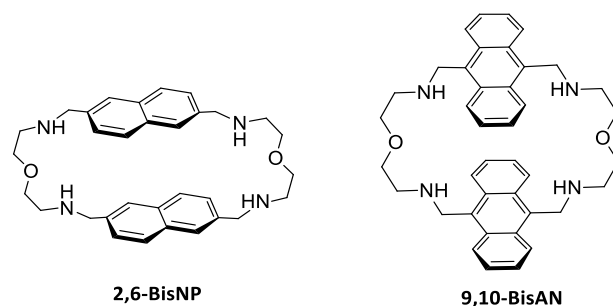


Figure 37- Structure des macrocycles 2,6-BisNP et 9,10-BisAN.

Fort de tous ces résultats, une large bibliothèque de nouveaux macrocycles bis-intercalants a été développée.²²² La nouvelle collection synthétisée alors est constituée de quinze macrocycles homodimériques et cinq hétérodimériques, présentant une variété d'unités aromatiques notamment de type acridine, naphthalène, anthracène ou encore phénanthroline, substituées à différentes positions. L'affinité et la sélectivité de ces nouvelles molécules vis-à-vis d'un mésappariement de type thymine ont ensuite été évaluées. Les résultats de cette étude révèle alors que les macrocycles de type bis-naphtalène (BisNP) présentent la meilleure sélectivité pour les mésappariements de l'ADN. Cependant, l'affinité affichée est fortement dépendante de la position de la substitution des chaînes polyamines et une augmentation de la sélectivité a été observée suivant l'ordre : **1,5-BisNP < 1,5/2,6 BisNP < 2,6-BisNP < 2,7-BisNP** (Figure 38). L'analogue au 2,7-BisNP présentant un atome de soufre au milieu des chaînes polyamines (**2,7-BisNP-S**) a affiché une plus faible affinité pour les sites mésappariés tout en maintenant la très bonne sélectivité de cette famille de molécule.

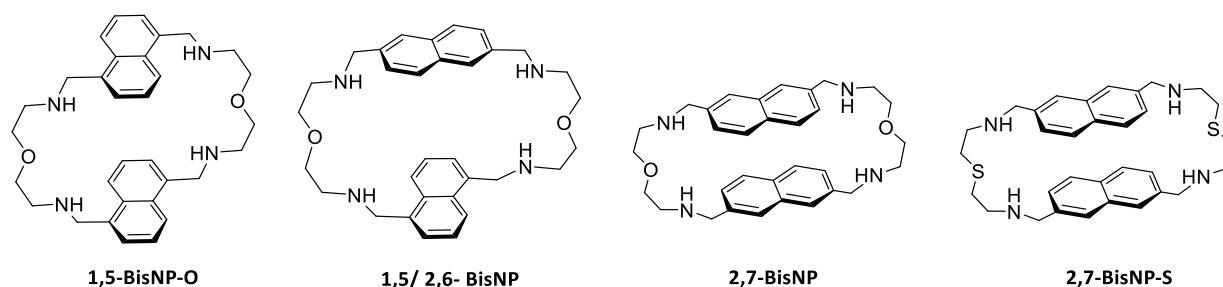


Figure 38- Structure de macrocycles de type BisNP.

Suite à ce criblage, le mode de fixation du ligand 2,7-BisNP avec un oligonucléotide présentant un mésappariement de type T-T a été analysé par spectroscopie RMN.²²³ Présentant un mode d'interaction très similaire à celui observé avec le macrocycle bis-acridine, le macrocycle 2,7-BisNP se lie à l'ADN par insertion d'une de ses unités naphthalènes dans le site de mésappariement conduisant au déplacement d'une base thymine (T_{17}) dans le grand sillon de l'ADN (Figure 39). La seconde unité naphthalène s'intercale alors au niveau de la paire de bases voisine au mésappariement (A_7-T_{16}), conduisant à l'encapsulation d'une base de cette dernière (T_{16}) entre les deux unités aromatiques. Cette encapsulation est favorisée grâce à une interaction par π -stacking entre les groupements aromatiques. La localisation des chaînes polyamines dans le petit sillon ainsi que dans le grand sillon de l'ADN participe à la stabilisation du complexe par formation de liaisons électrostatiques et de liaisons hydrogènes avec la base encapsulée et celle restante dans le site de mésappariement. Les

macrocycles bis-naphtalènes interagissent ainsi avec l'ADN suite à la combinaison de deux modes d'interaction : par insertion ainsi que par intercalation.

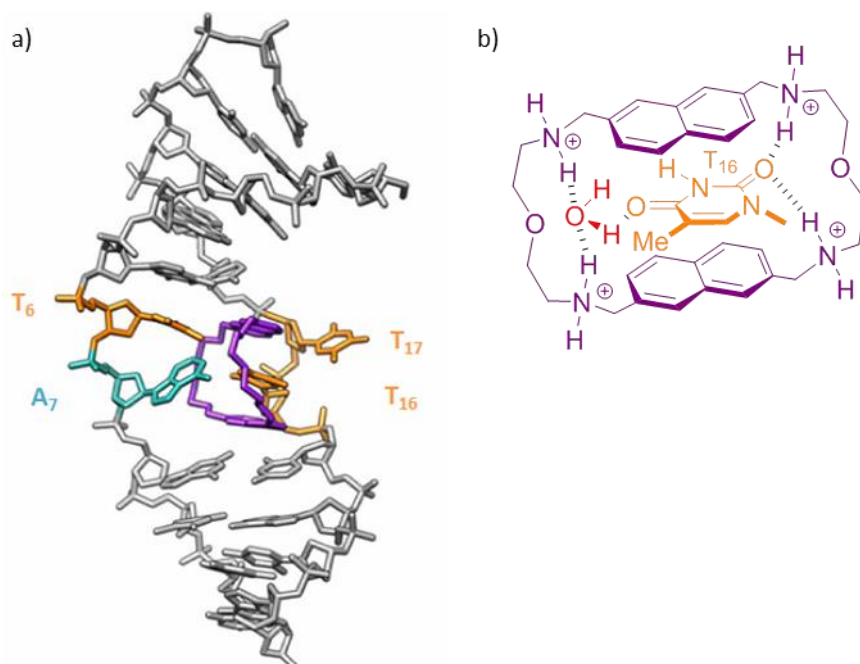


Figure 39- a) Visualisation de l'interaction du ligand 2,7-BisNP-O avec un mésappariement T-T étudiée par RMN.²²³ Les bases de l'ADN impliquées sont colorées ; **b) Schématisation des interactions hydrogènes formées entre le macrocycle 2,7-BisNP-O et la base encapsulée T₁₆ (en orange) ainsi qu'une molécule d'eau (en rouge) permettant la stabilisation du ligand.**

Les composés de squelette 2,7-BisNP ont ainsi été étudiés plus en détail.²²⁴ L'analyse de la dénaturation thermique d'un oligonucléotide porteur d'une base mésappariée, en présence ou non d'ADN compétiteur, a confirmé la forte sélectivité des ligands mais aussi la très bonne affinité pour cette lésion de l'ADN, meilleures que celles d'autres composés décrits dans la littérature dont les complexes métalliques de rhodium [Rh(bpy)₂(chrysi)]³⁺ développés par le laboratoire de Barton. De plus, de façon remarquable cette étude a permis de révéler que les macrocycles de type 2,7-BisNP présentaient une meilleure affinité pour les sites abasiques, tout en maintenant une très bonne sélectivité. Cette constatation a ainsi ouvert la voie de l'utilisation de telle structure pour le développement de ligands dans l'optique d'inhiber indirectement l'enzyme de réparation APE1.

La possibilité d'inhiber indirectement l'activité de clivage enzymatique d'APE1, avec deux ligands macrocycliques 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-NH, a ainsi été investiguée *in vitro* notamment par suivi de l'évolution de la fluorescence en temps réel et gels d'électrophorèse.²²⁵ La cinétique de la réaction enzymatique en présence de ligand (L) a pu être décrite à l'aide du modèle de Michaëlis-Menten avec une constante de Michaëlis apparente gouvernée par l'équation 1 :

$$K_M^{app} = K_M \left(1 + \frac{[L]}{K_d} \right) \quad (1)$$

avec K_M , la constante de Michaëlis en absence de ligand. L'équation ainsi déterminée est similaire au modèle de l'inhibition compétitive qui décrit la fixation des ligands au niveau du site actif de

l'enzyme (*Figure 40, a*). La différence réside alors dans la signification de la constante K_d qui reflète alors la fixation du ligand sur le substrat de l'enzyme et non directement sur cette dernière (*Figure 40, b*).

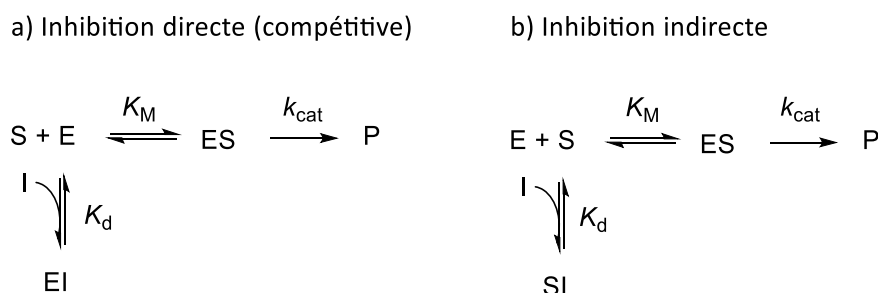


Figure 40- Modèle : a) de l'inhibition compétitive directe ; b) de l'inhibition indirecte de l'enzyme (E) par masquage du substrat (S) par les ligands (I).²²⁵ Dans notre cas : E= APE1, S= site AP et P= ADN clivé.

Ainsi, l'étude a permis de conclure que l'interaction sélective des ligands avec les sites abasiques aboutit, comme prédit, à une inhibition indirecte de l'activité enzymatique d'APE1. De plus les deux ligands macrocycliques testés, en affichant des IC_{50} de l'ordre de 55-60 nM, ont démontré une meilleure activité d'inhibition enzymatique par comparaison avec des inhibiteurs directs d'APE1 décrits dans la littérature, dont notamment le composé CRT0044876 qui présente une IC_{50} de 13,6 μM dans les conditions de l'étude ($[S] = 25 \text{ nM}$).

Les ligands macrocycliques affichent ainsi un squelette très prometteur dans le but d'inhiber la réparation de l'ADN par la voie BER en bloquant indirectement l'activité d'APE1 et les précédentes études RMN effectuées ouvrent la voie à la diversification de ces structures sans perturber l'interaction ligand-ADN.

2- Objectifs du travail de doctorat

Les précédentes études ont permis de mettre en avant la capacité des macrocycles de type 2,7-BisNP à inhiber indirectement le clivage du site abasique par l'enzyme APE1, mettant en avant le fort intérêt thérapeutique de ce type de structure dans le but d'augmenter la cytotoxicité des agents alkylants. De plus, au cours des recherches effectuées, la formation d'un produit de clivage de l'ADN différent du produit formé par APE1 a été mise en valeur notamment par gels d'électrophorèse suite à l'incubation du ligand 2,7-BisNP-O avec un oligonucléotide porteur d'un site abasique.²²⁵ En effet ce macrocycle présente sur sa structure des fonctions amines qui, par analogie avec les nombreux ligands présentés précédemment, peuvent potentiellement réagir avec la forme ouverte du site abasique et conduire ainsi à la formation d'un produit de clivage de type β -élimination (*Figure 26*). Ainsi de façon intéressante cette activité de clivage pourrait être responsable de la production et/ou de l'amplification des dommages à l'ADN suite à l'action d'agents alkylants anticancéreux et ainsi aboutir à des applications médicales dans le contexte de la lutte contre le cancer. Toutefois le mode d'action cellulaire de ces composés n'est pas encore validé.

Mon projet de thèse vise à la compréhension de l'activité biologique des composés macrocycliques et ainsi évaluer leurs interférences avec la réparation de l'ADN *in cellulo*. Une approche interdisciplinaire, chimie et biologie, sera ainsi utilisée dans ce but.

Tout d'abord, une nouvelle génération de ligands macrocycles de type 2,7-BisNP sera synthétisée. Ces composés seront conçus de façon à pouvoir être divisés en deux familles. Ainsi tout en maintenant l'activité d'inhibition du clivage d'APE1, la première famille sera dépourvue de l'activité de clivage de l'ADN alors que la deuxième famille présentera une activité de clivage maintenue voire même exacerbée, dans le but de pouvoir évaluer indépendamment les deux activités présentées par les macrocycles.

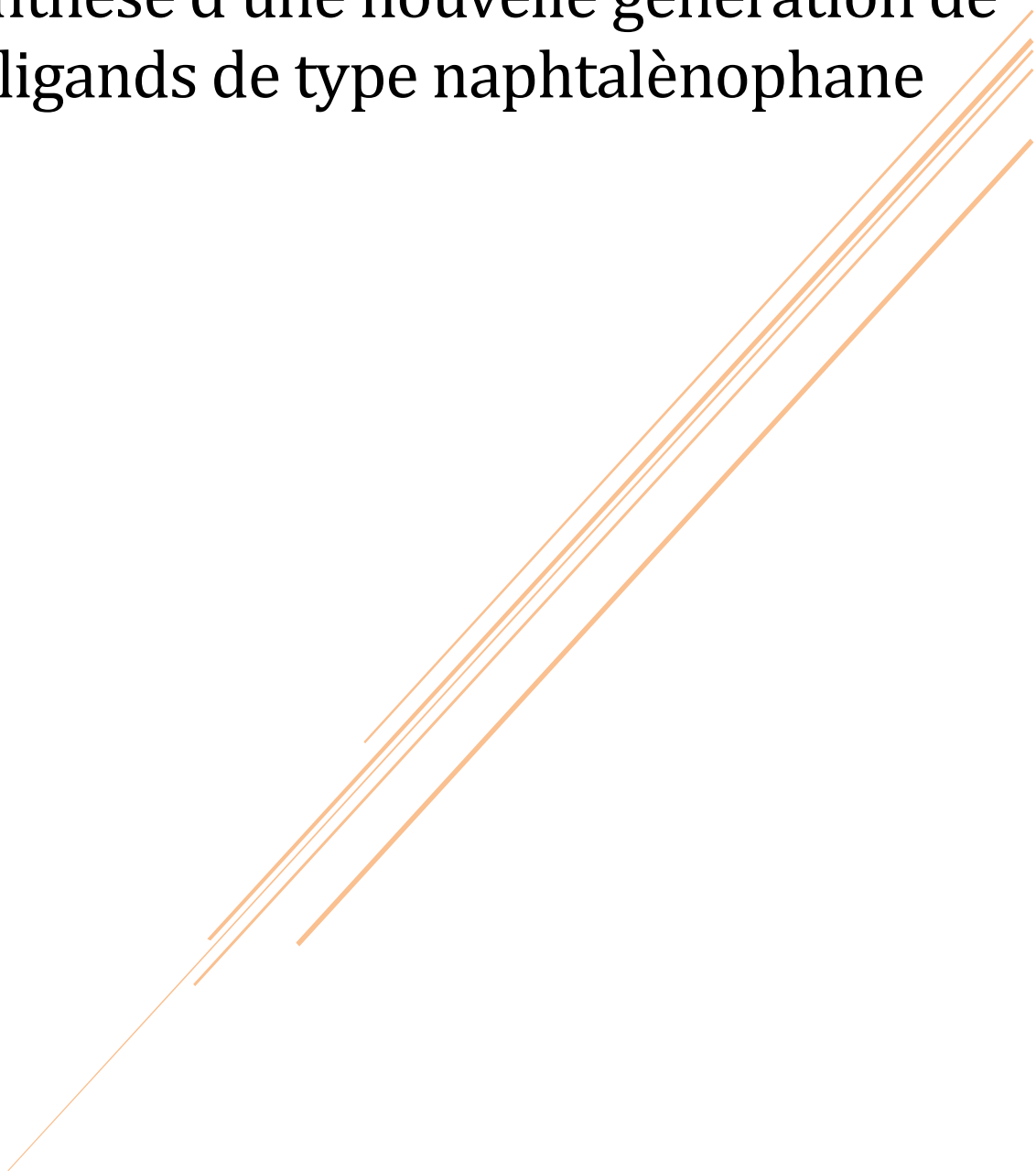
L'affinité et la sélectivité de ces nouveaux composés vis-à-vis des sites abasiques seront étudiées *in vitro* à l'aide d'oligonucléotides de synthèse, en présence ou non d'ADN compétiteur, en déterminant la température de dénaturation de l'ADN duplexe. L'influence de la base complémentaire au site abasique sur l'affinité du ligand pour la lésion sera également investiguée. Suite aux résultats obtenus, l'inhibition du clivage par APE1 par cette nouvelle génération de ligands sera évaluée en utilisant une méthode développée pour suivre l'évolution de la coupure des sites abasiques en temps réel par fluorescence.

Dans un second temps, en se basant sur une technique similaire à celle utilisée pour déterminer l'inhibition de l'activité enzymatique, la vitesse de clivage du site abasique par les différents macrocycles sera étudiée. Les différents produits de coupure pourront également être identifiés et quantifiés suite à la réalisation de gels d'électrophorèse. Au cours des études *in vitro*, la formation inattendue d'un adduit entre le site abasique et un ligand pourra être mise en valeur. Des études complémentaires seront alors menées, notamment par spectrométrie de masse, dans le but de déterminer la nature de celui-ci.

En parallèle, la cytotoxicité des macrocycles ainsi que leur potentielle capacité à exacerber celle des agents alkylants TMZ, MMS et BCNU seront évaluées sur des lignées de cellules cancéreuses, permettant de mettre en évidence le potentiel chimio-sensibilisant d'un des macrocycles notamment. Puis afin d'apporter des éléments de réponse quant au mécanisme d'activité des composés 2,7-BisNP *in cellulo*, les dommages engendrés au sein de l'ADN cellulaire suite à une incubation avec les ligands seuls ainsi qu'en combinaison avec les agents alkylants seront évalués par microscopie mais aussi par tests des comètes. Face aux résultats encourageants obtenus et ainsi pour valider les hypothèses, la capacité des cellules à réparer les sites abasiques engendrés par le MMS en présence du ligand prometteur sera évaluée par quantification des sites abasiques au sein de l'ADN génomique. Enfin la pénétration du ligand 2,7-BisNP-NH, présentant le squelette type des ligands macrocycliques, au sein du noyau cellulaire sera également visualisée à l'aide de la technique de la nanoSIMS.

Chapitre I :

Synthèse d'une nouvelle génération de ligands de type naphthalénophane



Dans le but de pouvoir séparer l'activité de clivage de l'activité d'inhibition indirect de l'enzyme APE1, deux familles de composés ont été nouvellement synthétisées (Figure 41). La première famille (en vert) est conçue pour préserver l'activité de clivage des sites abasiques en présentant des groupements nucléophiles (amines) tout en maintenant la capacité d'inhibition de l'activité enzymatique. Dans la seconde famille (en rouge), les groupements nucléophiles ont été masqués à l'aide de fonctions guanidines, méthyles ou encore imidazoliums afin de limiter voire même éliminer totalement l'activité de clivage des macrocycles et ne permettre ainsi que la fixation des ligands sur les sites abasiques. De plus, ces fonctions présentent l'avantage de maintenir la charge cationique des ligands favorisant une bonne interaction avec l'ADN.

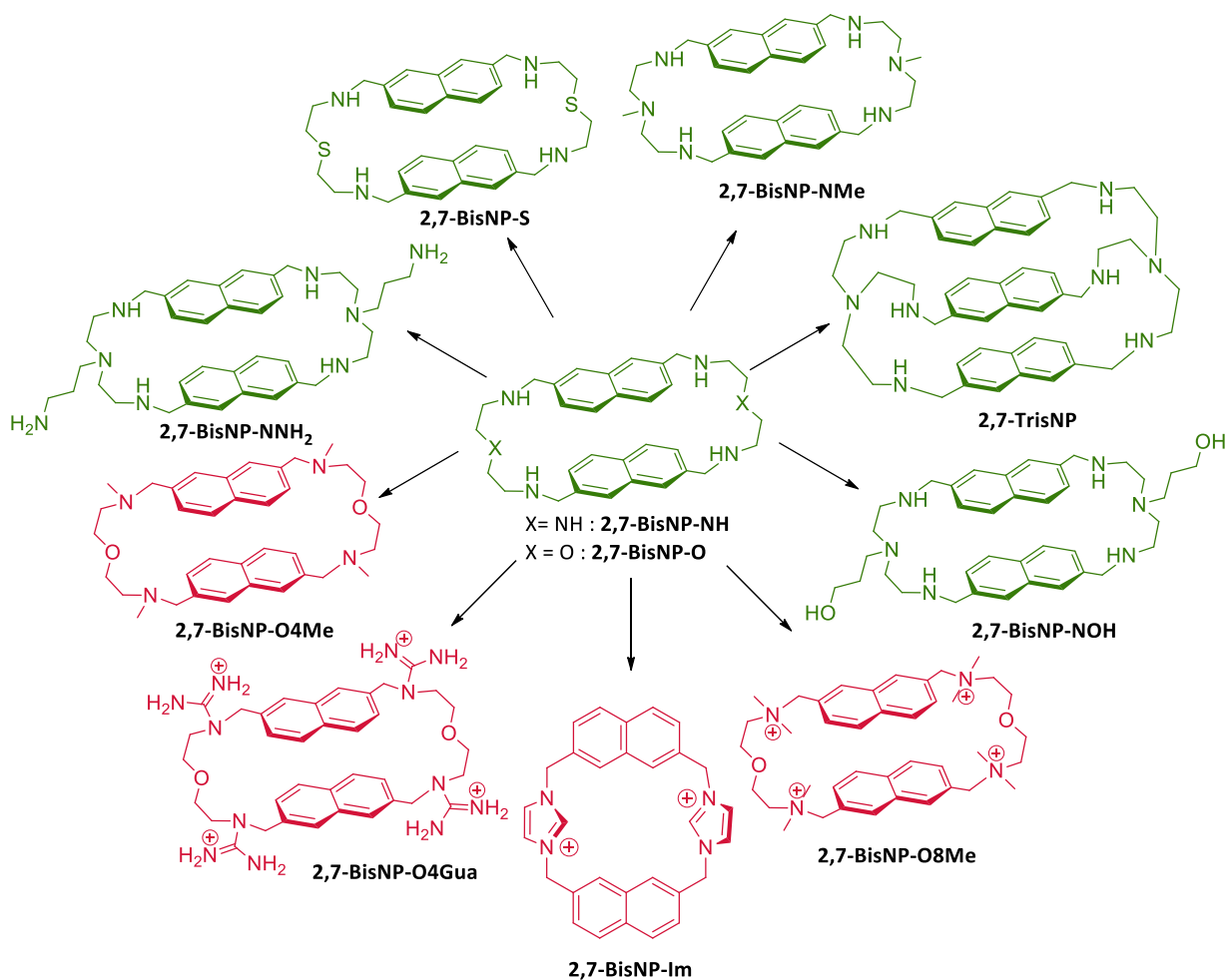


Figure 41- Présentation des deux familles de ligands macrocycliques, en vert les macrocycles pouvant cliver les sites AP, en rouge ceux dépourvus de cette activité.

I- Synthèse des ligands macrocycliques

1- Synthèse de deux intermédiaires réactionnels

La synthèse de tous les macrocycles est effectuée à partir d'un même composé intermédiaire : le 2,7-bis(bromométhyl)naphthalène (**3**) qui pour la synthèse de la plupart des macrocycles est ensuite converti en naphthalène-2,7-dialdéhyde (**4**).

La conception de ces deux intermédiaires est effectuée à partir de 2,7-diméthylnaphthalène (**2**). Cependant, le prix de ce dernier étant relativement élevé, la synthèse de ce composé a été réalisée au laboratoire appuyée sur les conditions décrites dans la littérature.²²⁶ Ainsi la première étape consiste en la formation d'un organomagnésien de Grignard à partir du chlorure de 3-méthylbenzyle et de magnésium dans l'éther à reflux (*Figure 42*). Ce réactif réagit alors rapidement avec le 4,4-diméthoxybutan-2-one pour former un premier intermédiaire **1** avec un rendement de 78%. Ce dernier est engagé dans l'étape suivante sans purification supplémentaire. La cyclodéshydratation est ensuite effectuée en milieu très acide (H₂SO₄/AcOH).

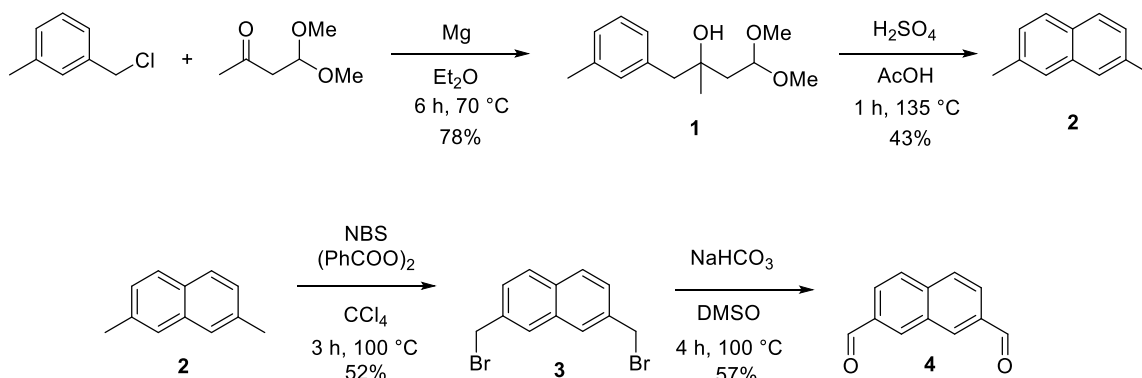


Figure 42- Schéma réactionnel de la synthèse des deux intermédiaires clés **3** et **4** dans la formation des macrocycles.

Le rendement de la cyclodéshydratation n'est que de 43% car deux produits de cyclisation sont obtenus, le produit désiré : le 2,7-diméthylnaphthalène (**2**) mais aussi le 1,6-diméthylnaphthalène (**2'**) (*Figure 43*). Les deux isomères ayant une polarité trop proche, le composé voulu **2** est isolé à la suite d'une recrystallisation dans l'éthanol où seul cet isomère cristallise, favorisé par sa structure symétrique.

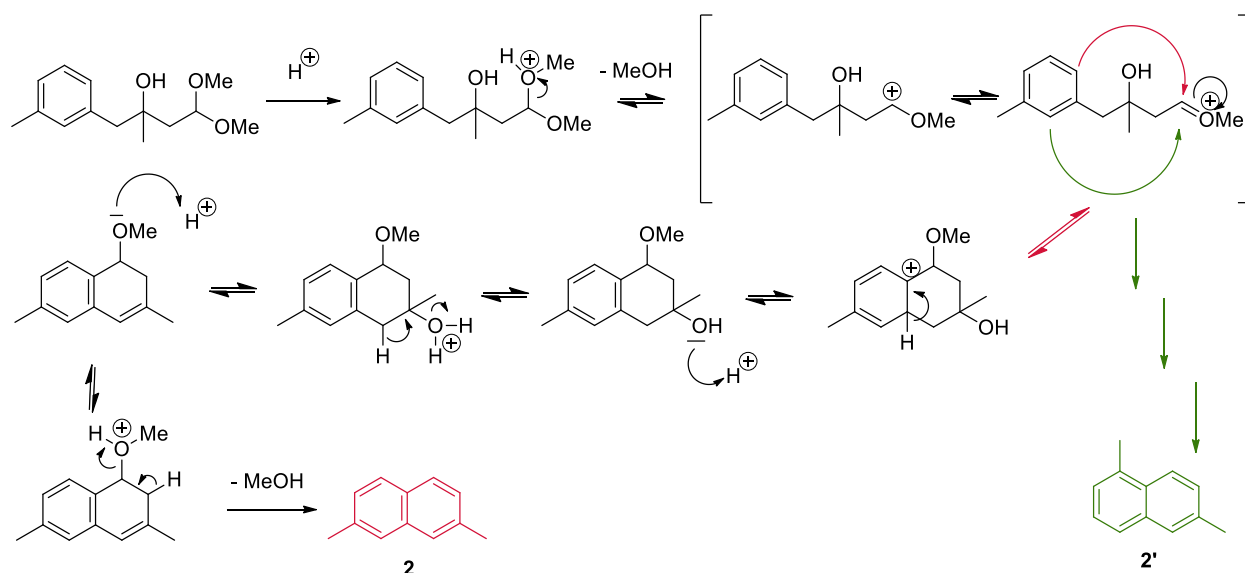


Figure 43- Mécanisme de la cyclodéshydratation du composé 1.

La formation du 2,7-bis(bromométhyl)naphthalène (**3**) est réalisée par réaction de Wohl-Ziegler. Cette réaction de substitution radicalaire donne lieu à une dibromation du composé **2** en présence de peroxyde de benzoyle, l'amorceur radicalaire de la réaction et de *N*-bromosuccinimide après une période de 3 heures à 100 °C. Le 2,7-bis(bromométhyl)naphthalène (**3**) est ainsi obtenu avec un rendement de 45% après une étape de purification par recristallisation.

Pour finir, le naphthalène-2,7-dialdéhyde (**4**) est synthétisé par réaction d'oxydation de Kornblum. Cette réaction initiée par l'attaque nucléophile du DMSO sur un composé halogéné aboutit en présence de bicarbonate de sodium à la formation d'un aldéhyde (Figure 44).

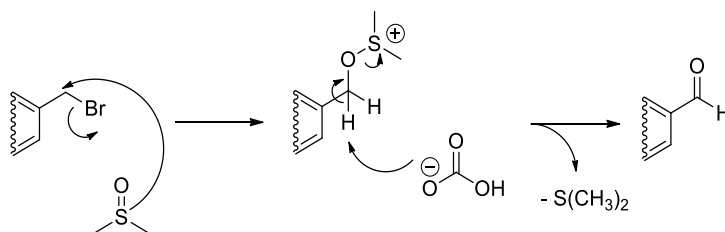


Figure 44- Mécanisme de la réaction de Kornblum.

Ainsi, à la suite de 4 heures à reflux, le naphthalène-2,7-dialdéhyde (**4**) a été obtenu à hauteur de 57% après une étape de purification par chromatographie sur colonne de silice. Ce rendement relativement faible peut être expliqué par la formation au cours de la réaction de trois produits secondaires identifiés (Figure 45, 5-7).

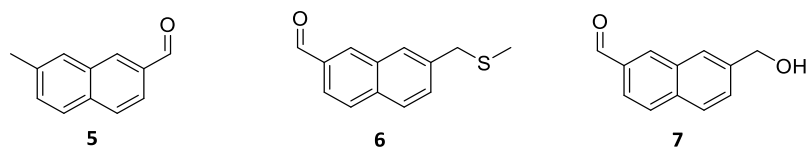


Figure 45- Structure des produits secondaires de la réaction de Kornblum.

La formation du composé **6** peut être expliquée par la substitution nucléophile du diméthylsulfide ($S(CH_3)_2$), formé au cours de la réaction de Kornblum, sur un des groupements bromométhyles du composé **3**. Enfin de façon similaire, la substitution nucléophile d'une molécule d'eau permettrait de former le groupement hydroxyméthyle (composé **7**).

2- Synthèse des cyclophanes

a- Synthèse de la première famille de macrocycles

Tous les composés macrocycliques constituant cette première famille sont porteurs de groupements nucléophiles et devraient ainsi posséder la capacité de cliver les sites abasiques tout en inhibant potentiellement l'activité enzymatique d'APE1.

La première étape de la formation des macrocycles consiste en une réaction de condensation entre les fonctions aldéhydes du naphthalène-2,7-dialdéhyde (**4**) et une diamine correspondante (Figure 46). Afin de favoriser la cyclisation [2 + 2], cette étape est réalisée dans des conditions de haute dilution ($C = 5$ mM) et par ajout très lent du naphthalène-2,7-dicarbaldéhyde dans l'acétonitrile sur la diamine dans l'acétonitrile. Après cinq à sept jours d'agitation à température ambiante, le macrocycle tétra-imine précipite et est récupéré par filtration. Les fonctions imines du composé macrocycle sont ensuite réduites à l'aide d'un large excès de tétrahydroborate de sodium dans un mélange dichlorométhane / méthanol à température ambiante. Le macrocycle est alors purifié par chromatographie sur colonne de silice. Le composé étant très polaire, l'éluant utilisé est un mélange de dichlorométhane / méthanol / ammoniac, avec un gradient montant jusqu'à 4% en ammoniac. La dernière étape permet d'obtenir les différents macrocycles sous la forme de chlorures pour une meilleure solubilité de ceux-ci dans l'eau. Les composés finaux sont ensuite purifiés par recristallisation et sont obtenus sous la forme d'une poudre cristalline.

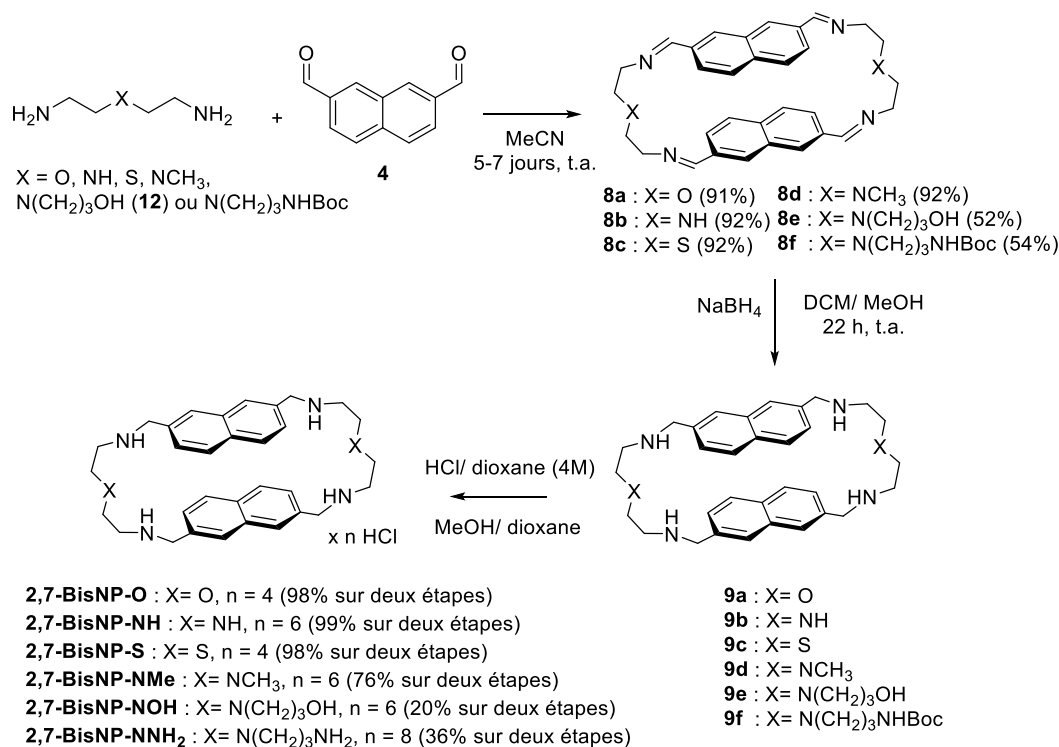


Figure 46- Schéma réactionnel de la synthèse des différents macrocycles pouvant cliver les sites AP.

Il faut noter que, lors de la synthèse du macrocycle 2,7-BisNP-NNH₂, les groupements propanamines sont protégés par des groupements *tert*-butoxycarbonyles au cours de l'étape de cyclisation afin de s'assurer que seuls les deux groupements éthylamines ne réagissent avec le dialdéhyde. Mais lors de l'étape de formation du chlorhydrate, les carbamates se déprotègent en milieu acide afin de restituer les fonctions amines désirées.

La diamine de départ **12** servant à la formation du macrocycle 2,7-BisNP-NOH a été synthétisée au laboratoire, préalablement avant la formation du macrocycle. La première étape de synthèse consiste en l'introduction des groupements phtalimides sur la bis(2-chloroéthyl)amine par substitution nucléophile dans le DMF à 110 °C (Figure 47). Le composé **10** est ainsi obtenu sous la forme d'une poudre blanche avec un rendement de 84%. L'alkylation de l'amine secondaire est ensuite effectuée en présence de bromopropanol dont la fonction alcool est protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBS), dans l'acétonitrile à 90 °C. Le composé **11** est ainsi obtenu avec un rendement de 83%, puis celui-ci est chauffé à reflux en présence d'acide chlorhydrique pendant 18 heures afin de retirer les groupements phtalimides mais également le groupement protecteur TBS présent sur la fonction alcool. Le produit obtenu alors sous forme de chlorhydrate est ensuite mis en contact avec une résine échangeuse d'ions permettant l'obtention du produit désiré **9** avec un rendement de 94%.

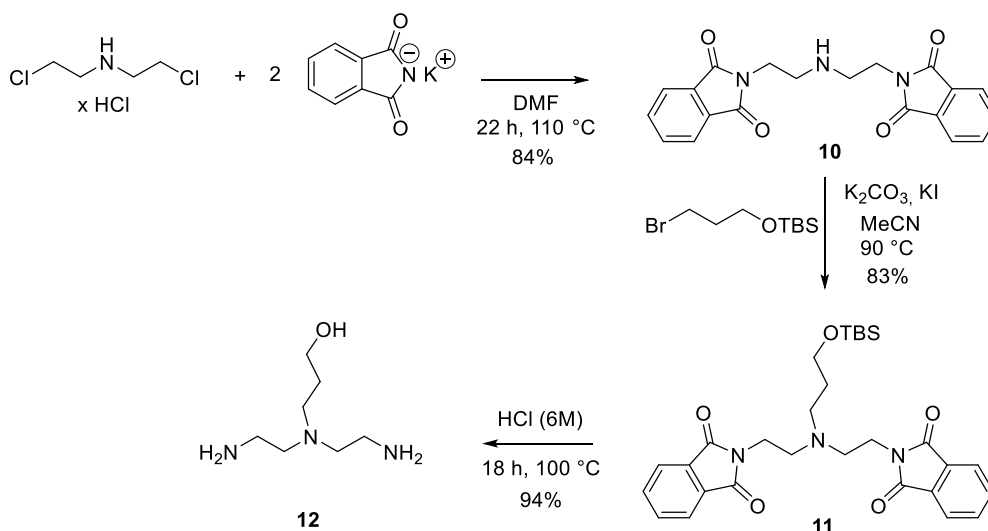


Figure 47- Schéma réactionnel de la formation du composé 12.

La protection (TBS) de la fonction alcool du bromopropanol permet de limiter le nombre de produits secondaires formés, d'augmenter le rendement et facilite ainsi la purification du composé. En effet, la même réaction effectuée avec le bromopropanol n'a pas permis d'isoler le produit désiré à cause de la présence de produits secondaires de polarité trop proche.

Un composé de type 2,7-TrisNP, présentant ainsi trois unités naphthalènes a également été synthétisé (Figure 48, a). L'obtention de ce ligand a été possible en suivant les mêmes étapes que lors de la synthèse des précédents composés de cette famille en partant cependant de trois équivalents de naphthalène-2,7-dicarbaldéhyde et de tri(2-aminoéthyl)amine, comme précédemment développé par le laboratoire.²²⁷

Enfin dans le but d'enrichir la gamme des macrocycles testés, deux composés préalablement décrits²²² et appartenant à des groupes différents ont été synthétisés (Figure 48, b et c). Ainsi, en suivant les mêmes étapes que pour la réalisation du macrocycle 2,7-BisNP-O, le composé 1,5-BisNP-O et le composé 9,10-BisAN ont été synthétisés à partir du naphthalène-1,5-dialdéhyde et de l'anthracène-9,10-dialdéhyde respectivement.

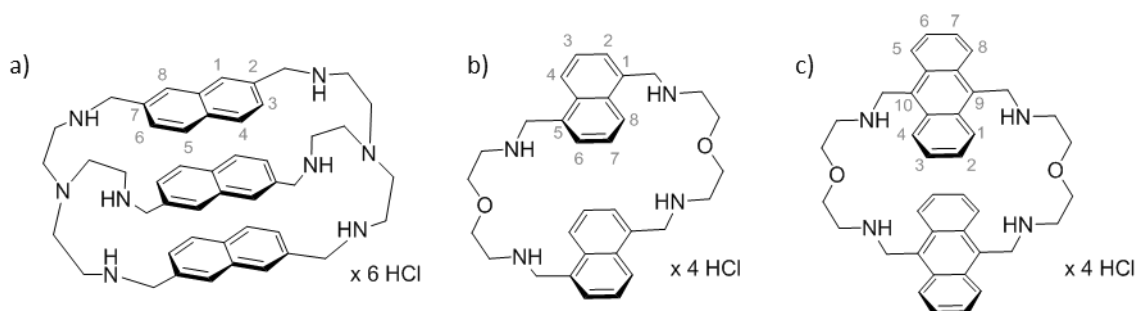


Figure 48- Structure des macrocycles a) 2,7-TrisNP ; b) 1,5-BisNP-O ; c) 9,10-BisAN.

b- Synthèse de la deuxième famille de macrocycles

Les macrocycles de cette dernière famille ont été conçus dans le but d'abolir la capacité des ligands à cliver les sites abasiques, en effet les fonctions nucléophiles de ces derniers ont été masquées, tout en conservant la charge cationique pour favoriser l'interaction avec l'ADN.

Les trois premiers composés de cette famille ont été synthétisés en suivant tout d'abord les deux mêmes étapes que précédemment, conduisant à la formation du 2,7-BisNP-O (*Figure 49*). Le composé 2,7-BisNP-O4Me est à la suite obtenu par réaction d'Eschweiler-Clarke. Cette dernière implique la méthylation des groupements amines du macrocycle 2,7-BisNP-O à l'aide de formaldéhyde dans l'acide formique permettant ainsi d'éviter la perméthylation. Cette réaction à lieu à 120 °C pendant 24 heures et aboutit à l'obtention du produit désiré avec un rendement de 63%, après purification par chromatographie sur colonne de silice. Puis en utilisant les mêmes conditions que celles des précédents macrocycles, le composé est obtenu sous la forme d'un sel de chlorhydrate.

Le produit octo-méthylé est lui synthétisé par méthylation du composé **9b** avec un excès d'iodométhane (80 éq) dans le DMF après 24 heures à 60 °C. Le macrocycle 2,7-BisNP-O8Me est ainsi obtenu sous la forme d'un sel d'iodure avec un rendement de 83%, après purification par recristallisation.

L'ajout des groupements guanidyles sur les macrocycles est effectué tout d'abord par réaction entre le 1,3-bis(*N*-Boc)-2-méthyl-2-thiopseudourée et le macrocycle intermédiaire **9b** dans le dichlorométhane. A la suite de deux jours d'agitation à température ambiante, le composé **14** est obtenu avec un rendement de 84% après purification par chromatographie sur colonne de silice. Puis dans une deuxième étape, les groupements carbamates sont déprotégés en milieu acide pour aboutir au composé désiré, sous la forme d'un sel de chlorure avec un rendement de 37% après purification par recristallisation.

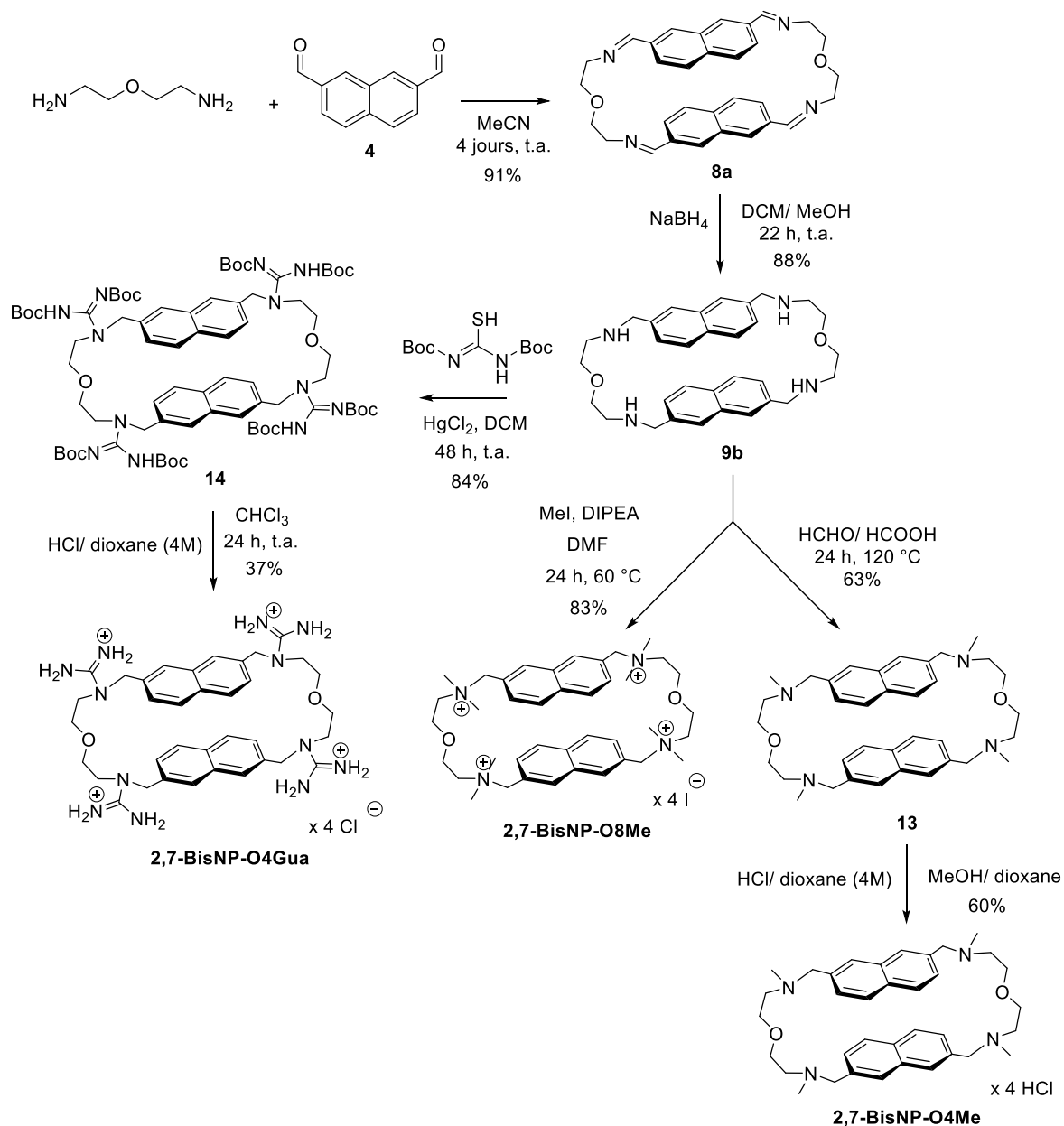


Figure 49- Schéma réactionnel de la formation des macrocycles 2,7-BisNP-O4Me, 2,7-BisNP-O8Me et 2,7-BisNP-O4Gua.

Enfin un dernier composé de type bisimidazolium a été synthétisé. La synthèse de ce type de cyclophane est bien connue dans la littérature.²²⁸ Elle est facilement réalisée par réaction entre un poly(bromométhyl)arène et un poly(azolyméthyl)arène correspondant dans des solvants tels que l'acétone ou l'acétonitrile à température ambiante ou à reflux.

Ainsi le ligand 2,7-BisNP-Im a été réalisé, tout d'abord, à partir du 2,7-bis(bromométhyl)naphthalène (3) et d'imidazole (Figure 50). Le composé 15 est ainsi obtenu après 24 heures à 70 °C avec un rendement de 44% après purification par chromatographie sur colonne de silice. Puis le produit est mis en réaction avec le bis(bromométhyl)naphthalène dans des conditions de haute dilution, afin de former le macrocycle désiré. Après 24 heures dans l'acétonitrile à reflux, un précipité s'est formé,

celui-ci est récupéré par filtration puis recristallisé pour donner le composé final sous la forme d'un sel de bromure avec un rendement de 79%.

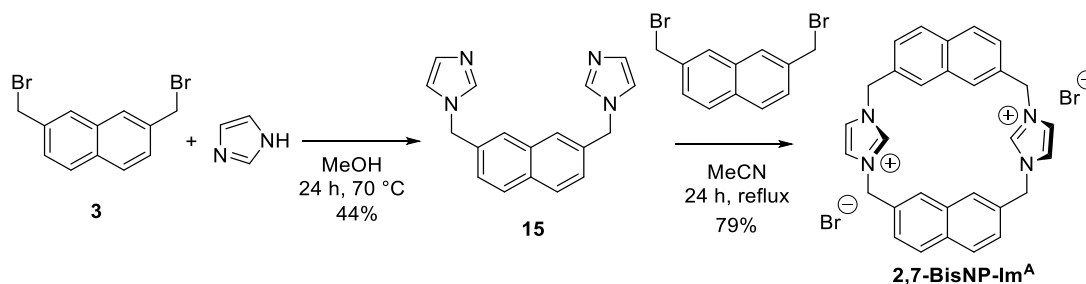


Figure 50- Schéma réactionnel de la formation du macrocycle 2,7-BisNP-Im^A.

Le solvant utilisé au cours de l'étape de cyclisation a montré une grande importance. En effet, si la réaction est effectuée dans l'acétonitrile à reflux, seulement un produit est obtenu (2,7-BisNP-Im^A). Cependant, si la réaction est effectuée dans l'acétone à température ambiante, comme cela est couramment le cas pour ce type de réaction, deux composés se forment alors selon l'analyse par LC-MS. Grâce à leur différence de solubilité dans l'eau et le méthanol, ces derniers ont pu être séparés. Les analyses par LC-MS et ¹H RMN effectuées à la suite ont alors permis de mettre en évidence la formation de deux isomères du macrocycle 2,7-BisNP-Im. En effet les deux composés présentent une masse moléculaire identique (m/z (%): 441,0 (12) [$M - H$]⁺, 221,0 (100) [M]²⁺) tout en affichant des temps de rétention différents (2,7-BisNP-Im^A: t_R = 3,82 min et 2,7-BisNP-Im^B: t_R = 4,00 min) (Figure 51). De plus, les spectres ¹H RMN présentent un profil similaire mais affichent cependant des déplacements chimiques différents (Figure 52). L'isomère 2,7-BisNP-Im^B présentant une solubilité dans le méthanol à chaud a ainsi pu être isolé à hauteur de 22% et l'isomère 2,7-BisNP-Im^A, non soluble dans le méthanol à chaud a alors été obtenu avec un rendement de 21%. Une étude RX a permis de confirmer la structure d'un des isomères : 2,7-BisNP-Im^A (Chapitre I-1-2-d).

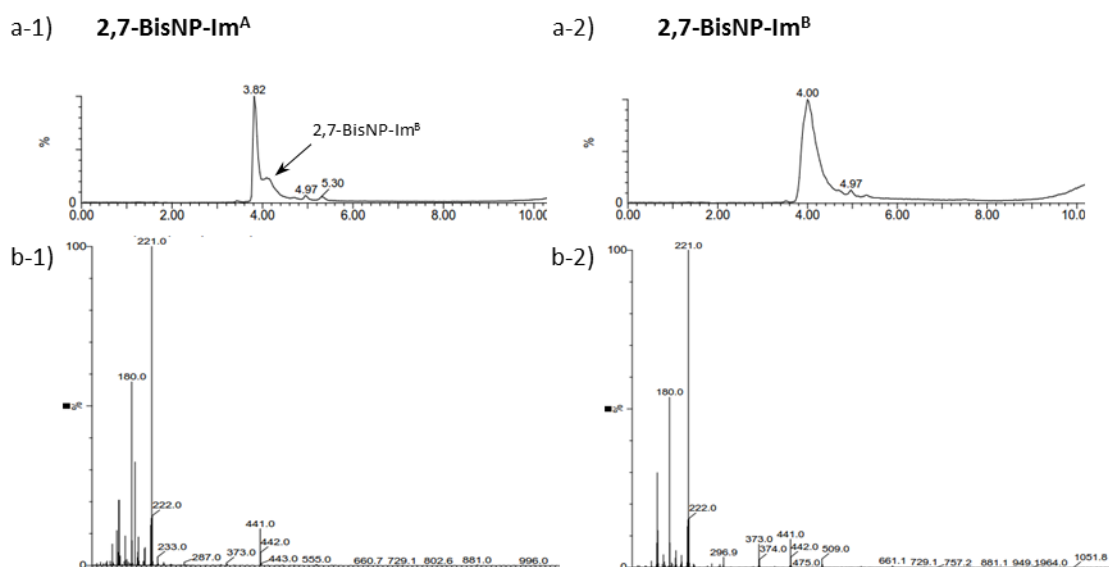


Figure 51- a- Total ion chromatogramme (TIC) : 1) de l'isomère 2,7-BisNP-Im^A; 2) de l'isomère 2,7-BisNP-Im^B; b- Spectre de masse : 1) du pic t_R = 3,82 min correspondant à l'isomère 2,7-BisNP-Im^A; 2) du pic t_R = 4,0 min correspondant à l'isomère 2,7-BisNP-Im^B.

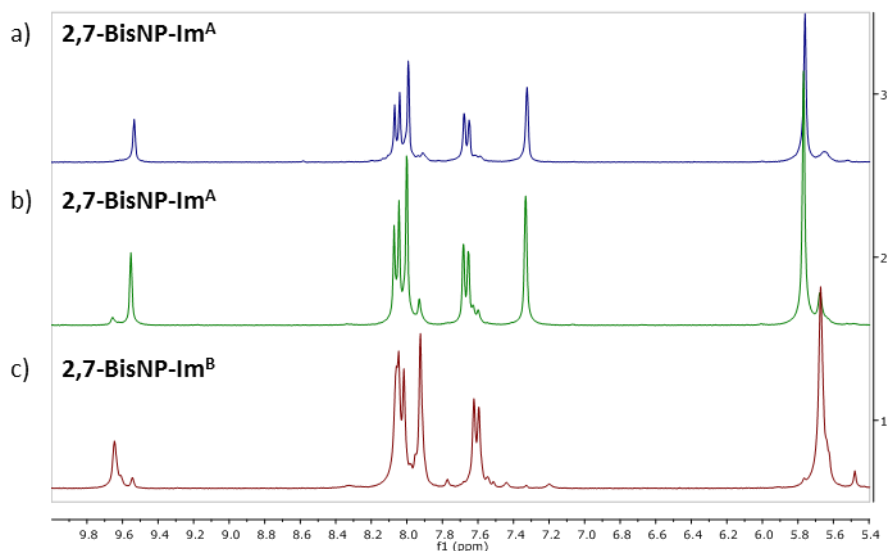


Figure 52- Spectres ^1H RMN obtenus dans le d_6 -DMSO des isomères du macrocycle 2,7-BisNP-Im a) formés dans l'acétonitrile à reflux ; b) et c) formés dans l'acétone à t.a. et séparés par recristallisation fractionnée.

c- Synthèse d'un macrocycle marqué à l'azote ^{15}N

La synthèse du macrocycle 2,7-BisNP-NH marqué par des azotes ^{15}N a été effectuée dans le but de visualiser la présence du composé au sein des cellules en utilisant la technique de la nanoSIMS (*nano-scale secondary ion mass spectrometry*, Chapitre III- II).

La première étape a été la synthèse de la (1,3- $^{15}\text{N}_2$)diéthylenetriamine (Figure 53).

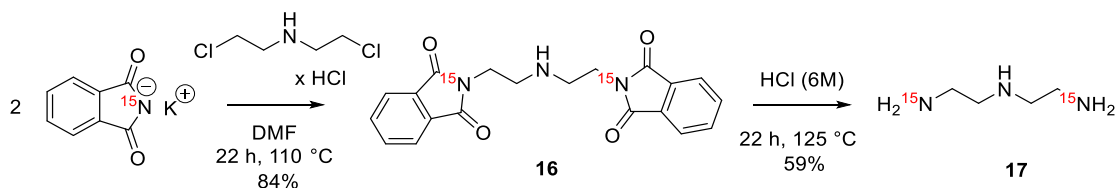


Figure 53- Schéma réactionnel de la formation de la (1,3- $^{15}\text{N}_2$)diéthylenetriamine.

La synthèse de ce composé marqué a été initiée par la réaction de Gabriel entre deux molécules de ^{15}N -phthalimide de potassium et le bis(2-chloroéthyl)amine, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour former le composé **10**. Le produit **16** est récupéré par filtration à la suite d'une précipitation du composé par ajout d'eau glacée dans le milieu en présence de K_2CO_3 , avec un rendement de 84%. La seconde étape consiste en la déprotection des deux fonctions amines. En effet, en présence d'acide chlorhydrique à reflux pendant 22 heures les deux groupements phthalimides sont retirés. Le produit obtenu alors sous forme de chlorhydrate est ensuite mis en contact avec une résine échangeuse d'ions. Ainsi, la diéthylenetriamine marquée, composé **17**, est obtenue avec un rendement de 59%.

La deuxième étape est la formation du macrocycle **18**, celle-ci est effectuée dans les mêmes conditions que pour les précédents composés (Figure 54). Puis le macrocycle ($^{15}\text{N}_4$)-2,7-BisNP-NH est obtenu sous la forme d'un chlorhydrate, après réduction préalable des fonctions imines.

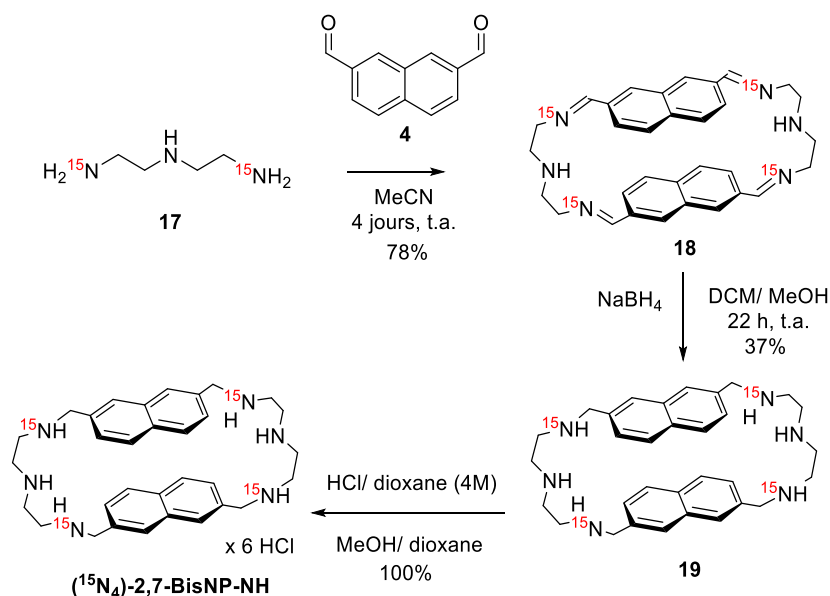


Figure 54- Schéma réactionnel de la formation du macrocycle marqué à l'azote 15.

Comme déjà observé lors de la formation de macrocycles de structure similaire,^{229,230} au cours de l'étape de condensation des imines des isomères du composé **18** sont obtenus selon l'analyse RMN (Figure 55). Cependant, l'étape suivante est engagée sur ce mélange d'isomères car lors de la réduction des fonctions imines, ils aboutissent majoritairement à la formation du composé **19**.

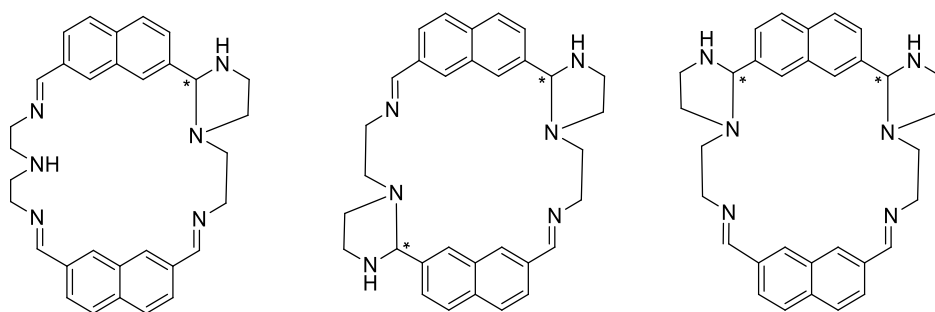


Figure 55- Structure des différents isomères du macrocycle 18.

d- Etudes cristallographiques de deux macrocycles

La formation de cristaux à la suite de la purification par recristallisation des macrocycles 2,7-BisNP-O4Gua x 4 HCl et 2,7-BisNP-Im^A (2 Br⁻) a permis une étude cristallographique par diffraction aux rayons X de la structure de ces composés. Dans le cas du ligand 2,7-BisNP-O4Gua, l'étude a permis de montrer que les unités naphthalènes de ce dernier se placent à l'état solide dans une conformation antiparallèle (Figure 56). De plus, la structure RX du ligand met en valeur la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire (à l'état solide) entre un groupement guanidium protoné de chaque chaîne polyamine avec l'atome d'oxygène présent sur cette même chaîne.

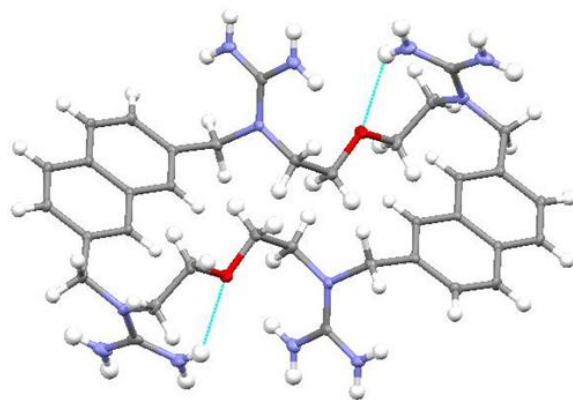


Figure 56- Structure cristallographique obtenue par diffraction aux rayons X du ligand 2,7-BisNP-O4Gua x 4 HCl x 5 H₂O. Les lignes cyan représentent les liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les contre-ions et les molécules de solvants ne sont pas représentés par souci de clarté.

Dans le cas du cyclophane de type imidazolium, les deux groupements naphthalènes sont situés dans un même plan alors que les deux motifs imidazoles, orientés dans une conformation *anti* l'un par rapport à l'autre, sont placés dans deux plans perpendiculaires à celui des unités naphthalènes (Figure 57). Ce macrocycle présente ainsi à l'état solide une géométrie atypique très intéressante. En effet, les unités aromatiques des cyclophanes analogues précédemment décrits dans la littérature²³¹⁻²³³ adoptent très généralement une conformation antiparallèle l'une par rapport à l'autre (et non pas coplanaire). Il est également intéressant de noter qu'à température ambiante le spectre ¹H RMN du composé présente seulement un singulet intégrant pour les protons méthylènes ($\delta = 5,77$ ppm, dans le *d*₆-DMSO ; Figure 57, H^α et H^β représentés en vert). Ainsi, à l'échelle de la RMN les protons H^α et H^β sont équivalents en solution mettant alors en évidence l'interconversion rapide entre les différentes conformations possibles, hypothétiquement suite à la rotation intramoléculaire des noyaux imidazoliums.

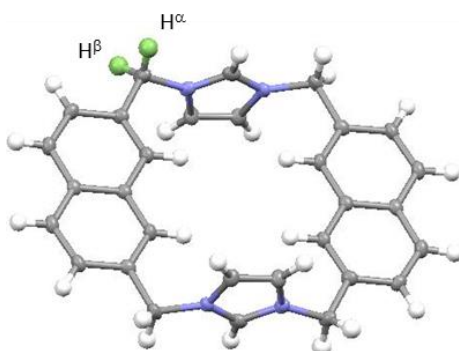


Figure 57- Structure cristallographique obtenue par diffraction aux rayons X du ligand 2,7-BisNP-Im^A (2 Br⁻). Deux protons méthylènes (H^α et H^β) sont représentés en vert. Les contre-ions et les molécules de solvants ne sont pas représentés par souci de clarté.

Hypothétiquement, appuyé sur la structure cristallographique du macrocycle 2,7-BisNP-Im^A, l'isomère 2,7-BisNP-Im^B peut présenter une structure dans laquelle les motifs imidazoles se situeraient dans un plan coplanaire alors que les unités naphthalènes se localiseraient dans deux plans différents perpendiculaires à ce dernier. Les unités naphthalènes pourraient ainsi adopter une

conformation *anti* ou *syn* l'une par rapport à l'autre. En effet, une étude par modélisation moléculaire a permis de mettre en évidence que ces deux configurations représentent des minima énergétiques (Figure 58, a et b).

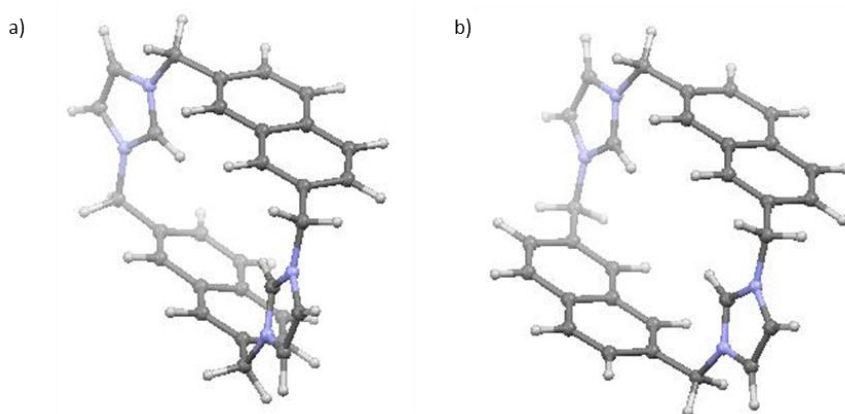


Figure 58- Structures supposées de l'isomère 2,7-BisNP-Im^B obtenues par optimisation de la géométrie moléculaire (DFT ; B3LYP/6-31G**, Schrödinger Maestro v.2018-2) : a) unités naphthalènes en position *syn* ; b) unités naphthalènes en position *anti*. Dans les deux cas, l'absence de fréquences imaginaires témoigne de minima de l'énergie potentielle.

II- Synthèse du complexe de rhodium $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$

Afin de pouvoir comparer les caractéristiques biophysiques, biochimiques et biologiques des ligands macrocycliques avec ceux décrits dans la littérature, la synthèse du complexe de rhodium $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$ décrit par Barton et al.²³⁴ a été reproduite.

La première étape consiste en l'ajout des deux ligands 2,2-bipyridines sur le trichlororhodium en présence d'hydrazine (Figure 59). Cette étape est effectuée dans un mélange H_2O / EtOH à reflux pendant une vingtaine de minutes. Le produit est récupéré par filtration, à la suite d'une cristallisation du complexe après refroidissement du milieu réactionnel, avec un rendement de 40%.

L'acide triflique est ensuite ajouté au composé **20** afin d'échanger les ions chlorures avec des ions labiles (triflates) à température ambiante pendant une nuit. Cette étape est délicate car afin de récupérer le composé **21** une filtration est nécessaire, cependant le produit obtenu est particulièrement instable ainsi cette dernière doit obligatoirement être effectuée sous un flux d'argon. La formation du composé **22** est donc directement effectuée à la suite par ajout d'hydroxyde d'ammonium à reflux pendant une dizaine de minutes. Le rendement sur les deux étapes est alors de 77%.

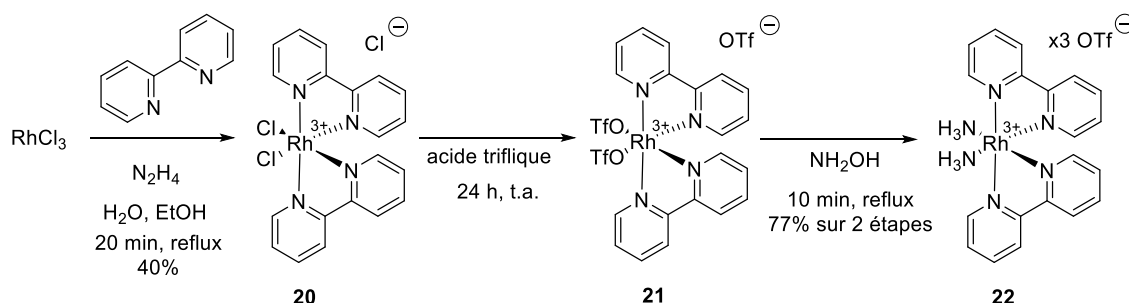


Figure 59- Schéma réactionnel de la formation du complexe $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{NH}_3)_2]^{3+}$.

Au cours de la dernière étape, le ligand chrysène-5,6-dione est introduit sur le complexe afin de former le composé **23** (Figure 60). Cette réaction est effectuée en présence d'hydroxyde de soude dans l'acétonitrile à 40°C sous agitation pendant 3 heures. Le composé **23** est alors obtenu sous forme racémique avec un rendement de 44%.

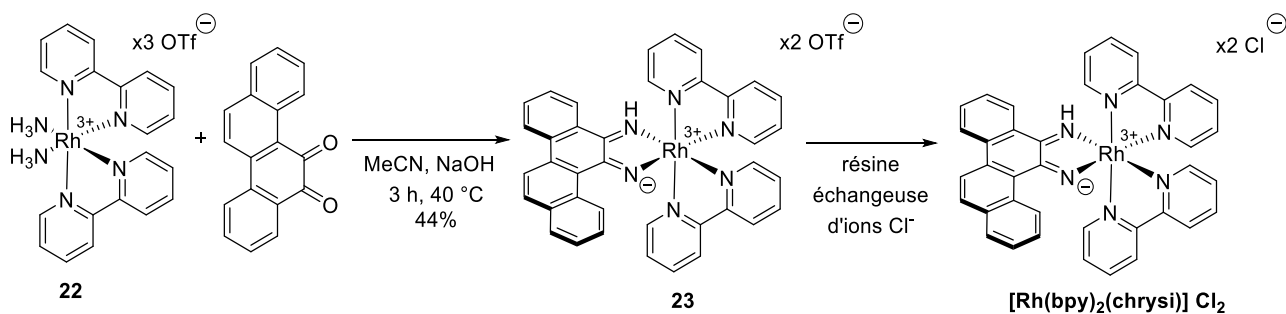


Figure 60- Schéma réactionnel de la formation du complexe $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$.

Afin d'obtenir le produit final sous la forme d'un chlorhydrate, le composé **23** est ensuite mis en contact avec une résine échangeuse d'ions chlorures. A la fin de la synthèse le complexe $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$ est obtenu sous forme racémique, ce qui ne dérange cependant pas pour les tests réalisés ensuite.

Une étude aux rayons X réalisée sur le composé final synthétisé précédemment au laboratoire¹ en suivant la même voie de synthèse a montré l'obtention du produit monoprotoné (*Figure 61*) et non diprotoné comme décrit dans la littérature (*Figure 35*). Cependant on peut supposer que les deux produits donnent la même espèce dans un milieu aqueux tamponné.

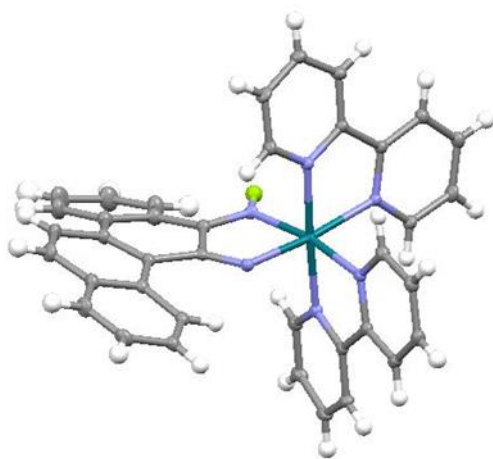


Figure 61- Structure cristallographique obtenue par diffraction aux rayons X du complexe $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{2+}$. Mono-protonation mise en évidence en vert clair.

¹ Cristaux obtenus par Naoko Kotera.

Chapitre II :

Etudes *in vitro* de l'interaction des macrocycles avec les sites abasiques



I- Séquences d'acides nucléiques et composés utilisés au cours des différentes études *in vitro*

Les diverses activités des ligands ont été évaluées sur des séquences d'ADN de synthèse. Les oligonucléotides duplexes utilisés possèdent chacun 17 paires de bases et présentent au milieu de leur séquence soit un analogue du site abasique de type THF (Φ), soit une base uracile (dU) précurseur du site abasique généré par la glycosylase UDG, soit un site abasique (X) ou un mésappariement avec la base alkylée *O*⁶-méthyldeoxyguanosine (^{me}G) (Figure 62).

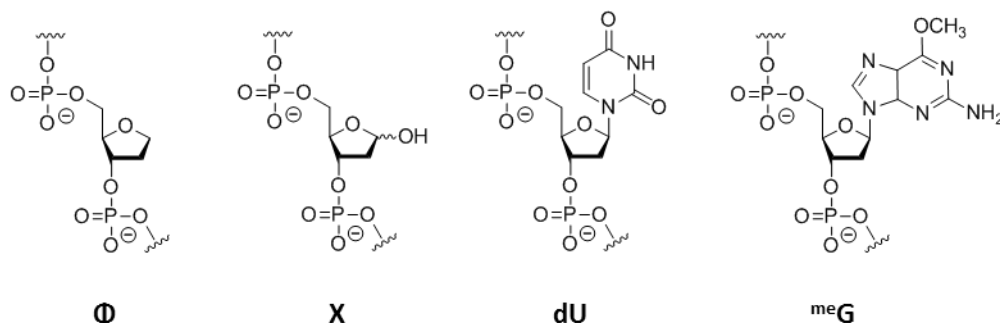


Figure 62- Structure des différents pseudo-nucléotides utilisés.

Un analogue du site abasique de type THF est utilisé car contrairement au site abasique celui-ci est stable. En effet, ne présentant pas de groupement hydroxyle en position 2', ce dernier ne peut subir de clivage de type β -élimination, ce qui permet ainsi d'éliminer pour certaines études la problématique liée au clivage du site abasique par les ligands. Cependant, cet analogue est reconnu et clivé par l'enzyme APE1.²³⁵ Les deux mésappariements étudiés (^{me}GC et ^{me}GT) sont parmi ceux générés à la suite de l'action des agents alkylants de l'ADN utilisés pour le traitement des cancers. En effet, pour rappel les agents alkylants dont notamment le témozolomide introduisent des groupements alkyles entre autre sur la guanine qui est alors appariée avec une cytosine, créant la paire de bases mésappariée ^{me}GC. Puis dans le cas où la voie de réparation MMR (*mismatch repair*) est active au sein de la cellule, celle-ci remplace la cytosine par une thymine, générant la paire de bases mésappariée ^{me}GT (Figure 14). Les différentes séquences utilisées sont présentées dans le Tableau 1.

Dans le cadre des différentes études nécessitant une détection par fluorescence, les oligonucléotides simple-brins porteurs de la lésion ont été marqués en 3' par un extincteur de fluorescence, appelé aussi *quencher* (Q) et les brins complémentaires en 5' par des fluorophores (F). Les extincteurs de fluorescence utilisés sont la rhodamine (TAMRA) ou de type diphényldiazène (DABCYL) couplés à des fluorophores de type fluorescéine (FAM) ou coumarine (ATTO 390) respectivement (Figure 63).

Tableau 1- Séquences et températures de fusion des oligonucléotides utilisés dans les différentes études.^[a]

5'-F- CCAG TTC GNA GTA ACCC-3' 3'-Q- GGTC AAG CYT CAT TGGG-5'			
Acronyme	N ^[b]	Y ^[c]	T _m ⁰ (°C)
17-TΦ	T	Φ	32,0 ± 0,1 ^[d]
17-CΦ	C	Φ	31,9 ± 0,1 ^[d]
17-GΦ	G	Φ	33,7 ± 0,1 ^[d]
17-AΦ	A	Φ	33,8 ± 0,2 ^[d]
17-TA	T	A	45,0 ± 0,1 ^[d]
17-TU	T	dU	n.d.
17-TX	T	X	46,6 ± 0,2 ^[e]
17-me ⁶ GC	me ⁶ G	C	41,4 ± 0,1 ^[d]
17-me ⁶ GT	me ⁶ G	T	38,4 ± 0,3 ^[d]

[a] F = 6-FAM ou ATTO 390 et Q = TAMRA ou DABCYL respectivement ; [b] me⁶G = base alkylée O⁶-méthyldeoxyguanosine ; [c] Φ = analogue au site abasique de type THF, dU = base uracile, X = site abasique naturel ; [d] dans un tampon composé de 10 mM KAsO₂Me₂, 10 mM KCl, pH = 7,2 ; [e] dans un tampon composé de 10 mM KasO₂Me₂, 150 mM KCl, pH = 7,2. Les températures de dénaturation sont la moyenne des résultats de trois expériences.

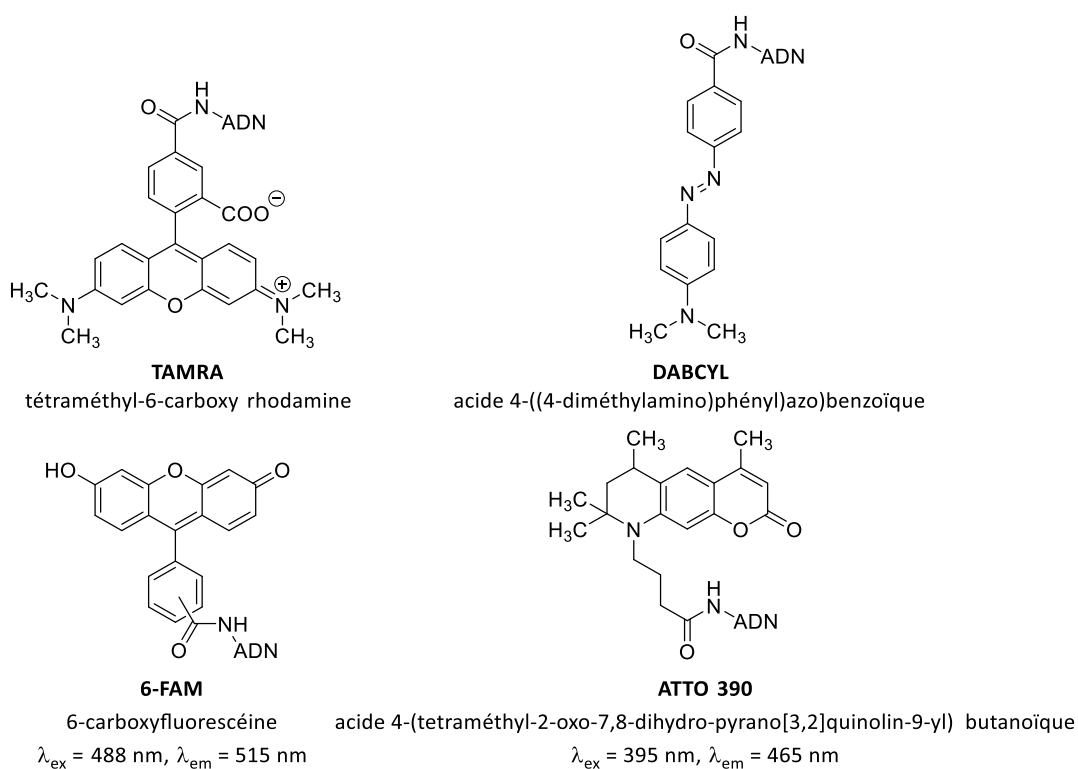


Figure 63- Structure des extincteurs de fluorescence et fluorophores utilisés au cours des études.

L'ADN compétiteur utilisé au cours de certaines études est de l'ADN génomique de veau (ct DNA). Il représente ainsi un modèle de système biologique plus réaliste qu'un oligonucléotide de synthèse.

Les macrocycles utilisés pour les études ont tous été synthétisés au laboratoire ainsi que le complexe de rhodium [Rh(chrysi)(bpy)₂] (*Chapitre I- II*). Pour rappel, ce dernier est connu pour interagir avec les sites abasiques et les bases mésappariées.^{212,236}

Divers composés décrits dans la littérature ont également été utilisés en tant que références afin de valider nos conditions expérimentales mais également pour pouvoir comparer l'activité et évaluer le potentiel des macrocycles :

- Le bromure d'éthidium et le 9-aminoacridine (*Figure 24*) représentent des exemples de ligands affins pour l'ADN mais avec une très faible sélectivité pour les sites abasiques et les mésappariements. En effet, ces composés sont décrits pour s'intercaler de manière non-spécifique entre les bases de l'ADN.²³⁷
- La méthoxyamine (*Figure 33*), étudiée dans certains cas, est connue pour sa capacité à se lier de façon covalente aux sites abasiques en formant une oxime stable et à inhiber de ce fait l'activité d'APE1.¹⁸²
- Le térapeptide Lys-Trp-Lys-Lys (KWKK) et la spermine (*Figure 27*) ont la capacité de cliver le site abasique par un mécanisme de type β -élimination après fixation sur ce dernier.^{145,156} Ces composés représentent ainsi des exemples de ligands clivants qui interagissent donc directement avec les sites abasiques.
- « APE1 inhibiteur III », CRT0044876 et AR03 (*Figure 17*; *Figure 22*) sont des inhibiteurs commerciaux d'APE1 décrits dans la littérature pour interagir de façon directe avec l'enzyme APE1 et ainsi inhiber son activité.^{110,121,131}
- L'acide aurintricarboxylique (ATA) (*Figure 18*), molécule non-spécifique, est connu pour inhiber fortement les protéines interagissant avec l'ADN en formant en solution un polymère anionique qui va alors constituer un leurre pour les enzymes.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Il représente ainsi une référence de ligand se fixant directement sur l'enzyme.

II- Evaluation *in vitro* de l'affinité et de la sélectivité des macrocycles pour les lésions de l'ADN

1- Principe de la technique du FRET-melting

Afin de déterminer l'affinité et la sélectivité des différents ligands pour l'ADN duplexe comportant un site abasique, la capacité des macrocycles à modifier la température de dénaturation de l'ADN a été évaluée par fluorescence. Cette étude est basée sur le principe du FRET-melting.

La technique du FRET-melting repose avant tout sur le principe du FRET ou *Förster-type Fluorescence Resonance Energy Transfer*. Celui-ci consiste au transfert de l'énergie d'excitation d'un fluorophore dit donneur à un accepteur de fluorescence, ce qui résulte en une diminution de la fluorescence du fluorophore donneur concomitante avec l'augmentation de la fluorescence de l'accepteur. L'efficacité de ce transfert d'énergie chute drastiquement avec l'augmentation de la distance séparant le couple donneur-accepteur ainsi le FRET est très généralement utilisé pour des distances de l'ordre de 70 Å.

En 1988, Cardullo et al.²³⁸ utilise pour la première fois le principe du FRET afin de suivre l'hybridation entre deux brins d'ADN complémentaires en solution en fonction de la température. Ils démontrent ainsi que le concept du « FRET-melting » est une méthode sensible et adaptée au suivi de l'hybridation des acides nucléiques. Cette approche est de nouveau utilisée quelques années plus tard, en 1993, par Clegg et al.²³⁹ qui valident également l'utilisation du phénomène de FRET pour la détermination de la température de dénaturation d'un oligonucléotique double-brin en solution.

En pratique, l'ADN est porteur d'un donneur de fluorescence à l'extrémité 5' d'un des brins et d'un accepteur de fluorescence à l'extrémité 3' du brin complémentaire. Lorsque l'ADN est sous sa forme duplexe, les deux fluorophores se retrouvent alors à proximité ainsi la fluorescence du donneur est diminuée (*Figure 64, a*). Lorsque la température augmente, le duplexe d'ADN se dénature par rupture des liaisons hydrogènes entre les deux brins, la distance entre le couple donneur-accepteur augmente ce qui conduit à la restitution de l'intensité de fluorescence du donneur. Le FRET-melting permet ainsi de déterminer la température de dénaturation (T_m) de l'ADN, c'est-à-dire la température de demi-dissociation de l'ADN. Cette température, appelée également température de fusion, est le reflet de la stabilité de l'ADN duplexe. En effet, plus la température de dénaturation est élevée plus l'ADN sera stable.

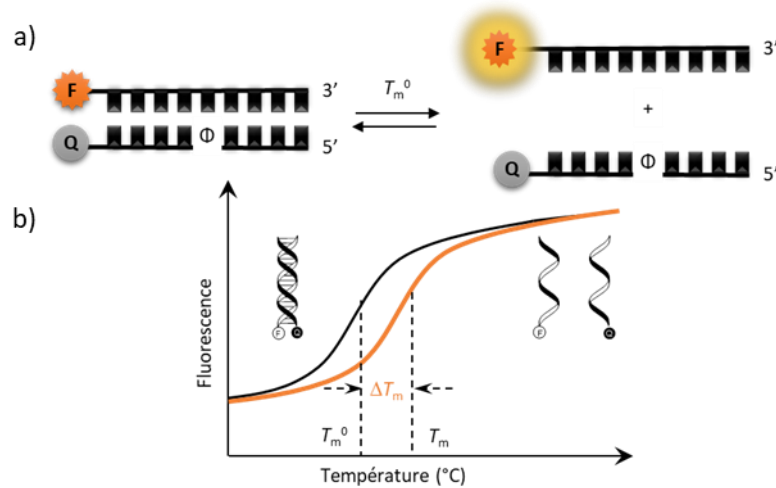


Figure 64- a) Principe de l'extinction de fluorescence par contact ; b) Suivi de l'évolution de la fluorescence en fonction de la température en absence de ligand (courbe noire) et en présence de ligand (courbe orange).

Cependant des études plus récentes^{240,241} ont montré que, dans le cas de l'ADN duplexe, le donneur et l'accepteur de fluorescence sont situés dans un rayon vraiment très restreint, l'oligonucléotide double-brin étant marqué en 5' sur un brin et en 3' sur le brin complémentaire, ainsi la diminution de la fluorescence du donneur n'est pas liée au processus FRET. En effet, ce phénomène est dû à une extinction par contact liée à la formation d'un complexe donneur/ accepteur qui ne permet alors pas d'augmenter l'intensité de fluorescence de l'accepteur. L'accepteur permet seulement de « quencher » la fluorescence du donneur. Le principe reste le même que pour le FRET mais l'étude de l'évolution de l'intensité de fluorescence de l'accepteur n'est donc pas utile car celle-ci ne varie pas. L'utilisation de la notion de « FRET » est donc un abus de langage dans ce cas.

Le phénomène FRET a ainsi été utilisé pour diverses applications telles que la mesure de distances intramoléculaires,²⁴² en enzymologie dans le but d'évaluer l'activité hydrolytique de protéases²⁴³⁻²⁴⁵ mais aussi pour l'étude des différentes structures secondaires des acides nucléiques, comme les jonctions à quatre voies de l'ADN²⁴⁶ ou la formation de l'ADN triple hélice.²⁴⁷ Mais bien que le concept du « FRET-melting » ait été développé en premier lieu pour suivre l'hybridation d'oligonucléotides double-brins, celui-ci trouve ses premières applications dans le suivi de la formation des différentes structures de l'ADN G-quadruplexe.^{248,249} Il faut attendre 2002 pour voir le développement et l'application du principe de « FRET-melting » à une étude plus étendue de l'ADN duplexe, triplex et quadruplexe.²⁵⁰ En effet, Darby et al. développent la technique en l'adaptant à un format permettant le suivi en temps réel et la multiplication du nombre de conditions testées simultanément.

Suite à ce développement, la technique du « FRET-melting » a été optimisée pour l'étude de l'interaction des ligands avec l'ADN permettant des criblages à grande échelle²⁵¹⁻²⁵³ et l'identification de hits rapidement. Le FRET-melting devient alors une méthode simple et efficace pour accéder à la température de dénaturation d'un oligonucléotide et ainsi déterminer l'affinité d'un ligand en évaluant sa stabilisation de l'ADN.

Les affinités des ligands pour l'ADN peuvent ainsi être comparées sur la base du ΔT_m (Figure 64, b). Ce paramètre est calculé par différence entre la température de dénaturation de l'oligonucléotide en présence de ligand (T_m) et celle en absence de ligand (T_m^0). Plus le ligand est affin plus l'ADN est stabilisé ce qui induit une augmentation de la température de dénaturation, conduisant à un ΔT_m élevé. En plus de l'affinité, la sélectivité des ligands peut être également testée en introduisant des compétiteurs à l'ADN non marqué. Si le ligand est peu sélectif de l'ADN testé, celui-ci va s'associer au compétiteur ajouté, la température de dénaturation sera alors plus faible car une quantité moins importante de ligands stabilisera l'oligonucléotide. A contrario, si le ligand est sélectif, la température de dénaturation doit rester inchangée en présence de compétiteur.

Enfin, l'oligonucléotide bien apparié peut également être utilisé afin de contrôler la sélectivité des ligands pour la lésion étudiée. En effet, en plus de présenter une baisse de température de dénaturation en présence d'ADN compétiteur, les ligands moins sélectifs doivent conduire également à une stabilisation de l'ADN bien apparié.

En comparaison avec d'autres techniques comme l'UV-melting, le FRET-melting est une technique sensible qui ne nécessite pas l'utilisation d'une quantité importante d'oligonucléotides. De plus, la présence d'ADN compétiteur n'interfère pas avec le suivi de l'intensité de fluorescence car celui-ci n'est pas marqué. Dans le cas d'une étude par UV-melting, l'ADN compétiteur ne peut pas être utilisé car l'absorbance de celui-ci, présent en grande quantité, masque l'absorbance de l'oligonucléotide testé. Enfin cette technique présente l'avantage de permettre l'évaluation d'un grand nombre de conditions simultanément.

Cependant il est important de noter qu'un artefact peut être possiblement observé avec cette méthode dans le cas où les ligands étudiés se lient également à l'ADN simple brin. En effet, les ligands présentant une affinité pour l'oligonucléotide simple brin vont conduire à la déstabilisation de l'ADN duplexe induisant alors des ΔT_m négatifs, si cette affinité est supérieure à celle de l'ADN double brin, ou égale à zéro, si elle est de même ordre.

2- Détermination des conditions expérimentales

Différentes études comparatives de l'affinité des macrocycles de première génération (2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O) mais également de quelques ligands ciblant les sites abasiques et les mésappariements ont été effectuées précédemment au laboratoire cependant le tampon d'étude présentait alors un pH de 6,0.^{222,224} Dans le cadre de cette nouvelle étude, il a été choisi de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques, ainsi le pH du tampon a été ajusté à 7,2. Les paramètres de l'étude (composition du tampon, nombre d'équivalents de ligand et d'ADN compétiteur) ont donc été réévalués afin de déterminer les conditions optimales.

Dans le protocole utilisé, les oligonucléotides sont chauffés de 25 °C à 90 °C avec une augmentation de 0,5 °C / minute et l'intensité de fluorescence du fluorophore FAM est collectée (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 515 nm). Les températures de dénaturation des oligonucléotides ont été déterminées par dérivée première des courbes de fluorescence en fonction de la température.

Dans un premier temps, l'évolution du ΔT_m en fonction de la force ionique du tampon a été évaluée. Ainsi, les températures de dénaturation de l'oligonucléotide 17-T Φ en présence ou non du ligand 2,7-BisNP-O ont été mesurées dans des solutions de cacodylate de potassium (10 mM) contenant une concentration croissante de potassium (10 à 100 mM de KCl). L'influence de la présence de magnésium (1 mM) dans le tampon a également été étudiée (Figure 65).

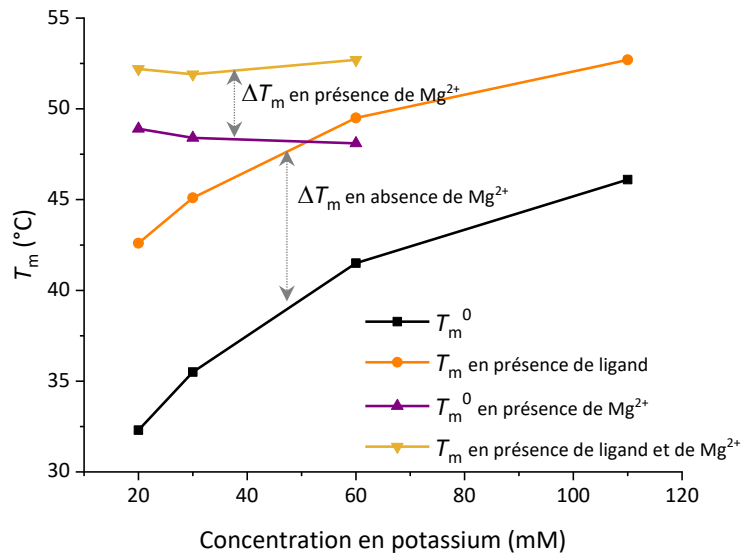


Figure 65- Evolution de la température de fusion de l'oligonucléotide 17-T Φ en fonction de la concentration en potassium en présence ou en absence de Mg^{2+} et du ligand 2,7-BisNP-O dans le tampon d'étude.

Au cours de l'étude, il a pu être constaté que le magnésium stabilise fortement l'ADN, en effet l'oligonucléotide affiche une température de fusion plus élevée dans des solutions contenant du magnésium conduisant alors à un effet du ligand plus faible ($\Delta T_m \approx 4$ °C) par comparaison avec les solutions sans magnésium. Ainsi, la présence de magnésium ne permet pas d'évaluer correctement les différences de stabilisation de l'ADN induites par les ligands. Il en est de même pour une forte concentration en potassium, l'oligonucléotide présente un ΔT_m faible dans le tampon contenant 100 mM de chlorure de potassium. A la suite de ces constatations différentes conditions ont été testées, en faisant varier entre autre le nombre d'équivalents de compétiteur par rapport à l'oligonucléotide, celles-ci sont résumées dans la Figure 66.

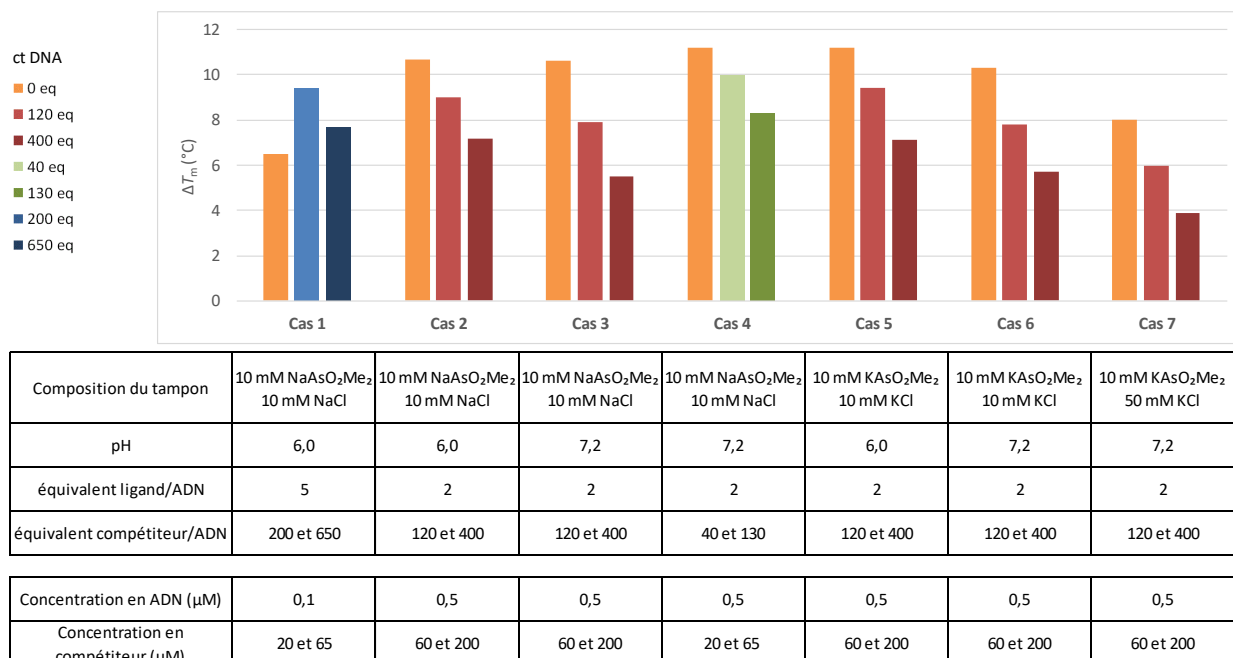


Figure 66- Evaluation des conditions expérimentales avec le ligand 2,7-BisNP-O pour l'étude par FRET-melting.

Le cas n°1 reproduit les conditions d'études publiées.²²⁴ L'augmentation du ΔT_m en présence de compétiteur peut s'expliquer par le fait qu'en absence de compétiteur l'excès de ligand stabilise le simple brin d'ADN ce qui provoque la déstabilisation de l'ADN duplexe. La présence du compétiteur élimine cet effet conduisant alors à une augmentation de la stabilisation de l'ADN duplexe étudié. Ainsi, le nombre d'équivalents de ligand a été diminué à deux afin de limiter l'effet lié à la stabilisation du simple brin et de mieux décrire l'affinité du ligand pour l'ADN double brin portant un site abasique. De plus, les températures de dénaturation et ainsi les ΔT_m étant plus élevés en présence d'une quantité plus importante d'ADN, la concentration en ADN de travail a donc été fixée à 0,5 μM. Dans le milieu intracellulaire, la concentration en potassium est beaucoup plus importante que celle en sodium, environ dix fois plus, ainsi l'étude est réalisée dans un tampon de cacodylate de potassium. Cependant comme le montre les cas n° 2 et n° 5 ainsi que les cas n° 3 et n° 6, la nature de l'ion n'a que très peu d'influence sur l'effet de stabilisation de l'ADN par les ligands et ce à pH 6,0 ou 7,2. L'étude des cas n°6 et n°7, où seule la concentration en potassium varie, permet de remettre en valeur la stabilisation de l'ADN duplexe par les ions potassium ce qui contribue à diminuer les ΔT_m et masque ainsi l'effet stabilisant des ligands. Enfin, le cas n°4 présente les mêmes concentrations en compétiteur que lors de la précédente étude, cependant la concentration en oligonucléotide étant augmentée, le nombre d'équivalents de compétiteur par rapport à l'ADN est ainsi de 40 et 130 équivalents. Les ΔT_m obtenus lors de ce cas, en présence et en absence de compétiteur, ont paru adaptés pour refléter au mieux l'affinité et la sélectivité de nos ligands. En effet, les ΔT_m sont élevés et une faible perte de stabilisation en présence de compétiteur est observée.

L'étude des ligands a donc été effectuée dans les conditions suivantes (non présentées sur la figure 66):

- Solution tampon à pH 7,2 constituée de cacodylate de potassium à 10 mM et de chlorure de potassium à 10 mM,
- Concentration en oligonucléotide de 0,5 μ M,
- Deux équivalents de ligand par oligonucléotide,
- Concentration en ADN compétiteur de 20 μ M et 65 μ M en paires de bases, soit 40 et 130 équivalents par rapport au site abasique.

3- Résultats

a- Etudes de l'affinité et de la sélectivité des ligands macrocycliques

Les mesures de la stabilisation induite par les naphthalénophanes ont permis de mettre en évidence qu'une grande majorité des macrocycles présente une forte affinité pour les sites abasiques, en effet les valeurs des ΔT_m sont relativement élevées (Figure 67). Cependant, une différence d'affinité entre les sites abasiques de type apurinique, dont la base manquante est une purine, et les sites abasiques de type apyrimidinique, dont la base manquante est une pyrimidine, a été observée.

En effet, la stabilisation induite par les ligands sur les sites apuriniques est plus importante, ΔT_m plus élevés, que celle des sites apyrimidiniques. Ainsi la majorité des macrocycles affiche une affinité suivant le schéma : 17-T Φ > 17-C Φ > 17-G Φ > 17-A Φ . Cette constatation peut être mise en relation avec le fait que les sites apuriniques déstabilisent plus fortement l'oligonucléotide, les températures de dénaturation étant plus faibles (Tableau 1), les ligands peuvent ainsi plus aisément induire une stabilisation de ces séquences.

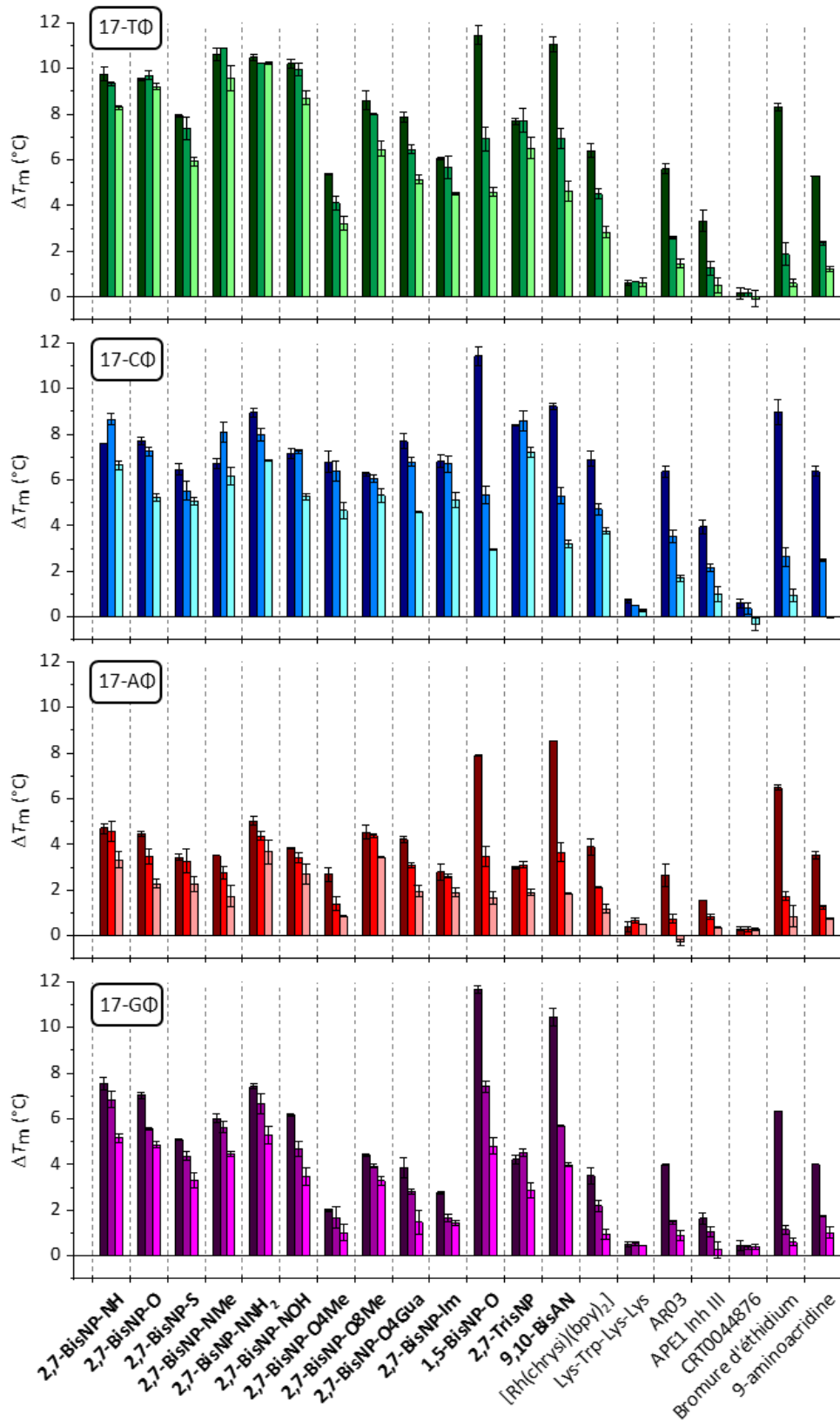


Figure 67- Stabilisation induite par les ligands (ΔT_m) sur les oligonucléotides 17-NΦ (N = T, C, A, G), en absence (barre foncée) ou en présence d'ADN compétiteur (barre médium : 20 μM bp soit 40 eq, barre claire : 65 μM bp soit 130 eq). Conditions : [oligonucléotide]= 0,5 μM , [ligand]= 1 μM dans le tampon KAsO_2Me_2 10 mM, KCl 10 mM, pH = 7,2. Chaque condition a été évaluée en triplicata.

Au cours de cette étude, il a également été démontré qu'aucun des ligands de la série 2,7-BisNP ne stabilise l'oligonucléotide bien apparié (17-TA), en contraste avec les intercalants de l'ADN : le bromure d'éthidium et le 9-aminoacridine (Figure 68). En revanche, les ligands 1,5-BisNP-O et 9,10-BisAN affichent eux un comportement semblable aux intercalants. Les résultats obtenus avec le ligand 1,5-BisNP-O mettent en évidence l'importance de la position des chaînes polyamines au niveau des unités naphthalènes tandis que le ligand 9,10-BisAN, en présentant des unités anthracènes, souligne l'influence de la nature des unités aromatiques. Ainsi seuls les ligands de la série 2,7-BisNP présentent une très bonne sélectivité pour les sites abasiques. Ces constatations sont appuyées par la faible perte de stabilisation des oligonucléotides porteurs des sites abasiques induite par ces ligands en présence d'ADN compétiteur, contrairement aux ligands 1,5-BisNP-O et 9,10-BisAN ainsi qu'aux intercalants de l'ADN, où une chute drastique de la stabilisation est observée lors de l'ajout d'ADN compétiteur. Il est également intéressant de relever que les ligands 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-O8Me et 2,7-TrisNP affichent une déstabilisation de l'ADN bien apparié, visible par les $\Delta T_m < 0$ °C observés en absence d'ADN compétiteur. Cette déstabilisation, rapidement abolie en présence d'ADN compétiteur, peut traduire une affinité de ces ligands pour l'ADN simple-brin.

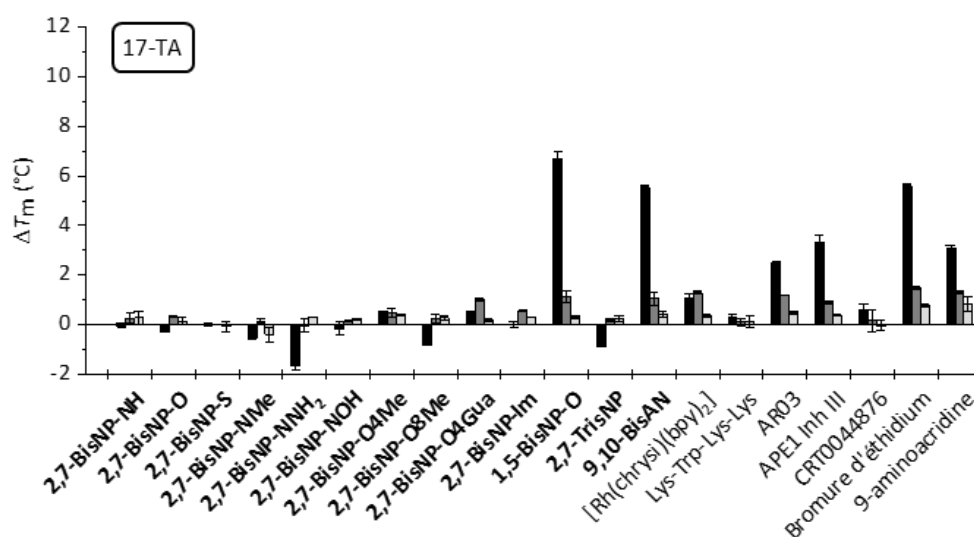


Figure 68- Stabilisation induite par les ligands (ΔT_m) sur l'oligonucléotide bien apparié (17-TA), en absence (barre foncée) ou en présence d'ADN compétiteur (barre médium : 20 μ M bp soit 40 eq, barre claire : 65 μ M bp soit 130 eq). Conditions : [oligonucléotide]= 0,5 μ M, [ligand]= 1 μ M dans le tampon KAsO₂Me₂ 10 mM, KCl 10 mM, pH = 7,2.

D'un point de vue structural, les macrocycles présentant des substituants sur l'atome d'azote au centre de la chaîne polyamine (2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH) induisent une stabilisation égale voire même supérieure à celle induite par le ligand 2,7-BisNP-NH sur tous les substrats de type site abasique. Une excellente sélectivité peut également être remarquée en présence d'ADN compétiteur. Ces constatations mettent en évidence que la présence de substituants au milieu de la chaîne polyamine n'a pas d'impact sur l'interaction des ligands avec le site abasique, cependant la nature de l'atome central peut influencer la stabilisation. En effet la présence d'un atome de soufre (2,7-BisNP-S) à la place d'un atome d'azote diminue l'affinité du macrocycle ainsi que sa sélectivité par comparaison avec le ligand 2,7-BisNP-NH. Mais cette perte de stabilisation n'est pas observée lors du remplacement avec un atome d'oxygène (2,7-BisNP-O).

La variété structurale des macrocycles a permis également d'étudier l'influence de la présence de différents substituants sur les fonctions amino benzyliques des chaînes polyamines (2,7-BisNP-O4Me ; 2,7-BisNP-O8Me ; 2,7-BisNP-O4Gua). Il a ainsi été constaté que la stabilisation induite par ces ligands était inférieure à celle du ligand 2,7-BisNP-NH, principalement sur les séquences 17-TΦ ($\Delta T_m^{T\Phi} \leq 8 \text{ °C}$) et 17-GΦ ($\Delta T_m^{G\Phi} \leq 4 \text{ °C}$). Cette perte d'affinité est plus prononcée dans le cas du ligand 2,7-BisNP-O4Me qui présente alors une stabilisation environ deux fois moins importante que la majorité des autres macrocycles notamment sur les séquences 17-TΦ et 17-GΦ. Ces observations sont en accord avec le modèle structural établi de la liaison du ligand 2,7-BisNP-O avec un mésappariement de type TT (*Figure 39*).²²³ En effet, celui-ci suggère que la présence de substituants sur les groupements amino benzyliques empêche la formation de liaisons hydrogènes entre les amines protonées du ligand et les groupements carbonyles présents sur les guanines et thymines, réduisant alors l'affinité du macrocycle.

Enfin, les ligands 2,7-BisNP-Im et 2,7-TrisNP affichent des affinités ainsi que des sélectivités comparables à celle des ligands substitués sur les fonctions amino benzyliques, malgré des structures différentes. La stabilisation induite par le ligand 2,7-BisNP-Im suggère une interaction de celui-ci avec le site abasique dans une conformation différente que celle observée à l'état solide (*Figure 57*), permettant ainsi l'insertion d'une des unités naphthalènes dans la poche du site abasique comme dans le cas des autres macrocycles. En ce qui concerne le ligand 2,7-TrisNP, celui-ci présente une structure proche des métallohélices décrits dans la littérature pour stabiliser les sites abasiques [$\text{Fe}_2\text{L}^{1a}_3\text{Cl}_4$, *Figure 34*],²⁰⁴ ainsi la bonne affinité obtenue pouvait être prévisible. Cependant, le mode d'interaction du ligand 2,7-TrisNP mais également des métallohélices n'est pas élucidé.

Les résultats de stabilisation obtenus sur les oligonucléotides porteurs des mésappariements 17-^{me}GC et 17-^{me}GT montrent que l'affinité des macrocycles pour ce type de lésion de l'ADN est moins importante que celle affichée pour les sites abasiques (*Figure 69*). En effet, les valeurs de ΔT_m sont plus faibles : les ligands n'induisent une stabilisation que de l'ordre de 3 °C pour le mésappariement 17-^{me}GT et que d'environ 1 °C pour le mésappariement 17-^{me}GC. De cette étude, aucun ligand ne ressort, seul le ligand 2,7-BisNP-O8Me apparaît comme le macrocycle le plus affin et sélectif à ces mésappariements, cependant les valeurs de stabilisation restent assez faibles ($\Delta T_m \approx 3 \text{ °C}$). Le ligand 2,7-BisNP-O4Gua affiche lui un comportement semblable aux intercalants de l'ADN, en présentant une perte de stabilisation en présence d'ADN compétiteur, tout comme les ligands 1,5-BisNP-O et 9,10-BisAN. Cependant le manque de sélectivité de ce ligand n'est pas aussi marquant sur les séquences portant un site abasique.

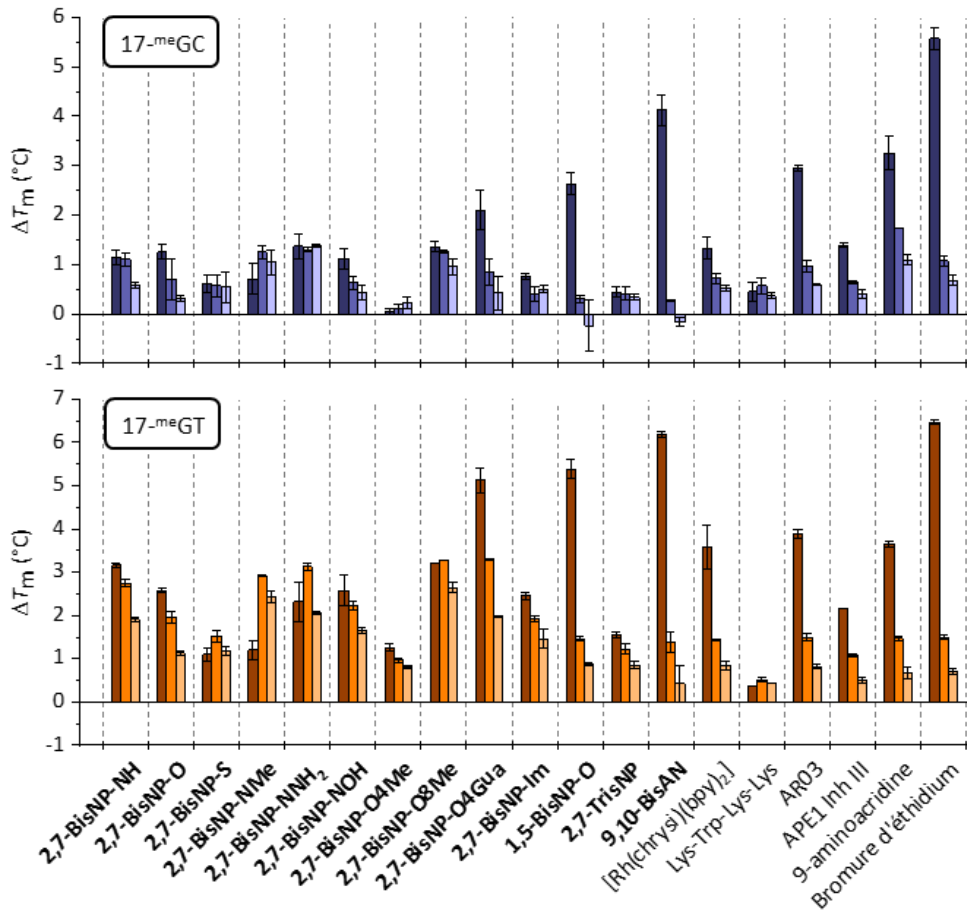


Figure 69- Stabilisation induite par les ligands (ΔT_m) sur les oligonucléotides 17-^{me}GN (N= C ou T), en absence (barre foncée) ou en présence d'ADN compétiteur (barre médium : 20 μ M bp, barre claire : 65 μ M bp). Conditions : [oligonucléotide]= 0,5 μ M, [ligand]= 1 μ M dans le tampon KAsO₂Me₂ 10 mM, KCl 10 mM, pH = 7,2.

b- Comparaison de l'affinité des macrocycles avec quelques ligands de la littérature

Dans un second temps, l'affinité et la sélectivité de quelques ligands décrits dans la littérature pour interagir avec les sites abasiques ou avec l'activité d'APE1 ont été évaluées.

Dans les conditions de notre étude, le complexe [Rh(chrysi)(bpy)₂] présente une affinité notable envers les sites abasiques et les mésappariements, en accord avec la littérature.^{212,236} Cependant, celle-ci s'avère moins importante que l'affinité présentée par la grande majorité des macrocycles. De plus la sélectivité affichée est également relative, en effet ce complexe de rhodium ne présente pas de forte stabilisation de l'ADN bien apparié ($\Delta T_m \approx 1$ °C) mais une chute de la stabilisation des oligonucléotides porteurs notamment d'un site AP est observée en présence d'ADN compétiteur. Ce complexe s'avère ainsi être moins sélectif et affiné que la grande majorité des ligands macrocycliques. Les données présentent également que le térapeptide Lys-Trp-Lys-Lys (KWKK) n'induit pas de stabilisation des oligonucléotides porteurs ou non des différentes lésions. Ainsi, bien que connu pour sa capacité à cliver les sites abasiques,¹⁴⁵ il ne présente pas d'affinité particulière envers les séquences étudiées.

Enfin, malgré que les ligands AR03 et « APE1 inhibiteurs III » soient décrits dans la littérature pour interagir directement avec le site actif de l'enzyme APE1,^{121,131} ils affichent ici un comportement semblable aux intercalants de l'ADN. En effet ces composés présentent une affinité notable sur les oligonucléotides porteurs d'une lésion, mais qui reste néanmoins plus faible dans la plupart des cas que celle présentée par les macrocycles, mais la stabilisation induite décroît très rapidement en présence d'ADN compétiteur. Ce manque de sélectivité est également corroboré par la stabilisation induite par ces ligands sur l'oligonucléotide bien apparié. En ce qui concerne le composé AR03, la similarité entre sa structure et celle de l'intercalant 9-aminoacridine pouvait laisser présager ce comportement.

Pour finir, les résultats obtenus témoignent d'une absence d'interaction notable du composé CRT0044876 avec les sites abasiques mais également plus généralement avec l'ADN. En effet, celui-ci n'induit pas de réelle stabilisation de l'oligonucléotide bien apparié. Cette constatation est ainsi en faveur d'une inhibition de l'activité d'APE1 à la suite d'une interaction directe avec l'enzyme comme supposée dans la littérature par modélisation.¹¹⁰

III- Evaluation *in vitro* de l'inhibition du clivage enzymatique des sites abasiques par APE1

1- Principe de la méthode et évaluation des conditions expérimentales

Afin d'étudier l'inhibition de l'activité d'APE1 par les différents ligands, un suivi en temps réel du clivage enzymatique du site AP par fluorescence en présence des macrocycles a été effectué, inspiré d'une méthode précédemment employée au laboratoire ainsi que de la littérature.^{225,254} Ainsi pour évaluer l'inhibition du clivage enzymatique de l'ADN, l'oligonucléotide utilisé est porteur d'un fluorophore donneur à l'extrémité 5' d'un brin ainsi que d'un extingteur de fluorescence à l'extrémité 3' du brin complémentaire. Lorsque l'ADN est sous forme duplexe la fluorescence du donneur est diminuée due au phénomène d'extinction par contact, sur le même principe que celui observé lors du FRET-melting. Le clivage du site abasique présent sur l'oligonucléotide par APE1 entraîne alors la dénaturation de l'ADN (à 37 °C dans les conditions de l'étude) et ainsi, le transfert d'énergie ne pouvant alors plus s'opérer entre l'extingteur de fluorescence et le fluorophore donneur, l'augmentation de la fluorescence de ce dernier peut être mesurée.

L'oligonucléotide utilisé pour cette étude est porteur d'un site abasique de type THF (17-TΦ) comme lors de l'étude par FRET-melting afin de s'affranchir du clivage potentiel du site abasique par les ligands. Ainsi seul le clivage de l'oligonucléotide par APE1 entraîne une augmentation de fluorescence, cependant si le ligand inhibe l'activité de l'enzyme en masquant le site abasique cette augmentation est limitée voire même inexistante (Figure 70). Ainsi l'augmentation de l'intensité de fluorescence, reflétant le clivage du site abasique par APE1, a été suivie en temps réel. La vitesse initiale de clivage du site abasique (v_0) par l'enzyme APE1 a alors été définie comme la pente de la tangente à l'origine de la courbe de suivi de fluorescence. Chaque tangente à l'origine a été tracée dans la région linéaire de la courbe de suivi de fluorescence pour un coefficient de corrélation supérieur à 0,9.

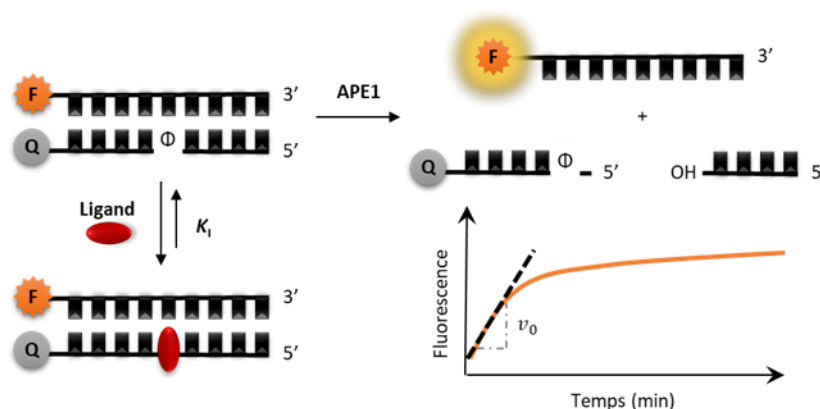


Figure 70- Principe de l'inhibition du clivage d'APE1 par les ligands suivi par l'évolution de la fluorescence en temps réel.

Cependant, au cours des études préliminaires, la grande majorité des ligands a montré une interaction avec la fluorescence de la plupart des fluorophores usuels tels que 6-FAM,

Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 594, TAMRA ou encore Texas Red. Cette interaction, visible par une extinction de fluorescence lors de l'ajout des ligands dans le milieu, empêche ainsi un suivi correct de l'augmentation de la fluorescence à la suite du clivage du site abasique. Cette interaction reste tolérable dans le cadre des expériences de FRET-melting car la concentration en ligand est fixe, de plus le but de l'étude est la détermination d'une température de transition et non une évaluation précise de l'intensité de fluorescence. Cependant, cet effet peut entraîner des biais dans le cadre du suivi de l'intensité de fluorescence en temps réel en présence de différentes concentrations en ligand.

Ainsi pour limiter cet effet et choisir le fluorophore le plus adapté, une évaluation préliminaire de l'interaction fluorophore - ligand 2,7-BisNP-NH a été effectuée avec un panel d'oligonucléotides simple-brins 17-mer marqués avec différents fluorophores. L'interaction a ensuite été retranscrite sous la forme d'un facteur d'extinction de fluorescence (QF), qui correspond alors au ratio de l'intensité de fluorescence en présence du ligand sur celle en absence de ligand (2):

$$QF = \frac{F_{\text{avec ligand}}}{F_{\text{sans ligand}}} \quad (2)$$

Bien que l'interaction entre un fluorophore et un composé accepteur de fluorescence soit classiquement régit par l'équation de Stern-Volmer (3) :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + \frac{k_Q}{[L]} \quad (3)$$

avec k_Q la constante d'extinction de fluorescence, I l'intensité de fluorescence à la concentration en ligand $[L]$ et I_0 l'intensité de fluorescence en absence de ligand, certains cas de la littérature reportent une relation non linéaire entre l'extinction de fluorescence et la concentration en ligand.^{255,256} Ainsi différentes concentrations en macrocycle 2,7-BisNP-NH ont également été testées (*Tableau 2*).

Tableau 2- Etude du facteur d'extinction de fluorescence QF ($QF = F_{\text{avec ligand}} / F_{\text{sans ligand}}$) due au ligand 2,7-BisNP-NH en fonction du fluorophore donneur pour une concentration en ADN simple brin de 0,1 μM .^[a]

Fluorophore (F)	$\lambda_{\text{ex}} - \lambda_{\text{em}}$ (nm)	Concentration en ligand 2,7-BisNP-NH		
		5 μM	7 μM	10 μM
ATTO 390	395 - 465	0,65	0,51	0,31
TEXAS RED	596 - 614	0,59	0,57	0,53
TAMRA	562 - 583	0,39	0,28	0,19
ALEXA 546	555 - 571	0,54	0,49	0,34
ALEXA 594	590 - 618	0,36	0,42	0,33

[a] Séquence de l'oligonucléotide simple brin utilisée pour l'étude : 5'-F-CCAGTTCGTAGTAACCC-3', avec F = fluorophore. Tampon : Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0.

A la suite de cette étude, le fluorophore ATTO 390 a été sélectionné pour le marquage de l'oligonucléotide car il interagissait le moins avec les ligands, en combinaison avec DABCYL comme extincteur de fluorescence. Dans un deuxième temps, la concentration en oligonucléotide a également été optimisée pour limiter cet effet, aboutissant alors à une concentration de travail de 0,2 μM en ADN (*Tableau 3*).

Tableau 3- Etude du facteur d'extinction de fluorescence en fonction de la concentration en ADN marqué avec le fluorophore ATTO 390 et de la concentration en ligand 2,7-BisNP-NH.

Concentration en ADN ^[a]	Concentration en ligand 2,7-BisNP-NH		
	3 μM	5 μM	7 μM
0,05 μM	0,58	0,59	0,44
0,1 μM	0,65	0,65	0,3
0,2 μM	0,73	0,73	0,54

[a] Séquence de l'oligonucléotide simple brin utilisée pour l'étude : 5'-F-CCAGTTCGTAGTAACCC-3', avec F = fluorophore. Tampon : Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0.

Cependant, malgré ces optimisations une extinction partielle de fluorescence du fluorophore a été observée avec certains ligands. Ainsi les différentes vitesses de clivage de l'oligonucléotide par APE1 déterminées graphiquement (v_0 en a.u. s⁻¹) ont ensuite été corrigées par le facteur d'extinction de fluorescence QF propre à la concentration en ligand étudiée. En supposant que l'extinction de fluorescence est de même ordre pour l'ADN clivé et non clivé, le facteur QF a été déterminé comme le rapport de la fluorescence initiale en présence de ligand sur celle en absence de ligand. On définit alors la vitesse de clivage d'APE1 corrigée par l'équation (4):

$$v_{corr}^{[L]} = v_0^{[L]} / QF^{[L]} \text{ (a.u. s}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

avec $[L]$ la concentration en ligand L étudiée. Pour chaque ligand, les vitesses de clivage de l'enzyme APE1 ont été évaluées sur une gamme de concentrations en composé (*Figure 71*). A la suite, l'activité enzymatique (a) a ainsi été déterminée comme le ratio de la vitesse de clivage d'APE1 corrigée en présence de ligand ($v_{corr}^{[L]}$) divisée par la vitesse de clivage d'APE1 en absence de ligand (v_0), ainsi :

$$a = v_{corr}^{[L]} / v_0. \quad (5)$$

L'activité de clivage enzymatique d'APE1 a ensuite été tracée en fonction de la concentration en chaque ligand afin de déterminer la concentration en macrocycle inhibant 50% de l'activité de l'enzyme (IC₅₀).

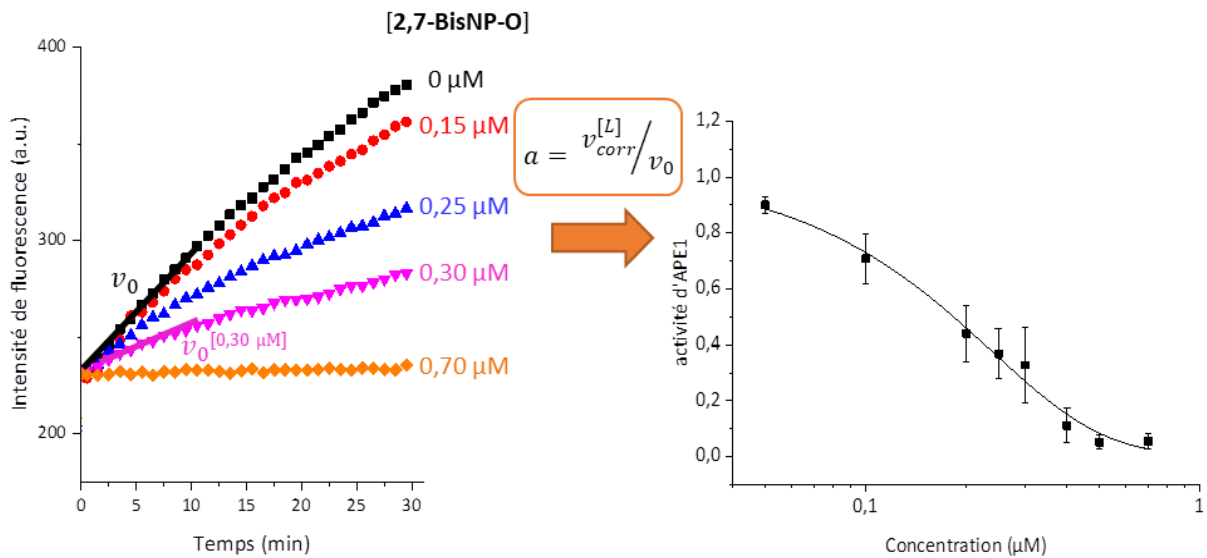


Figure 71- Principe de la détermination de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en ligand 2,7-BisNP-O par suivi de l'évolution de la fluorescence en temps réel.

L'étude a été effectuée à 37 °C, à une concentration en ADN substrat (17-TΦ) de 0,2 μM dans un volume de 1 mL de tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0. La température de dénaturation de l'oligonucléotide dans ce tampon étant de 49,7 °C, seulement 4% de dénaturation est obtenu à 37 °C, selon la courbe de dénaturation.

Le ligand à la concentration étudiée ainsi que l'ADN sont incubés ensemble 5 min à 37 °C dans le tampon réactionnel avant l'ajout de l'enzyme quelques secondes après le début de l'acquisition de l'intensité de fluorescence d'une durée totale de 90 secondes. Lors des expérimentations, le volume d'ajout d'APE1 peut varier en fonction de son activité au sein des aliquotes, celui-ci est alors adapté de façon à maintenir une vitesse de clivage en absence de ligand v_0 de l'ordre de 4 a.u. s⁻¹. Chaque condition a été testée en triplicata.

2- Résultats

Les IC₅₀ obtenues pour chaque ligand à partir des courbes (Figure 72) sont présentées dans le Tableau 4.

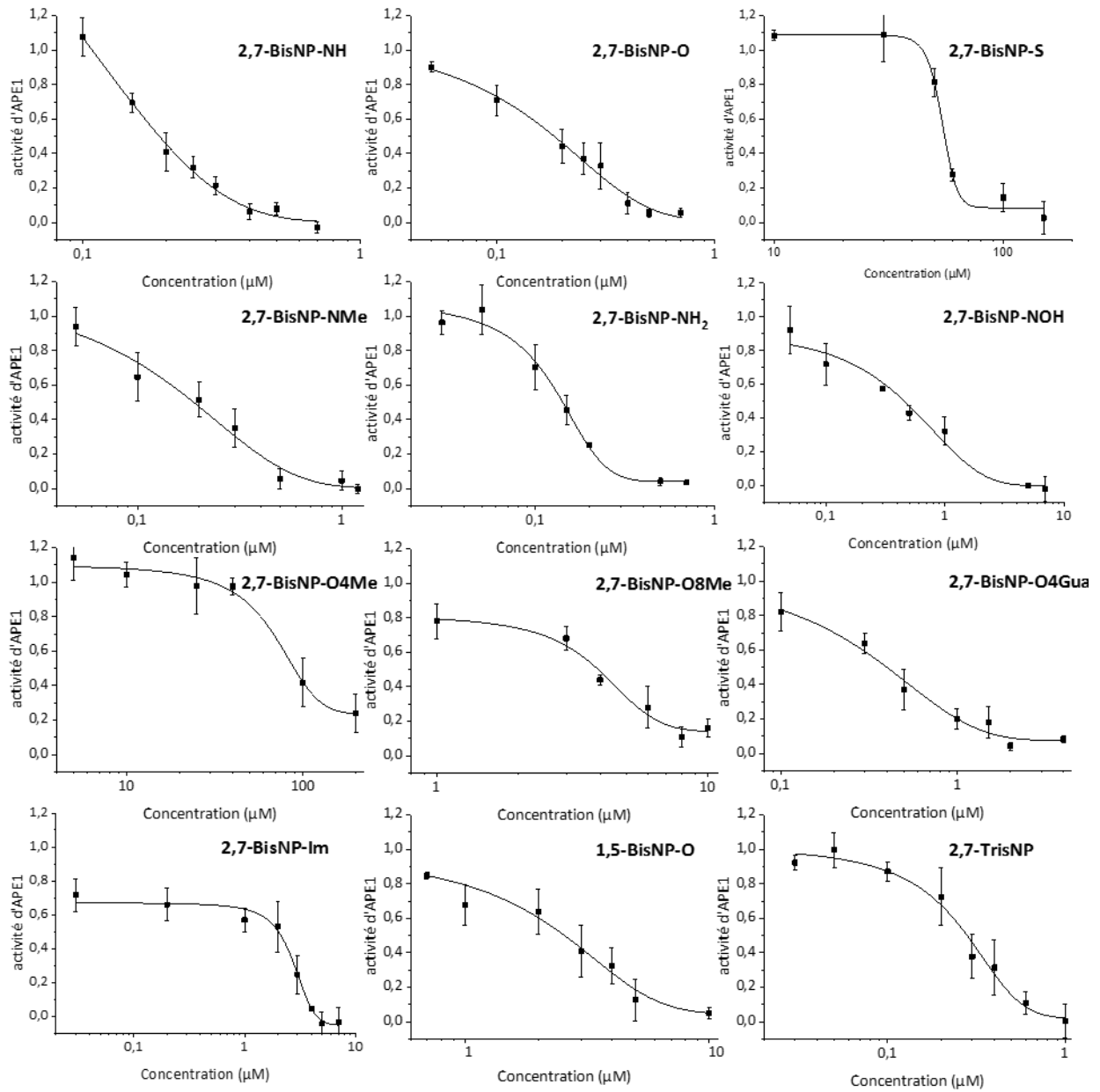


Figure 72- Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité d'APE1 en fonction de la concentration en ligand. Conditions : [oligonucléotide] = 0,2 µM, dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, T = 37 °C.

Tableau 4- Activité d'inhibition du clivage enzymatique de l'oligonucléotide 17-TØ par les macrocycles.^[a]

Ligands	IC ₅₀ (µM)	K _I (nM)
2,7-BisNP-NH	0,19	52
2,7-BisNP-O	0,18	50
2,7-BisNP-S	55	15 000
2,7-BisNP-NMe	0,19	52
2,7-BisNP-NNH ₂	0,14	39
2,7-BisNP-NOH	0,46	130
2,7-BisNP-O4Me	89	25 000
2,7-BisNP-O8Me	3,9	1100
2,7-BisNP-O4Gua	0,4	110
2,7-BisNP-Im	2,0	550
1,5-BisNP-O	2,6	720
2,7-TrisNP	0,28	77

[a] Conditions : [oligonucléotide] = 0,2 µM, dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, T = 37 °C. $IC_{50} = K_I (1 + \frac{S}{K_M})$, avec $K_M = 76 \pm 5$ nM, la constante de Michaëlis pour APE1 dans ces conditions et S la concentration en ADN.

Les résultats montrent que l'inhibition de l'activité enzymatique d'APE1 par les ligands macrocycliques est dose-dépendante dans tous les cas, avec des IC₅₀ s'étalant de 0,14 µM pour le meilleur inhibiteur (2,7-BisNP-NNH₂) à 89 µM (2,7-BisNP-O4Me). Mais afin de s'affranchir des conditions expérimentales et plus particulièrement de l'influence de la concentration en substrat utilisée, la constante d'inhibition K_I a été calculée (Tableau 4). Une étude précédente²²⁵ de la cinétique de réaction enzymatique d'APE1 en présence de ligand avait permis de conclure que l'interaction des macrocycles avec les sites abasiques conduit à une inhibition indirecte du clivage par APE1, à la suite d'une compétition entre les ligands et APE1 pour le substrat (Figure 40). Dans le cadre d'une inhibition indirecte de l'enzyme la constante d'inhibition K_I représente donc la constante de dissociation du complexe substrat-inhibiteur et non pas celle du complexe enzyme-substrat comme dans le cas classique d'une inhibition compétitive, ainsi $K_I \equiv K_d$ (ligand-site AP). L'IC₅₀ et la constante K_I sont alors reliées par l'équation (6) :²⁵⁷

$$IC_{50} = K_I (1 + \frac{S}{K_M}), \quad (6)$$

avec S, la concentration en ADN utilisée (0,2 µM) et K_M, la constante de Michaëlis pour APE1.

Afin de déterminer les différentes constantes d'inhibition, la constante de Michaëlis pour APE1 a été déterminée dans nos conditions expérimentales. La constante K_M permet de caractériser une réaction enzymatique. En effet, elle représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale de réaction de l'enzyme.

L'activité d'APE1 a ainsi été évaluée sur une gamme de concentrations en substrat 17-TΦ dans le tampon : HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH 8,0. La vitesse initiale de clivage d'APE1 (v_0) a été déterminée graphiquement comme précédemment à la suite du suivi de l'augmentation de la fluorescence du fluorophore ATTO 390, puis tracée en fonction de la concentration en oligonucléotide. Les données sont l'aboutissement de trois séries de mesures indépendantes. Par modélisation des résultats avec le modèle de Michaëlis-Menten, la constante de Michaëlis pour APE1 a été déterminée, ainsi dans nos conditions d'études $K_M = 76 \pm 5$ nM (Figure 73).

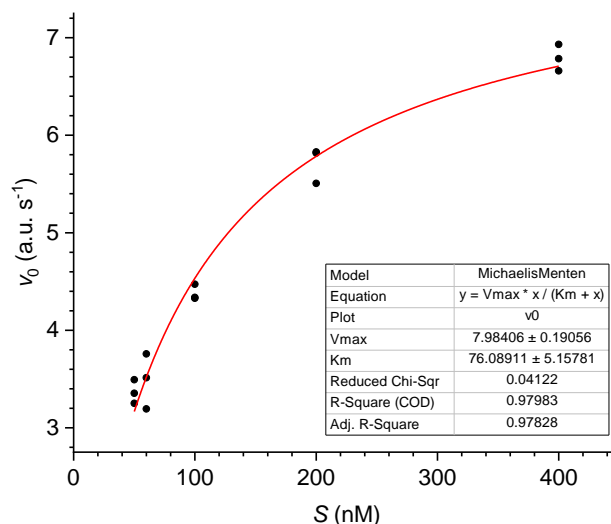


Figure 73- Détermination de la constante de Michaëlis (K_M) pour APE1 par modélisation de la vitesse initiale (v_0) du clivage enzymatique en fonction de la concentration en ADN substrat 17-TΦ (S) avec le modèle de Michaëlis-Menten.

De façon notable, la constante d'inhibition K_i ainsi obtenue pour le ligand 2,7-BisNP-O (50 nM) est du même ordre de grandeur que celle précédemment publiée (34 nM)²²⁵ en dépit d'une concentration en ADN substrat significativement plus faible (25 nM), permettant de valider les conditions expérimentales. Ainsi, les constantes d'inhibition obtenues pour les différents macrocycles, de l'ordre du nanomolaire (39 nM pour le meilleur macrocycle, 2,7-BisNP-NNH₂), permettent de mettre en évidence la très bonne capacité de ces derniers à inhiber l'activité de clivage d'APE1.

De plus, les résultats (Tableau 4) montrent que l'introduction de groupements alkyles, de courtes ou de longues chaînes, au niveau de l'amine centrale présente sur la chaîne polyamine des macrocycles n'influence pas la capacité du ligand à inhiber APE1. En effet les ligands 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NNH₂ et 2,7-BisNP-NH présentent des constantes d'inhibition comparables, de 52 nM, 39 nM et 52 nM respectivement.

Dans le but de rationaliser les données obtenues, les constantes d'inhibition ainsi évaluées ont été mises en parallèle avec la stabilisation de l'ADN induite par les ligands (i.e. les valeurs de $\Delta T_m^{T\Phi}$ obtenues au cours de l'étude par FRET-melting). Remarquablement, une très bonne corrélation entre les valeurs $1/K_i$ (c'est-à-dire la constante d'affinité des ligands pour le substrat) et les valeurs de $\Delta T_m^{T\Phi}$ obtenues en présence d'un excès en ADN compétiteur a été observée. En d'autres termes, les ligands présentant la meilleure affinité et sélectivité pour les sites abasiques, ceux dont l'effet de stabilisation n'est pas perdu en présence d'ADN compétiteur (2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NH, 2,7-

BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe), affichent la meilleure inhibition de l'activité enzymatique. Alors que la corrélation avec les valeurs de ΔT_m obtenues en absence d'ADN compétiteur n'affiche qu'un r^2 insatisfaisant de 0,26, ce dernier augmente à 0,72 en présence de compétiteur (Figure 74). En effet la présence d'ADN compétiteur permet de s'affranchir de la non-spécificité de certains ligands, 1,5-BisNP-O par exemple, pour les sites abasiques.

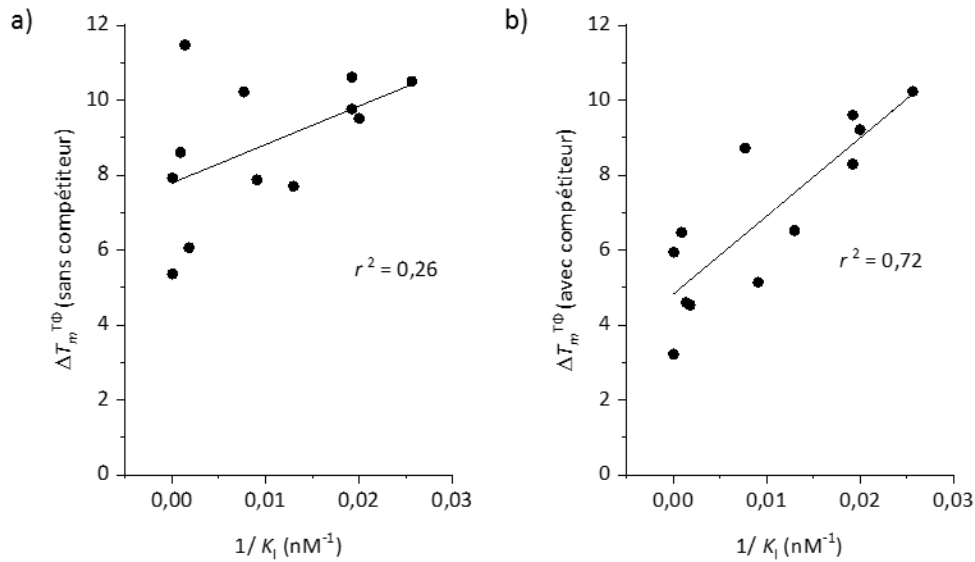


Figure 74- Corrélation entre la constante d'affinité des ligands pour les sites abasiques, dérivée de leur capacité d'inhibition de l'activité d'APE1 ($K_a = 1/K_i$), et la stabilisation de l'oligonucléotide 17-TΦ observée : a) en absence d'ADN compétiteur ; b) en présence d'ADN compétiteur (65 μ M bp soit 130 eq).

Ainsi la constante d'inhibition d'APE1 par les ligands semble suivre leur affinité pour le site abasique mais également leur sélectivité. En d'autres termes plus les ligands ont la capacité de se fixer au niveau du site abasique plus l'activité de clivage d'APE1 est compromise. Cette constatation conforte alors le modèle d'une inhibition indirecte de l'activité enzymatique par les ligands (Figure 40, b) et met en valeur l'efficacité d'une inhibition de la réparation de l'ADN en ciblant directement l'ADN.

IV- Evaluation *in vitro* du clivage des sites abasiques par les macrocycles

Comme déjà évoqué, les précédentes études effectuées avec le macrocycle 2,7-BisNP-O ont permis de mettre en valeur la capacité de ce ligand à cliver les sites abasiques. En effet par analogie avec un grand nombre de molécules présentant des fonctions amines, ce dernier peut potentiellement former une base de Schiff avec la forme ouverte des sites abasiques et ainsi induire un clivage de type β -élimination qui peut ainsi conduire à produire et / ou à amplifier les dommages à l'ADN. Le but de cette étude est ainsi d'évaluer la capacité de clivage des macrocycles nouvellement synthétisés et d'identifier leurs potentiels produits de coupure de type β -élimination (β) ou β,δ -élimination (δ).

1- Principe de l'étude

L'étude de l'activité de clivage des ligands, inspirée de la technique développée en 2016 par Berthet et al.,²⁵⁸ est basée sur le suivi de l'évolution en temps réel de la fluorescence. L'ADN 17-mer duplexe utilisé porte ainsi un fluorophore donneur en 5', ATTO 390 afin de limiter l'interaction entre le fluorophore et les ligands, ainsi qu'un extincteur de fluorescence en 3' sur le brin complémentaire, DABCYL. Sur le même principe que lors du suivi de l'activité enzymatique d'APE1, le clivage du site abasique par les ligands déstabilise l'ADN entraînant alors la dénaturation de ce dernier, la fluorescence du fluorophore donneur est alors restituée (Figure 75, a). L'ADN duplexe utilisé pour cette étude est le même que dans le cadre de l'étude de l'inhibition d'APE1 par les macrocycles, à l'exception que l'ADN est porteur d'un « vrai » site abasique, et non pas d'un analogue de type THF.

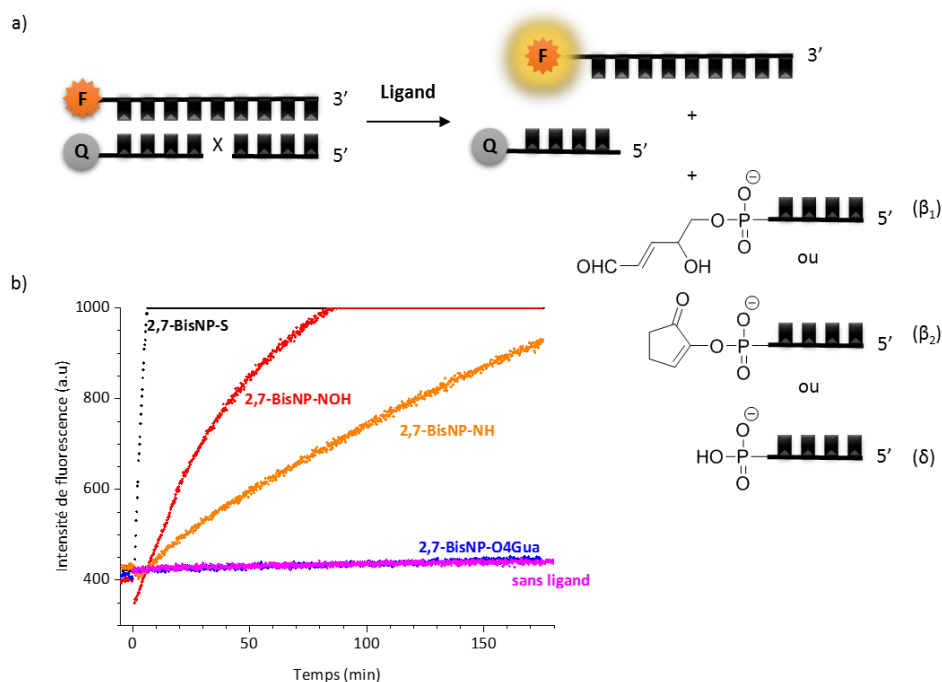


Figure 75- Etude de la vitesse de clivage du site abasique par les ligands. a) Principe de l'étude ; b) Exemples de suivi de l'augmentation de la fluorescence suite au clivage du site abasique en temps réel.

La formation du site abasique est obtenue à la suite de l'action de l'uracile-ADN glycosylase (UDG) sur le précurseur de l'ADN duplexe porteur d'une base uracile (Figure 62, 17-TU). Une étude

préliminaire, de l'oligonucléotide marqué au ^{32}P en 5', par électrophorèse sur gel d'acrylamide 20% dénaturant a permis de déterminer les conditions optimales de formation du site abasique (Figure 76, 17-TX). Différents temps d'incubation de l'ADN duplexe 17-TU avec l'enzyme UDG ont ainsi été testés à la suite desquels un traitement par NaOH (0,5 M) a été effectué afin de cliver le site abasique potentiellement formé, conduisant à la formation de produits de β -élimination (β_1 et β_2) et de β,δ -élimination (δ). L'évaluation de la formation de ces produits permet alors de déterminer la présence en amont du site abasique.

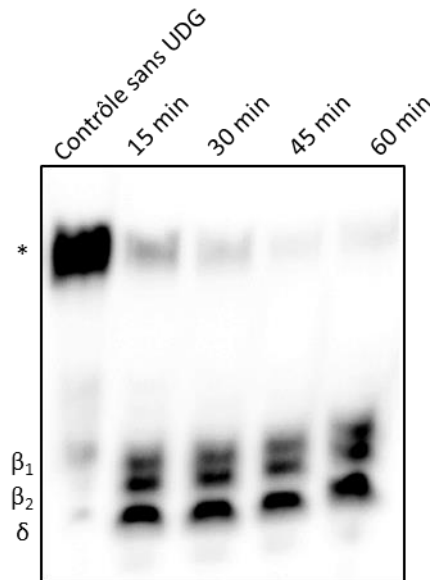


Figure 76- Analyse par PAGE de l'évolution de la formation du site abasique en fonction de la durée d'incubation avec l'enzyme UDG post-traité par NaOH (0,5 M). Bande *) ADN porteur d'une base uracile ; β_1 et β_2) Produits de β -élimination du site abasique ; δ) Produit de β,δ -élimination du site abasique. Conditions : [oligonucléotide] = 40 μM , [UDG] = 0,25 U / μL dans le tampon 30 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , pH = 8,3, T = 37 °C.

Il a ainsi été choisi d'incuber l'oligonucléotide précurseur (40 μM), avec l'enzyme UDG (0,25 U / μL) dans son tampon réactionnel (30 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , pH = 8,3) pendant 45 minutes à 37 °C, temps minimal permettant la formation quantitative du site abasique.

Afin de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques, l'étude du clivage par les ligands a été effectuée à pH 7,2 et à 37 °C. Ainsi dans le but de limiter la dénaturation de l'ADN à moins de 10% à cette température la quantité de sels présents dans le tampon a été adaptée (Tableau 5), conduisant à un tampon d'étude composé de 10 mM de cacodylate de potassium et de 150 mM de chlorure de potassium. Dans ces conditions, l'oligonucléotide présente une température de dénaturation de $46,6 \pm 0,2$ °C.

Tableau 5- Evaluation de la dénaturation de l'oligonucléotide 17-TX en fonction de la composition du tampon.

Composition du tampon	Température de dénaturation T_m (°C)	Pourcentage d'ADN dénaturé à 37 °C (%)
TRIS-HCl 50 mM, KCl 50 mM, MgCl ₂ 1 mM	48,5 ± 2,5	10,6 ± 0,5
TRIS-HCl 50 mM, KCl 110 mM	48,2 ± 1,6	10,3 ± 1,0
KAsO ₂ Me ₂ 10 mM, KCl 100 mM	44,1 ± 0,2	14,1 ± 0,5
KAsO ₂ Me ₂ 10 mM, KCl 150 mM	46,6 ± 0,2	9,3 ± 0,2

Les vitesses de clivage de l'ADN à une concentration d'étude de 0,2 µM par les différents ligands (5 µM) ont ainsi été évaluées en suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence du fluorophore ATTO 390 (λ_{ex} = 395 nm, λ_{em} = 465 nm) pendant 180 minutes à 37 °C. Les concentrations d'étude de l'oligonucléotide ainsi que des ligands ont été choisies afin de minimiser l'interaction entre le fluorophore et les macrocycles ([Tableau 3](#)). Cependant, comme constaté lors de la précédente étude, une extinction partielle de la fluorescence du fluorophore par les macrocycles est visible par une diminution de la fluorescence au moment de l'ajout des ligands quelques minutes après le début de l'acquisition. L'ampleur de cet effet a pu être quantifié à l'aide de l'oligonucléotide duplexe non-clivable (17-TΦ) marqué par le même fluorophore. Dans ces conditions, seul l'effet dû à l'interaction des ligands (testés à 5 µM) avec le fluorophore est visible ainsi le facteur d'extinction de fluorescence ($QF^{[5 \mu M]} = \frac{F_{avec\ ligand\ [5 \mu M]}}{F_{sans\ ligand}}$) devient aisément quantifiable ([Tableau 6](#), $QF^{[5 \mu M]}$).

2- Résultats

Comme lors de l'étude du clivage enzymatique du site abasique par APE1, les vitesses initiales de clivage du site abasique par les ligands (v_0) ont alors été définies comme la pente de la tangente à l'origine dans la région linéaire de la courbe de suivi de fluorescence, pour un coefficient de corrélation supérieur à 0,9. Le facteur dû à l'extinction de fluorescence ($QF^{[5 \mu M]}$) a pu ensuite être pris en considération pour corriger les vitesses initiales de clivage. On définit alors la vitesse de clivage des sites abasiques par les ligands par : $v_{corr} = v_0 / QF^{[5 \mu M]}$ (a.u. s⁻¹). Les vitesses déterminées sont le résultat de trois mesures indépendantes ([Tableau 6](#)).

Tableau 6- Vitesses de clivage des sites abasiques par les différents ligands.^[a]

Ligand	v_0 (u.a. s ⁻¹) ^[b]	QF ^[5 μM] ^[c]	v_{corr} (u.a. s ⁻¹) ^[d]
2,7-BisNP-NH	3,02 ± 0,16	0,97	3,13
2,7-BisNP-O	5,64 ± 0,34	0,89	6,35
2,7-BisNP-S	115,9 ± 5,9	0,75	155
2,7-BisNP-NMe	4,29 ± 0,44	0,90	4,76
2,7-BisNP-NNH ₂	33,00 ± 1,23	0,95	34,9
2,7-BisNP-NOH	12,85 ± 0,65	0,78	16,5
2,7-BisNP-O4Me	1,08 ± 0,08	0,91	1,19
2,7-BisNP-O8Me	0,16 ± 0,02	0,79	0,20
2,7-BisNP-O4Gua	0,31 ± 0,19	0,85	0,36
2,7-BisNP-Im	0,14 ± 0,05	0,54	0,25
1,5-BisNP-O	8,57 ± 0,15	0,73	11,8
2,7-TrisNP	0,09 ± 0,01	0,28	0,31
KWKK	0,17 ± 0,02	0,97	0,17
Spermine x 4 HCl	1,31 ± 0,11	1,04	1,25
Contrôle sans ligand	0,10 ± 0,00	-	0,10

[a] Condition : [17-TX] = 0,2 μM, [ligand] = 5 μM, tampon : KAsO₂Me₂ 10 mM, KCl 150 mM, pH = 7,2, T = 37 °C ;

[b] Vitesse initiale de clivage des sites abasiques : valeur de la pente de la tangente à l'origine de la courbe de suivi de la fluorescence en fonction du temps ; [c] Facteur d'extinction de fluorescence à une concentration de 5 μM en ligand évalué sur l'oligonucléotide 17-TΦ ; [d] Vitesse de clivage des sites abasiques : vitesse initiale de clivage corrigée par le facteur d'extinction de fluorescence à une concentration en ligand de 5 μM.

En parallèle, une analyse du clivage des sites abasiques par les macrocycles a été réalisée par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant 20% (PAGE). Cette étude a été effectuée dans les mêmes conditions que lors du suivi de l'activité de clivage par fluorescence à l'exception que l'oligonucléotide utilisé (17-TX) est marqué au ³²P en 5' sur le brin porteur du site abasique. Ainsi, les ligands (5 μM) ont été incubés à 37 °C en présence de l'oligonucléotide (0,2 μM) pendant une durée fixée à une heure. Bien que cette étude ne permette pas une évaluation de la cinétique de clivage du site abasique, elle présente l'avantage de pouvoir s'affranchir des problèmes liés à l'extinction de fluorescence et permet la quantification des différents produits de clivage, de type β-élimination ou β,δ-élimination, mais également la détection de la formation de produits secondaires. Elle vient ainsi compléter l'évaluation des vitesses de clivage (Figure 77, b). Cette même étude a également été réalisée avec l'oligonucléotide marqué au ³²P en 5' sur le brin non-porteur du site abasique, ainsi il a été démontré qu'aucun clivage n'avait lieu sur ce brin complémentaire (Figure 77, a).

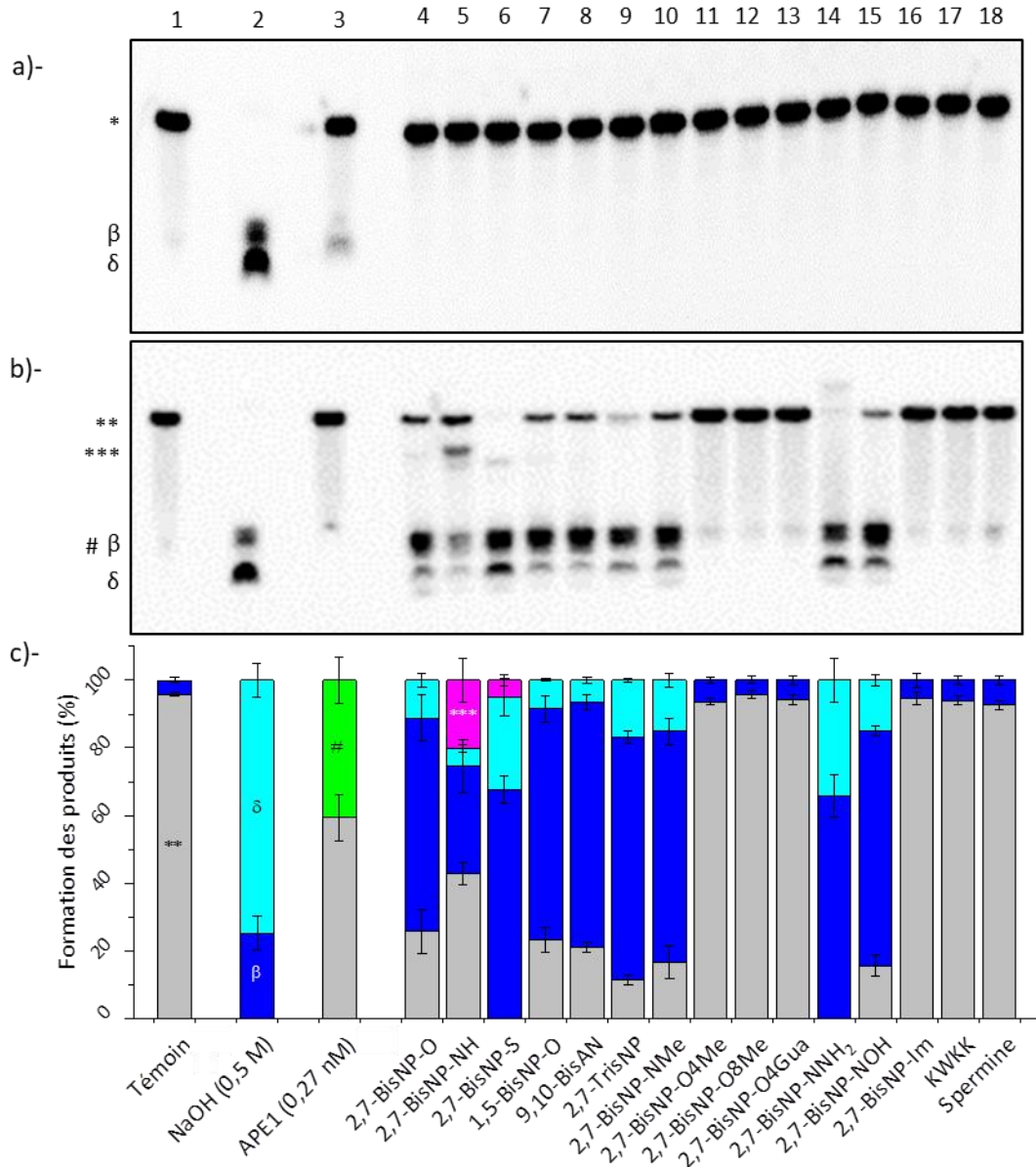


Figure 77- Analyse par PAGE du clivage de l'oligonucléotide 17-TX. Ligne 1) ADN non traité ; 2) Traitement par NaOH (0,5 M) ; 3) APE1 (0,27 nM) ; 4) 2,7-BisNP-O ; 5) 2,7-BisNP-NH ; 6) 2,7-BisNP-S ; 7) 1,5-BisNP-O ; 8) 2,7-TrisNP ; 9) 2,7-BisNP-NMe ; 10) 2,7-BisNP-O4Me ; 11) 2,7-BisNP-O8Me ; 12) 2,7-BisNP-O4Gua ; 13) 2,7-BisNP-NNH₂ ; 14) 2,7-BisNP-NOH ; 15) 2,7-BisNP-Im ; 16) KWKK ; 17) spermine. Conditions : [ligand] = 5 μM, incubation 1 h dans le tampon 10 mM KAsO₂Me₂, 150 mM KCl, pH = 7,2, T= 37 °C. a) Etude du brin complémentaire à celui porteur du site AP sauf pour les lignes témoins 2 et 3, brin porteur du site AP ; b) Etude du brin porteur du site AP ; c) Quantification des différents clivages du brin porteur du site AP (résultats de trois mesures indépendantes). Identifications des bandes / code couleur : **/ gris, substrat non clivé ; β / bleu, produit de β-élimination ; δ / cyan, produit de β,δ-élimination ; # / vert, produit 3'-OH du clivage d'APE1 ; *** / rose, adduit ADN-ligand.

A la suite de ces deux études, les ligands ont été classés en trois catégories différentes.

Les ligands fortement clivants vis-à-vis des sites abasiques : le ligand 2,7-BisNP-S ($v_{corr} = 155$ a.u. s⁻¹) et le ligand 2,7-BisNP-NNH₂ ($v_{corr} = 34,9$ a.u. s⁻¹). En effet en plus de présenter des vitesses de clivage élevées, l'analyse par gel d'électrophorèse montre que ces deux ligands présentent une

conversion totale du site abasique après une heure d'incubation en produits de β -élimination et de β,δ -élimination avec un ratio d'environ 2: 1 respectivement (*Figure 77*, c). La forte activité de clivage du ligand 2,7-BisNP-NNH₂ n'est pas surprenante car ce macrocycle présente un nombre plus important de groupements nucléophiles en comparaison avec les autres macrocycles. Mais remarquablement la présence de deux groupements amines primaires supplémentaires conduit à une augmentation de la vitesse de clivage d'un facteur onze par comparaison avec le macrocycle 2,7-BisNP-NH ($v_{corr} = 3,11$ a.u. s⁻¹). La forte activité de clivage du ligand 2,7-BisNP-S n'était, elle, pas prévisible. D'autant plus qu'il est intéressant de noter que ce ligand présente une affinité vis-à-vis du site abasique plus faible que celle du ligand 2,7-BisNP-NH par exemple, comme démontrée au cours de l'étude par FRET-melting (*Figure 67*). Dans un second temps, afin d'exclure l'hypothèse d'un effet dû à la présence de complexes de métaux lourds chélatés par le macrocycle soufré, l'activité de clivage du ligand 2,7-BisNP-S a été évaluée en présence d'acide éthylènediaminetétraacétique (1 mM). En effet, l'EDTA est bien connu pour son fort pouvoir chélatant des cations bimétalliques. Dans ces conditions, la vitesse de clivage du ligand est restée inchangée, ainsi sa forte activité ne peut être attribuée à la présence potentielle d'ions bimétalliques dans le milieu.

Les ligands possédant une activité de clivage modérée ($2 < v_{corr} < 20$ a.u. s⁻¹): les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-NH, 1,5-BisNP-O et 9,10-BisAN. Après une heure d'incubation, ces quatre premiers ligands clivent environ 80% du site abasique et le convertissent en grande majorité en produit de β -élimination ($\approx 70\%$). La formation du produit de β,δ -élimination est ainsi également observée cependant en moindre proportion ($\approx 10\%$). Le ligand 2,7-BisNP-NH présente, lui, une activité de clivage du site abasique plus faible que les autres macrocycles, à hauteur de 60%, mais tout en restant notable. Il permet ainsi la formation d'environ 30% de produit de β -élimination ainsi qu'environ 10% de produit de β,δ -élimination. Il est également intéressant de relever que le remplacement des unités naphthalènes par des unités anthracènes n'impacte pas la vitesse de clivage (ligands 2,7-BisNP-O et 9,10-BisAN), cependant la position des chaînes polyamines sur les unités naphthalènes peut l'influencer légèrement (2,7-BisNP-O et 1,5-BisNP-O). Néanmoins, après une heure d'incubation les différents produits de clivage sont présents en quantité équivalente. Le ligand 2,7-TrisNP peut également être classifié dans cette catégorie. En effet, alors qu'il a montré une vitesse de clivage très faible ($v_{corr} = 0,31$ a.u. s⁻¹) lors de l'étude fluorimétrique, il présente une activité de clivage comparable aux ligands 2,7-BisNP-NOH ou encore 2,7-BisNP-NMe à la suite de l'étude par PAGE. Cet effet peut être attribué à la forte interaction entre le fluorophore ATTO 390 et le ligand ($QF^{[5 \mu M]} = 0,28$), ne permettant pas un bon suivi de la fluorescence lors du clivage du site abasique par le macrocycle, malgré le facteur de correction appliqué.

Les ligands montrant une activité de clivage quasiment nulle ($v_{corr} < 1,5$ a.u. s⁻¹, conversion du substrat $< 10\%$): 2,7-BisNP-O4Me, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua, 2,7-BisNP-Im ainsi que la spermine et le térapeptide KWKK. Même si c'est deux derniers ligands sont connus dans la littérature pour cliver les sites abasiques, dans les conditions de notre étude ils ne présentent pas d'activité notable, probablement due à la faible concentration utilisée (au minimum 100 fois inférieure à celle des études précédentes).^{145,156} L'activité de clivage très négligeable du peptide KWKK est en accord avec le manque d'affinité pour les sites abasiques constaté lors de l'étude par FRET-melting. Mais il est intéressant de noter qu'au cours de l'étude de l'affinité des ligands ainsi que lors de l'évaluation de l'activité de clivage, l'excès de ligand par rapport à l'oligonucléotide est moindre, 2 et 25 équivalents de ligand respectivement, que ce qui est reporté dans la littérature pour

ce peptide, 500 000 équivalents. Dans un deuxième temps afin de s'assurer que le manque d'activité de clivage d'au moins un des ligands de référence est effectivement lié à une concentration d'étude trop faible, la spermine a ainsi été évaluée à une concentration cent fois supérieure (500 μM). Dans ces conditions, une activité de clivage du site abasique a alors été observée et la vitesse de clivage a ainsi été multipliée par 7 environ pour atteindre $8,52 \pm 1,04 \text{ a.u. s}^{-1}$. Cependant bien que présentant une activité de clivage à cette concentration plus importante en ligand, la vitesse déterminée reste plus faible que celle d'un certain nombre de macrocycles à une concentration de 5 μM . Ces différentes constatations mettent en valeur le fort potentiel de nos macrocycles par comparaison avec les ligands déjà décrits.

Cette étude a permis de montrer la forte influence de la structure des macrocycles sur leur activité de clivage des sites abasiques. En effet l'introduction de substituants sur le groupement amine central de la chaîne polyamine permet d'améliorer l'activité de clivage du ligand, cet effet est visible avec les ligands 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NOH et notamment 2,7-BisNP-NNH₂ par comparaison avec le ligand 2,7-BisNP-NH. Inversement, la suppression des centres nucléophiles, due à l'introduction de substituants sur les autres groupements amino benzyliques (2,7-BisNP-O8Me et 2,7-BisNP-O4Gua) ou le retrait de ses fonctions (2,7-BisNP-Im) empêche alors le ligand de cliver le site abasique. Le ligand 2,7-BisNP-O4Me présente une situation intermédiaire, en effet malgré la présence de quatre amines tertiaires ce macrocycle présente une activité de clivage fortement réduite par comparaison avec le ligand 2,7-BisNP-NH. Ce fait peut être expliqué par la combinaison de deux phénomènes, tout d'abord les amines tertiaires ne permettent pas la formation de la base de Schiff (intermédiaire de type iminium) précurseur à l'étape d'incision du site abasique par le ligand (*Figure 26*), de plus l'affinité de ce ligand pour les sites abasiques est réduite par rapport aux autres macrocycles, comme observée lors de l'étude par FRET-melting.

Pour finir, il est intéressant de relever que la formation d'un produit inattendu a été détectée au cours de l'étude par gel d'électrophorèse. En effet, outre les bandes correspondant aux produits de β -élimination et β,δ -élimination, une bande de vitesse de migration plus faible a été observée avec le ligand 2,7-BisNP-NH principalement (*Figure 77*, ***). Une étude approfondie de la structure de ce produit a été effectuée et est détaillée par la suite (*Chapitre II- V*).

Dans le but de réaliser une étude complète des macrocycles, une évaluation de la compétition entre l'activité d'inhibition du clivage enzymatique d'APE1 et l'activité de clivage intrinsèque des ligands a été effectuée par gel d'acrylamide dénaturant 20%. Ainsi après formation du site abasique dans les conditions décrites précédemment, l'oligonucléotide 17-TX (0,2 μM), marqué au ³²P en 5' sur le brin porteur du site abasique, a été incubé en présence d'APE1 (3 nM) et de trois concentrations différentes pour chaque ligand (5 μM , 30 μM et 100 μM) pendant quinze minutes à 37 °C dans le tampon réactionnel d'APE1 (HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0) (*Figure 78*).

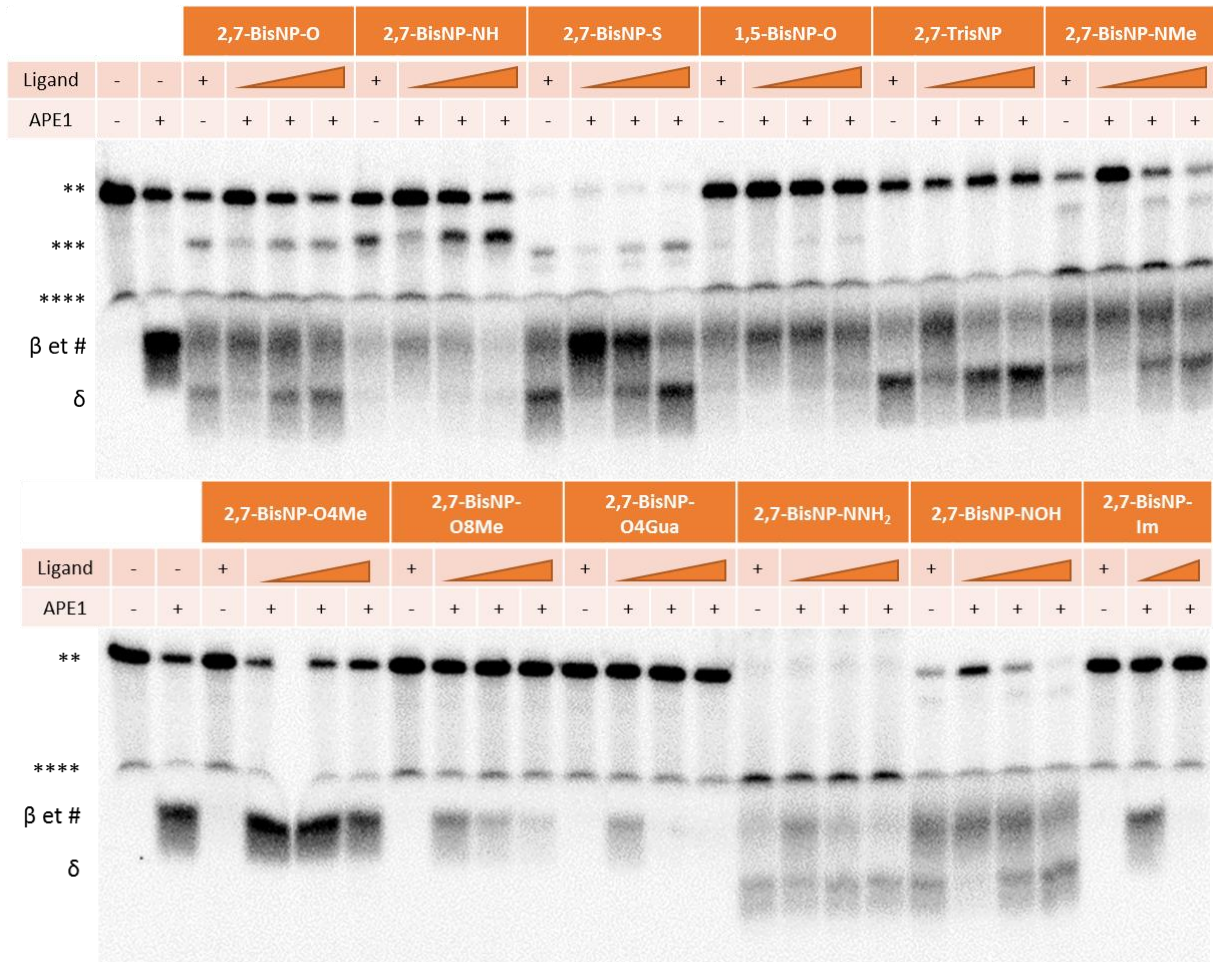


Figure 78- Analyse par PAGE de l'inhibition de l'activité de clivage d'APE1 par les différents ligands testés à trois concentrations : 5 μM, 30 μM et 100 μM. Bande **) Substrat de départ 17-TX ; *) Adduit ADN-ligand ; ****) Adduits ADN-HEPES, ADN-DTT ; β et #) Produits de β-élimination et de clivage par APE1 ; δ) Produit de β,δ-élimination.** Conditions : concentration en oligonucléotide 17-TX = 0,2 μM, concentration en ligand en combinaison avec APE1 = 5, 30 et 100 μM, concentration en ligand en absence d'APE1= 30 μM, concentration en APE1= 3 nM, tampon : HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, T = 37 °C, 15 minutes d'incubation.

L'étude des gels montre qu'il est difficile de séparer les produits de clivage de type β-élimination des ligands et le produit de coupure formé par APE1 (Figure 78, β et # respectivement). En effet, ces produits de clivage présentent dans ces conditions des vitesses de migration similaires, ce qui ne permet pas leur quantification respective. D'autre part, la présence d'un nouveau produit est visible (****), indépendamment de la présence des ligands. Toutefois, la formation de ce produit n'est pas observée dans le tampon utilisé pour évaluer le clivage du site AP par les ligands (Figure 77). Ainsi une étude approfondie de l'influence de la composition du tampon réactionnel a été effectuée. Suite à laquelle, la formation d'adduits entre le produit de β-élimination et l'HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) et/ou le DTT (dithiothréitol) présents dans le tampon d'activité d'APE1, a été détectée (Figure 79, lignes 6 et 7 en comparaison à la ligne 5). Peu d'exemples dans la littérature illustrent la formation d'adduits avec le produit de clivage du site abasique de type β-élimination. Cependant en 1988 Verly et al. mettent en évidence la réaction de différents thiols avec le sucre insaturé formé après clivage du site abasique par la spermine.²⁵⁹ La présence de ces adduits ne permet alors pas une quantification correcte des différents produits de

clivage car la formation du produit de β,δ -élimination est ainsi bloquée. Ainsi l'évaluation de la diminution de la quantité de produit de clivage par APE1 suite à l'augmentation de la concentration en ligand n'a pas été possible.

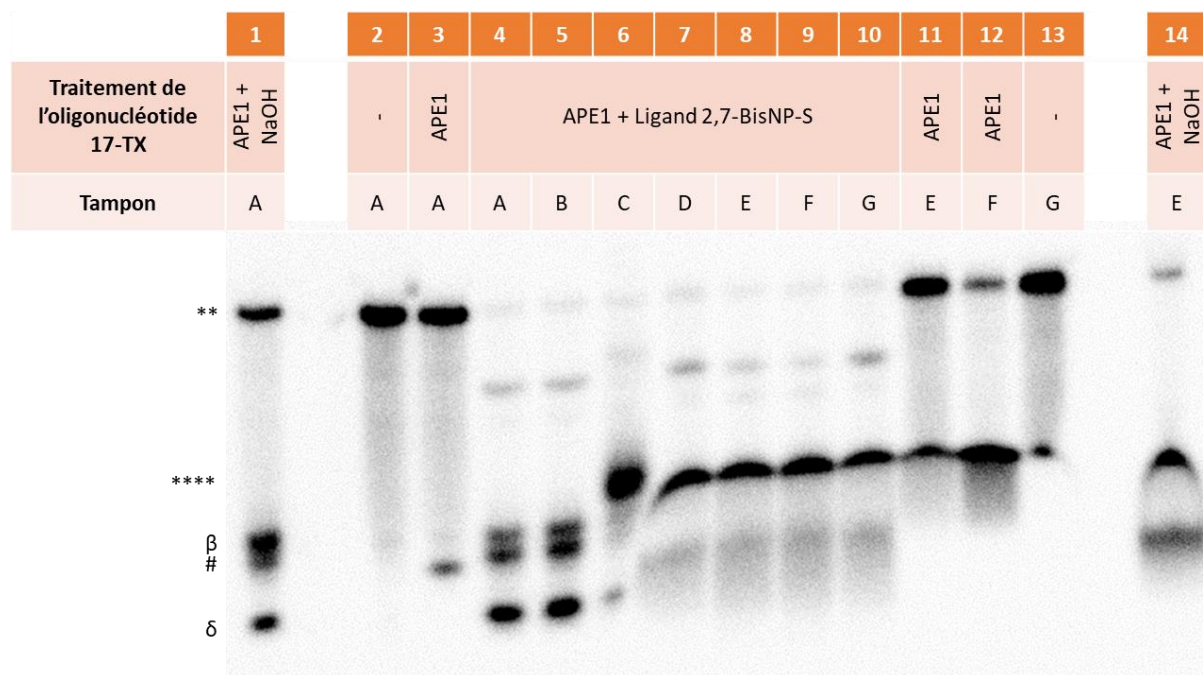


Figure 79- Analyse par PAGE de l'influence de la composition du tampon et du pH. Bande **) Substrat de départ 17-TX ; ****) Adduits ligand-HEPES ou ligand-DTT ; β) Produit de β -élimination ; #) Produit de clivage par APE1 ; δ) Produit de β,δ -élimination. Ligne 1) et 14) ADN 17-TX (0,2 μ M) incubé avec APE1 (3 nM) et NaOH (0,05 M) ; 2) et 13) ADN 17-TX (0,2 μ M) ; 3) et 11-12) ADN 17-TX (0,2 μ M) incubé avec APE1 (3 nM) ; 4-10) ADN 17-TX (0,2 μ M) incubé avec APE1 (3 nM) et le ligand 2,7-BisNP-S (30 μ M). Condition : T = 37 °C, 15 min d'incubation, Tampon A : KCl 150 mM, KAsO₂Me₂, 10 mM, pH = 7,2 ; Tampon B : KCl 150 mM, KAsO₂Me₂, 10 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 7,2 ; Tampon C : KCl 150 mM, KAsO₂Me₂, 10 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 7,2 ; Tampon D : KCl 150 mM, KAsO₂Me₂, 10 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 50 mM, pH = 7,2 ; Tampon E : HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0 ; Tampon F : HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 8,0 ; Tampon G : HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, pH = 7,2.

3- Etude de l'influence du pH du tampon réactionnel sur la vitesse de clivage des sites abasiques

Afin d'essayer d'expliquer l'activité nettement supérieure du macrocycle 2,7-BisNP-S, l'influence du pH du tampon réactionnel a été investiguée, ce dernier impactant potentiellement l'état de protonation des macrocycles. Les conditions d'étude et la composition en sels du tampon n'ont, elles, pas été changées. La vitesse de clivage de l'oligonucléotide 17-TX de trois macrocycles (2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-S) a été évaluée à deux nouveaux pH = 6,0 et 8,0 (Tableau 7).

Tableau 7- Vitesses de clivage (u.a. s⁻¹) des macrocycles 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-S de l'oligonucléotide 17-TX en fonction du pH du tampon réactionnel.^[a]

	pH 6,0	pH 7,2	pH 8,0
2,7-BisNP-NH	0,14 ± 0,02	3,13 ± 0,97	3,0 ± 0,39
2,7-BisNP-O	0,15 ± 0,02	6,35 ± 0,89	5,44 ± 0,22
2,7-BisNP-S	10,3 ± 0,9	155 ± 5,9	59,4 ± 3,6

[a] Vitesse de clivage (u.a. s⁻¹) : vitesse initiale de clivage corrigée par le facteur d'extinction de fluorescence à une concentration en ligand de 5 μM. Condition : [17-TX] = 0,2 μM, [ligand] = 5 μM, tampon : KAsO₂Me₂ 10 mM, KCl 150 mM, T = 37 °C.

Les résultats mettent en évidence la forte influence du pH sur la vitesse de clivage des sites abasiques. Un comportement comparable à celui des enzymes peut alors être observé avec un pic d'activité à pH 7,2, notamment fortement marqué pour le ligand 2,7-BisNP-S. En effet, à pH 6,0 la vitesse de clivage est presque nulle pour les ligands 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O et est considérablement réduite pour le ligand 2,7-BisNP-S. A pH 8,0 alors que la perte d'activité par rapport à un pH de 7,2 est moindre pour les deux premiers macrocycles, une diminution de la vitesse d'environ un tiers est observée pour le macrocycle 2,7-BisNP-S. Ces constatations suggèrent l'importance de l'état de protonation des amines sur les macrocycles dans le processus de clivage. De plus, ces résultats laissent présager une similarité des pKa des groupements amines présents sur les macrocycles 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-NH, qui devraient cependant être différents de ceux du macrocycle 2,7-BisNP-S.

La titration de ces trois ligands en solution aqueuse (2 mM) par une solution de soude (50 mM) en présence d'acide chlorhydrique (5 mM) a ainsi été réalisée afin de permettre une estimation des pKa. Dans ces conditions, le premier saut de pH nettement observé sur les courbes (*Figure 80*) correspond à la titration de l'acide chlorhydrique. Ainsi bien que la détermination précise des pKa des amines des macrocycles soit compliquée, les courbes obtenues (*Figure 80*) mettent en évidence le caractère plus acide des amines présentes sur le macrocycle 2,7-BisNP-S contrairement à celles présentes sur les macrocycles 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O, visible par le volume plus important de soude nécessaire afin d'atteindre l'équivalence (V_E) avec le ligand 2,7-BisNP-S. Ces résultats peuvent ainsi expliquer l'absence d'activité des macrocycles 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O à pH = 6,0. En effet, les courbes laissent supposer la protonation totale des amines de ces derniers à ce pH contrairement au macrocycle 2,7-BisNP-S, abolissant ainsi le caractère nucléophile de ces groupements nécessaire au clivage du site abasique. Cependant la diminution de la vitesse de clivage à pH = 8,0 laisse supposer de la nécessité d'un équilibre entre le nombre de groupements amines protonnés et déprotonnés dans le processus de clivage, néanmoins sans pouvoir être expliqué à ce jour.

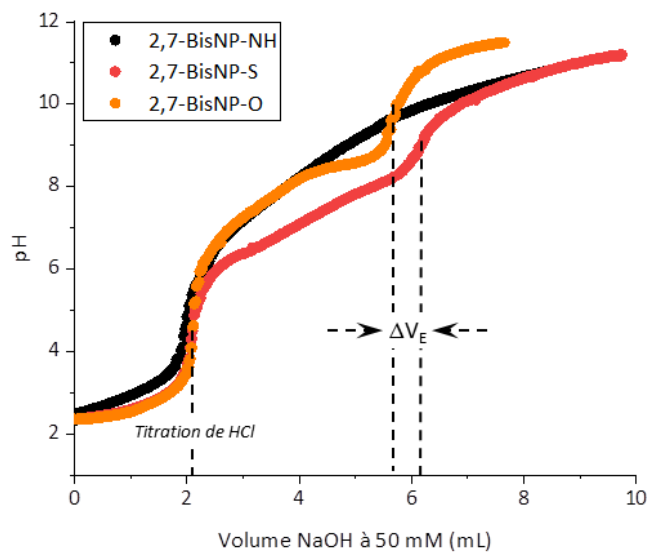


Figure 80- Représentations graphiques des titrations pH-métriques des ligands 2,7-BisNP-NH (courbe noire), 2,7-BisNP-O (courbe orange) et 2,7-BisNP-S (courbe rouge) en solution aqueuse (2 mM) par une solution de soude (50 mM) en présence d'acide chlorhydrique (5 mM).

V- Etude de la formation *in vitro* d'un adduit entre le site abasique et le ligand 2,7-BisNP-NH

Au cours des études par électrophorèse sur gel d'acrylamide, la formation d'un produit inattendu a été détectée avec certains ligands. En effet, en plus des produits de β -élimination et β,δ -élimination, une bande correspondant à un produit ayant une vitesse de migration plus faible est visible (*Figure 77*,***). La formation de ce produit est observée principalement avec le ligand 2,7-BisNP-NH, où il représente environ 20% des produits finaux. Mais il peut être également détecté avec les ligands 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O, à hauteur de 5% et < à 1% respectivement. Afin d'essayer d'identifier la structure de ce produit, des études complémentaires ont été effectuées par PAGE dans un premier temps.

Il a ainsi été montré que l'incubation du ligand 2,7-BisNP-NH avec l'oligonucléotide (17-T Φ) non porteur d'un site abasique ne permet pas la formation du produit (*Figure 81*, a, lignes 6 et 7). Cette constatation met en évidence que la présence du site abasique est nécessaire pour la formation de ce produit et par conséquent l'hypothèse d'un clivage de l'oligonucléotide par le ligand à un site autre que le site abasique est exclue. De plus, le produit formé semble stable et résiste à une bref période à 90 °C, résultat en faveur d'une modification covalente de l'ADN (*Figure 81*, a, lignes 3 et 4). Enfin, l'oligonucléotide porteur d'un site abasique (17-TX) a été incubé avec le ligand en condition d'amination réductrice, c'est-à-dire en présence de NaCNBH₃ suivi de l'ajout de NaBH₄ (*Figure 81*, a, ligne 5). Dans ces conditions, la formation d'un nouveau produit est observée (*Figure 81*, a, ****). Cette bande, de vitesse de migration plus faible que l'oligonucléotide de départ, correspondrait au produit de la réduction de la base de Schiff formée entre le site abasique et le ligand, avant la coupure du site abasique par celui-ci (*Figure 82*). De plus, l'apparition d'une deuxième bande, de vitesse de migration très proche de la bande ***, pourrait correspondre au produit de la réduction de la base de Schiff formée entre le ligand et le produit de clivage de type β -élimination. Ainsi la bande *** serait le résultat de la formation d'un adduit covalent stable mais non-réduit entre le ligand et son propre produit de clivage de type β -élimination, qui pourrait ensuite subir une attaque nucléophile sur le groupement imine ainsi formé de la part d'un deuxième groupement amine cyclique. L'important retard de migration du produit, vis-à-vis des autres produits de clivage, serait en accord avec une neutralisation partielle des charges présentes sur l'oligonucléotide par le ligand polycationique (de trois à quatre charges positives).

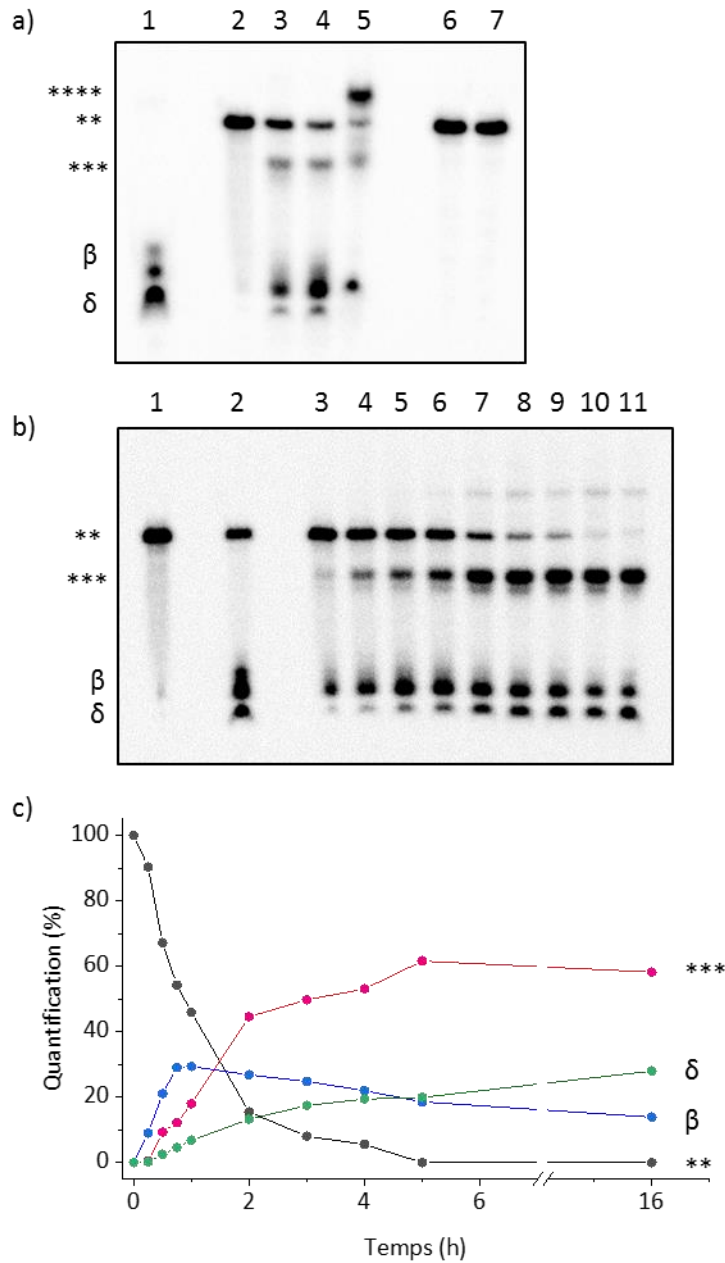


Figure 81- a) Analyse par PAGE de la formation d'un adduit covalent entre le ligand 2,7-BisNP-NH et le site abasique. Ligne 1) ADN 17-TX incubé avec 0,5 M NaOH ; 2) ADN 17-TX non traité ; 3) ADN 17-TX (0,2 μM) incubé avec le ligand 2,7-BisNP-NH (5 μM) ; 4) traitement identique à la ligne 3 mais chauffé à 90 °C (5 min) ; 5) ADN 17-TX incubé avec le ligand 2,7-BisNP-NH (5 μM) et NaCNBH₃ (25 mM), suivi par l'addition de NaBH₄ (100 mM) avant l'analyse PAGE ; 6) 17-TU non traité ; 7) 17-TU incubé avec le ligand 2,7-BisNP-NH (5 μM). **b) Analyse par PAGE de l'évolution de la formation d'un adduit covalent entre le ligand 2,7-BisNP-NH et le site abasique au cours du temps.** Ligne 1) ADN 17-TX incubé 16 h sans ligand ; 2) 17-TX incubé 1 h avec NaOH (0,05 M) ; 3- 11) 17-TX (0,2 μM) incubé avec le ligand 2,7-BisNP-NH (5 μM) pendant ¼, ½, ¾, 1, 2, 3, 4, 5 et 16 h respectivement. Bande : **) substrat non modifié ; ***) adduit covalent ligand-ADN ; *****) intermédiaire imine réduit ; β) produit de β-élimination (ou sa forme réduite a- ligne 5) ; δ) produit de β,δ-élimination. **c) Quantification de la formation des différents produits obtenus par PAGE.**

Dans un deuxième temps, l'évolution de la formation de cet adduit au cours du temps a été étudiée. Comme le montre l'analyse par PAGE (Figure 81, b et c), le pourcentage de produit formé augmente au cours du temps pour atteindre un maximum d'environ 60% après cinq heures d'incubation, temps

nécessaire à la consommation totale du substrat de départ. L'augmentation de la quantité d'adduit est accompagnée de la diminution de la présence de produit de β -élimination (30% après 1 h d'incubation contre 18% après 5 h), mettant en évidence que le produit de β -élimination constitue un intermédiaire dans la formation de l'adduit.

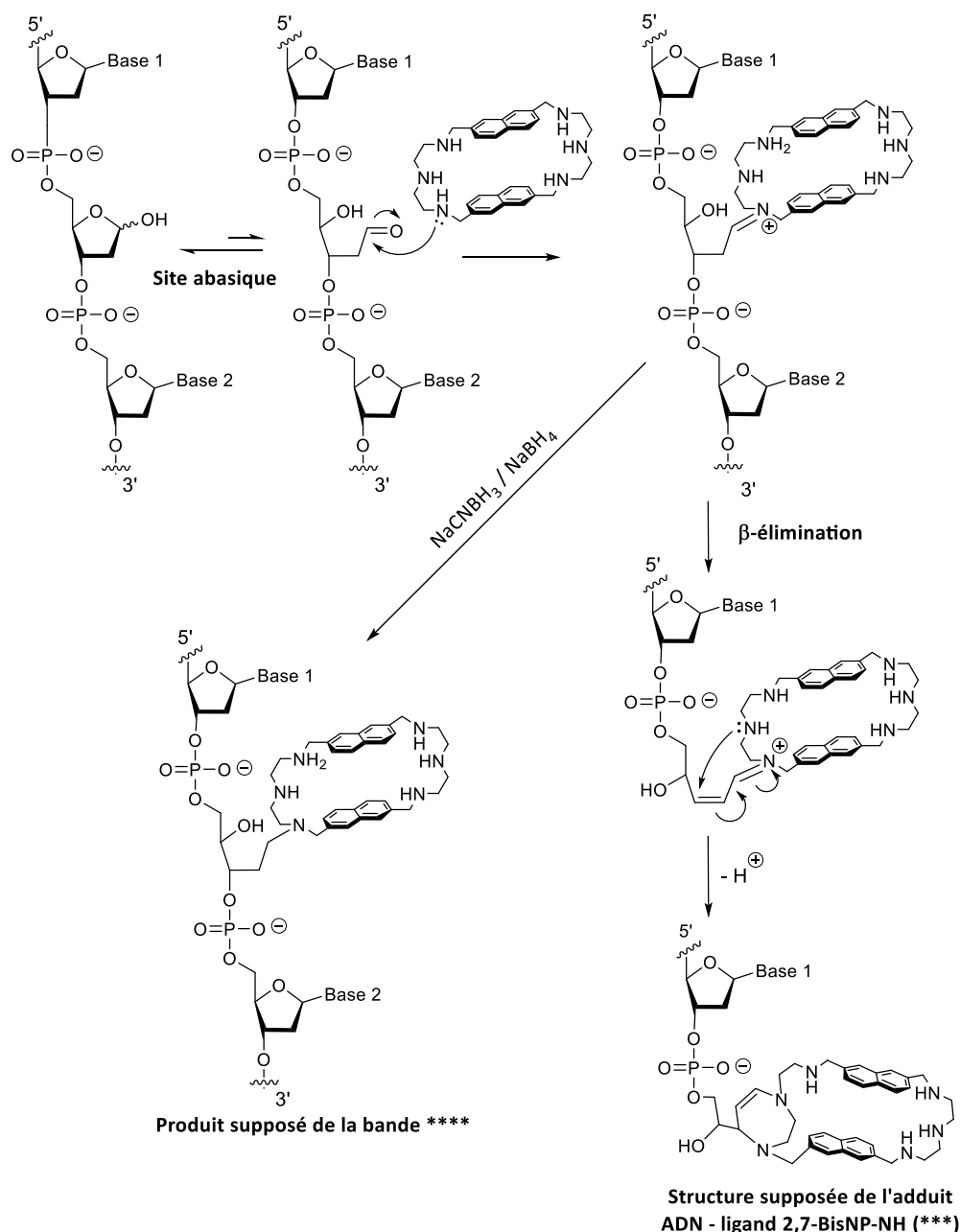


Figure 82- Proposition de structure des adduits covalents formés entre l'ADN et le ligand 2,7-BisNP-NH.

Dans le but de valider la structure de l'adduit ainsi formé entre l'ADN et le ligand 2,7-BisNP-NH une analyse par spectrométrie de masse a été effectuée. Ainsi après formation du site abasique dans les mêmes conditions que précédemment, l'oligonucléotide 17-TX (0,2 μ M) et le macrocycle 2,7-BisNP-NH (50 μ M) ont été incubés à 37 °C toute une nuit dans un tampon composé de chlorure de potassium (150 mM) et de cacodylate de potassium (10 mM), à pH = 7,2. Dans un second temps afin de permettre une analyse correcte, le milieu réactionnel a été concentré puis dessalé par

précipitation à l'éthanol et extraction sur phase solide inverse. Des analyses préliminaires par PAGE ont permis de s'assurer de la non-dégradation de l'adduit après ces différentes méthodes de purification. Le milieu réactionnel a ainsi à la suite été analysé par LC-MS (Figure 83).

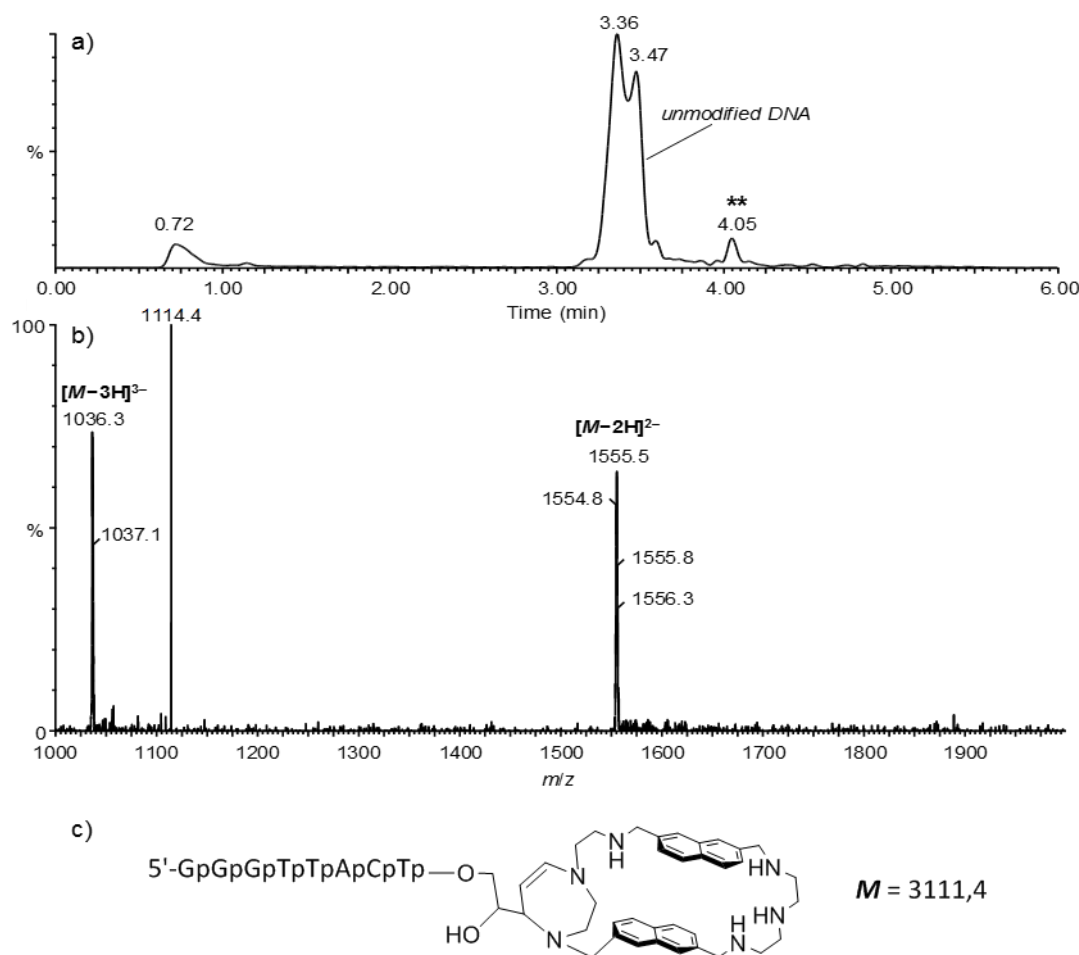


Figure 83- Total ion chromatogramme (TIC) du mélange réactionnel de 17-TX (0,2 μ M) avec le ligand 2,7-BisNP-NH (50 μ M) ; b) Spectre de masse du pic avec un temps de rétention $t_R = 4,05$ min (**). Le signal à m/z 1114,4 ne peut pas être attribué ; c) Structure supposée de l'adduit covalent formé entre le ligand 2,7-BisNP-NH et son produit de clivage de type β -élimination.

Le profil chromatographique révèle, en plus de la présence d'un pic non résolu contenant les produits de clivage et le brin complémentaire, un pic d'intensité plus faible affichant un temps de rétention plus grand ($t_R = 4,05$ min), cohérent avec un comportement plus lipophile dû au macrocycle. Le spectre de masse correspondant présente alors deux signaux d'ions moléculaires de $m/z = 1036$ et 1555 qui correspondrait à un adduit entre le ligand et le produit de β -élimination suite au clivage du site abasique ($M = 3111$ Da). A ce stade la structure exacte de l'adduit ne peut être définie sans ambiguïté, cependant celui-ci pourrait résulter d'une addition de type 1,4 conjuguée d'une amine voisine à celle impliquée dans la base de Schiff formée avec le produit de β -élimination (Figure 82 ; Figure 83, c). Cette addition conduirait alors à la formation d'un groupement cyclique de type 1,4-diazepine qui pourrait être également soumis à diverses isomérisations. L'implication de l'amine secondaire centrale de la chaîne polyamine pourrait expliquer la formation de cet adduit avec l'ADN principalement en présence du ligand 2,7-BisNP-NH.

Alors que la réactivité du produit de coupure du site abasique de type β -élimination avec des protéines présentant des fonctions amines,^{64,65} ainsi qu'avec les bases adénines adjacentes au site abasique⁶⁸ conduisant ainsi à la formation de pontages interbrins a été illustrée à plusieurs reprises, peu d'exemples dans la littérature font référence à la formation d'adduits covalents stables avec des petites molécules présentant des groupements amines. Cependant après avoir étudié la réaction entre l'aldéhyde insaturée résultant de la coupure du site abasique et les aminocarbazoles par addition de Michaël de type 1,4,²⁶⁰ Vasseur et al. ont montré la formation d'adduits de type pyrazole entre le produit de β -élimination et les phénylhydrazines suite à l'addition de type Michaël (1,4) de l'amine primaire de l'hydrazine suivie d'une étape de cyclisation par réaction de la deuxième fonction amine présente sur le composé (Figure 84).²⁶¹ Le mécanisme réactionnel démontré alors permet d'appuyer notre hypothèse réactionnelle conduisant à la formation de l'adduit entre le ligand 2,7-BisNP-NH et son produit de clivage du site abasique.

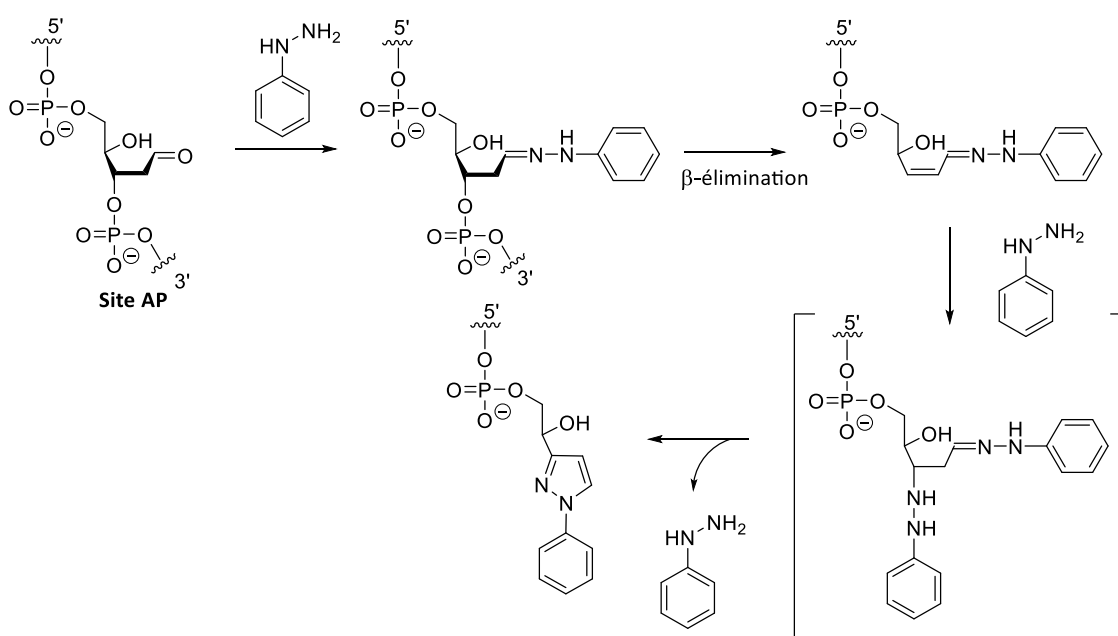


Figure 84- Schéma réactionnel de la formation d'un adduit de type pyrazole après réaction de la phénylhydrazine sur le produit de β -élimination du site AP.²⁶¹

Pour conclure il est intéressant de relever que tout en appartenant à la famille des ligands clivants le macrocycle 2,7-BisNP-NH a montré, suite à l'étude par PAGE après une heure d'incubation, la plus faible conversion du site abasique en produit de clivage (Figure 77). Cette constatation semble ainsi être la conséquence de l'implication d'une partie du ligand dans la formation de l'adduit avec l'ADN.

Enfin, le macrocycle 2,7-BisNP-S a également montré suite à l'analyse par PAGE (Figure 77) la formation d'un produit de vitesse de migration très proche de celle de l'adduit formé entre le ligand 2,7-BisNP-NH et le produit de β -élimination, mais tout en restant en quantité moindre (5% contre 20% pour l'adduit ADN-2,7-BisNP-NH). Hypothétiquement, en se basant sur l'étude effectuée avec le ligand 2,7-BisNP-NH et les exemples recensés dans la littérature de réactions de molécules sulfurées sur l'aldéhyde insaturé formé après clivage du site abasique,²⁵⁹ le produit pourrait résulter de la formation d'un adduit entre le ligand 2,7-BisNP-S et son produit de clivage de type β -élimination. Cependant, des analyses approfondies sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

VI- Evaluation *in vitro* d'inhibiteurs connus d'APE1

1- Etude de l'interaction avec l'enzyme APE1

a- Principe de la méthode *Differential Scanning Fluorimetry* et conditions de l'étude

Dans le but d'identifier rapidement de nouvelles cibles thérapeutiques, le développement de méthodes permettant d'évaluer simplement l'interaction entre les ligands et leur potentiel cible enzymatique a été fortement nécessaire. Il est connu depuis de nombreuses années que la fixation d'un ligand au niveau du site actif d'une enzyme conduit à un changement de conformation de la protéine entraînant ainsi une stabilisation thermique de l'enzyme.^{262,263} L'énergie thermique dégagée au cours de cette transition structurale a longtemps été étudiée par *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dans le but de déterminer l'affinité d'un ligand pour l'enzyme cible.^{264,265} Cependant cette méthode ne permet pas un criblage de ligands à grande échelle. Ainsi plus récemment en 2006, Vedadi et al. ont mis au point une nouvelle méthode basée sur l'étude de la dénaturation thermique des protéines par fluorescence, appelée alors *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF).^{266,267} Au cours de l'étude la détection du changement de conformation de la protéine est rendue possible grâce au suivi de l'émission de fluorescence d'un colorant. En effet, en se fixant au niveau des régions hydrophobiques accessibles seulement après dénaturation de l'enzyme, le colorant va émettre un signal fluorescent (*Figure 85*). Les courbes de suivi de fluorescence ainsi obtenues suite à l'augmentation de la température permettent alors de déterminer la température de dénaturation de l'enzyme étudiée, température de transition entre l'état natif et l'état dénaturé de la protéine. Comme lors de l'étude de l'affinité des ligands pour l'ADN, la présence d'un ligand affin pour l'enzyme entraîne alors une augmentation de la température de transition due à la stabilisation qu'il induit. La différence de température de transition (ΔT_m) en présence et en absence de ligand reflète ainsi l'interaction ligand-protéine.

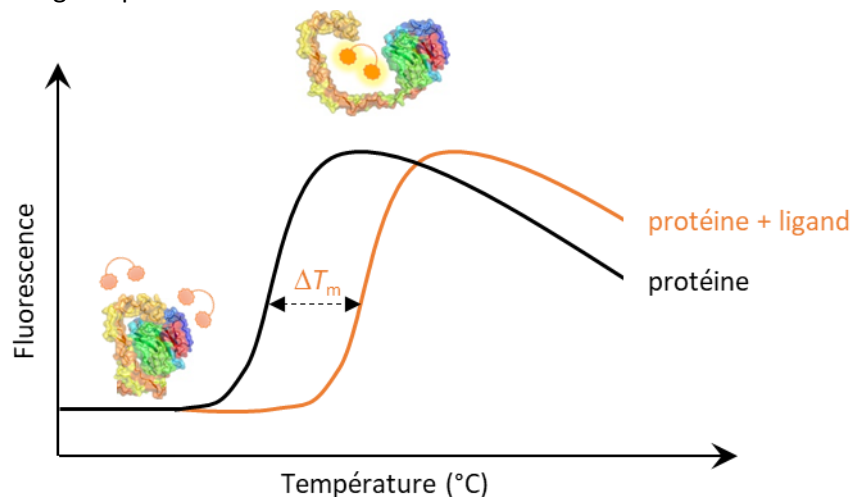


Figure 85- Principe de la méthode *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF).

Dans le but de conforter le mode d'action des macrocycles, c'est-à-dire une inhibition indirecte d'APE1, l'interaction de deux ligands types (2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O4Me) avec l'enzyme APE1 a donc été évaluée par *Differential Scanning Fluorimetry* ainsi que celle de plusieurs inhibiteurs connus.

Afin de valider nos conditions expérimentales, l'acide aurintricarboxylique (ATA) connu pour inhiber fortement les protéines interagissant avec l'ADN a également été ajouté à l'étude.¹¹⁷⁻¹¹⁹

L'interaction des ligands à 20 μM (50 eq) et 100 μM (250 eq) avec APE1 à 0,4 μM a ainsi été évaluée dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0 en présence du colorant SYPRO Orange (1X). L'intensité de fluorescence du colorant ($\lambda_{\text{ex}} = 492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$) a été suivie sur une rampe de température de 10 $^\circ\text{C}$ à 70 $^\circ\text{C}$ avec une augmentation de la température de 0,5 $^\circ\text{C}/\text{minute}$. La température de dénaturation de l'enzyme a ensuite été déterminée par la dérivée première de la courbe de fluorescence en fonction de la température. En absence de ligands, APE1 affiche une température de dénaturation de $47,7 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Puis dans un second temps, l'influence de la présence du substrat d'APE1 a également été évaluée à 0,44 μM (1,1 eq). Afin que les activités de clivage d'APE1 et des ligands n'interfèrent pas dans l'étude, un oligonucléotide porteur d'un site abasique de type THF et non clivable par l'enzyme a été utilisé. En effet, il a été montré que la présence d'une liaison phosphorothioate du côté 5' de l'analogue au site abasique de type THF réduit considérablement l'activité de clivage d'APE1 lorsque, de plus, le sucre du nucléotide précédent en 5' est substitué par un groupement méthoxyle en position 2' (Figure 86).²⁶⁸

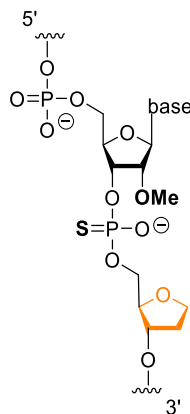


Figure 86- Structure de l'oligonucléotide non clivable par l'enzyme APE1.
L'analogue au site abasique de type THF est représenté en orange.

b- Résultats

Dans un premier temps, les références utilisées au cours de l'étude permettent de valider nos conditions expérimentales (Figure 87, a). En effet, tout d'abord ATA démontre une forte stabilisation de l'enzyme, dépendante de la concentration en composé, indiquant comme attendu une interaction entre le ligand et la protéine ($\Delta T_m^{\text{APE1}} > 5 \text{ }^\circ\text{C}$). De plus, le composé 9-aminoacridine et la méthoxyamine n'affichent pas d'affinité pour la protéine et présentent même une déstabilisation de l'enzyme à forte concentration.

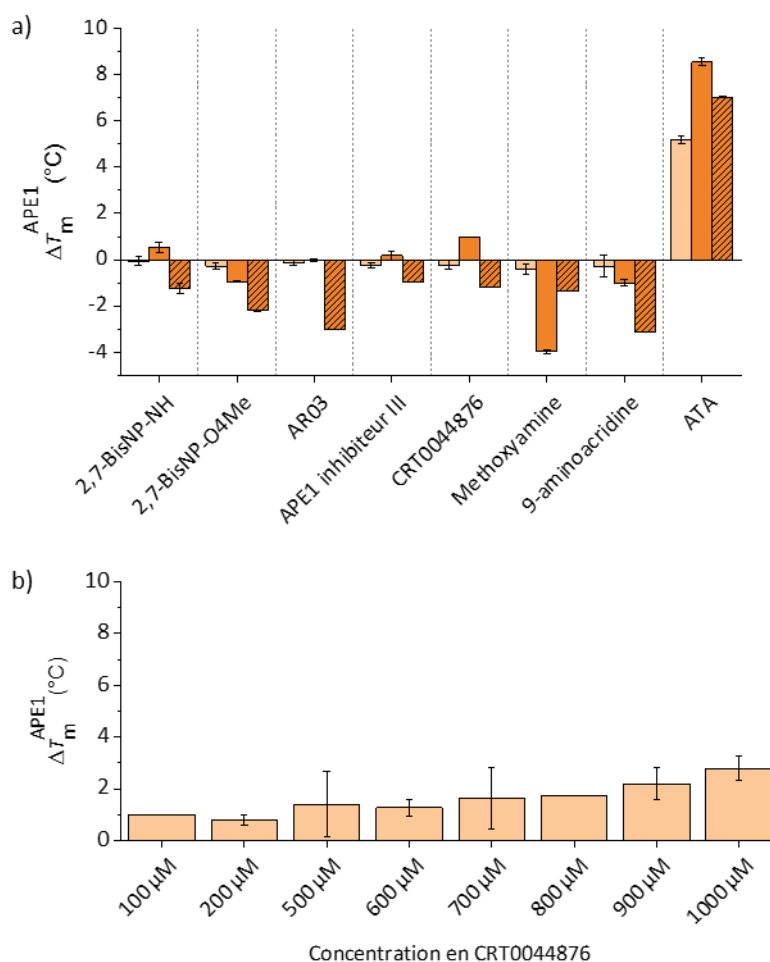


Figure 87- a) Stabilisation de l'enzyme APE1 induite par les ligands à 20 μM (barres claires) et à 100 μM (barres foncées), en absence (barres unies) et en présence (barres hachurées) d'ADN substrat non clivable ; b) Stabilisation de l'enzyme APE1 induite par le ligand CRT0044876 à différentes concentrations. Conditions : [APE1] = 0,4 μM, dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, SYPRO Orange (1X), [ADN substrat non clivable] = 0,44 μM.

Dans un second temps, les résultats de cette étude mettent en évidence l'absence d'affinité entre les deux ligands macrocycliques évalués et l'enzyme APE1. En effet ces ligands n'induisent aucune stabilisation de la protéine même en présence d'un fort excès ($\Delta T_m^{APE1} < 1 \text{ }^\circ\text{C}$), ce qui permet ainsi de renforcer le mode d'action établi des macrocycles, c'est-à-dire une inhibition indirecte de l'enzyme. Les inhibiteurs d'APE1 connus, AR03 et « APE1 inhibiteur III » ne démontrent également aucune interaction directe avec l'enzyme et affichent un comportement semblable aux ligands interagissant avec l'ADN (MX et 9-aminoacridine) en présentant une déstabilisation de la protéine en présence de substrat. Cette constatation, mise en parallèle avec l'affinité de ces ligands pour les sites abasiques déterminée par FRET-melting et la diminution de l'inhibition d'APE1 en présence d'ADN compétiteur, est de nouveau en faveur d'une activité des composés liée à une inhibition indirecte du clivage d'APE1 à l'instar des ligands macrocycliques.

Enfin le composé CRT0044876 décrit lui aussi dans la littérature pour interagir avec le site actif d'APE1^{110,129} affiche une très légère stabilisation de la protéine ($\approx 1 \text{ }^\circ\text{C}$) pour un excès de 250

équivalents en ligand (100 μM). En prenant en considération que la stabilisation induite sur la protéine est dépendante de la concentration en ligand, l'interaction du ligand CRT0044876 avec APE1 a été évaluée sur une gamme de concentration (*Figure 87, b*). Les résultats démontrent alors une augmentation de la stabilisation de l'enzyme à forte concentration en ligand, pour atteindre un $\Delta T_m^{\text{APE1}} = 2,8 \pm 0,5$ °C avec un excès de 2500 équivalents. Ainsi bien qu'interagissant avec la protéine, par comparaison avec le composé ATA, CRT0044876 ne présente pas une très forte affinité pour APE1.

2- Etudes de l'interaction avec l'ADN

Au cours des précédentes études, notamment par FRET-melting, les composés AR03 et « APE1 inhibiteur III » ont affiché un comportement semblable aux intercalants de l'ADN en induisant notamment une stabilisation des oligonucléotides porteurs des sites abasiques abolie très rapidement en présence d'ADN compétiteur (*Figure 67 ; Figure 68*). Cette observation met ainsi en valeur l'interaction non spécifique de ces composés avec l'ADN, contrairement cependant au composé CRT0044876 qui au cours de l'étude n'a pas affiché de stabilisation notable de l'ADN.

Dans le but de renforcer ces résultats, l'interaction de CRT0044876, AR03 et « APE1 inhibiteur III » avec l'ADN a été évaluée par titration spectrophotométrique. En effet il est bien connu que la formation d'un complexe entre l'ADN et un ligand, par intercalation de ce dernier entre les bases de l'ADN ou par liaison dans un sillon de l'ADN, entraîne un changement dans les propriétés d'absorption du ligand, visible par un décalage des maximums d'absorbance à des longueurs d'ondes plus grandes mais également par une diminution de l'absorbance (effet hypochrome).²⁶⁹ Ainsi les différents ligands à une concentration fixe en solution (50 μM) ont été dosés à l'aide d'une solution d'ADN génomique de veau dans un tampon composé de 100 mM de chlorure de potassium et 10 mM de cacodylate de potassium, pH = 7,2. L'absorbance au maximum d'absorption pour chaque ligand a ensuite été tracée en fonction du nombre d'équivalents d'ADN (*Figure 88*).

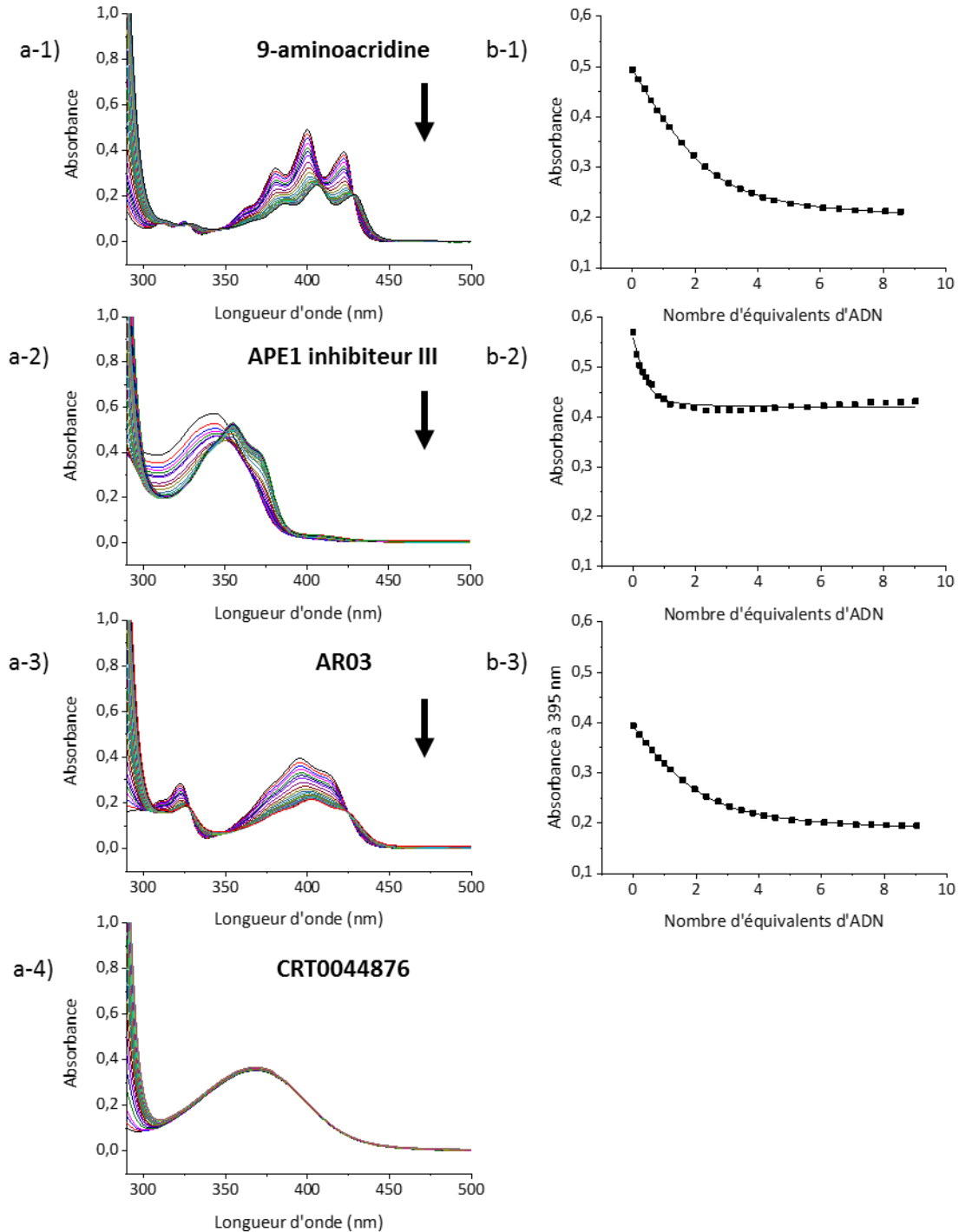


Figure 88- a) Etudes de l'évolution de l'absorbance des composés en fonction de la longueur d'onde et en fonction de la concentration en ADN génomique de veau ; b) Représentations graphiques de l'évolution de l'absorbance en fonction du nombre d'équivalents d'ADN rajouté à chaque ligand. Ligand 1) 9-aminoacridine ; 2) APE1 inhibiteur III ; 3) AR03 ; 4) CRT0044876. Absorbance étudiée à b-1) 400 nm ; b-2) 342 nm ; b-3) 395 nm. Conditions : [Ligand] = 50 μ M, [ct DNA] = 0 à 500 μ M, dans le tampon KAsO_2Me_2 10 mM, KCl 100 mM, pH = 7,2. Les flèches représentent l'effet hypochrome.

Les résultats obtenus mettent de nouveau en valeur l'interaction des ligands AR03 et « APE1 inhibiteur III » avec l'ADN. En effet les spectres d'absorption de ces composés présentent une diminution de l'absorbance des ligands suite à l'augmentation de la concentration en ADN en

solution (Figure 88, b-2 et b-3). Appuyé sur le modèle simplifié développé par Aldrich-Wright et al.,²⁷⁰ les courbes obtenues ont été modélisées permettant ainsi de déterminer la constante d'affinité K_a des composés pour l'ADN et le nombre de sites de fixation du ligand n par paire de bases d'ADN (Tableau 8). Les résultats ont ainsi permis d'établir que ces ligands présentent un comportement comparable à celui du 9-aminoacridine, constatations déjà établies au cours de l'étude de l'affinité et de la sélectivité des ligands envers les sites abasiques. En effet, AR03 affiche une constante d'affinité ainsi qu'un nombre de fixation sur l'ADN identiques au 9-aminoacridine. Tandis que, corroborée par une fixation plus importante sur l'ADN (n plus faible), « APE1 inhibiteur III » présente lui une constante d'affinité avec l'ADN plus élevée que le composé 9-aminoacridine mais qui reste néanmoins du même ordre de grandeur.

Tableau 8- Constantes d'affinité K_a et nombre de sites de fixation n des composés par paire de bases.

Composés	K_a (10^6 M^{-1})	n / paire de bases
9-aminoacridine	$0,11 \pm 0,01$ ^[a]	$2,5 \pm 0,1$
APE1 inhibiteur III	$0,34 \pm 0,03$	$0,7 \pm 0,3$
AR03	$0,10 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,3$

[a] Valeur de la littérature : $K_a = 0,4 \mu\text{M}^{-1}$.²⁷¹

Ainsi, toutes les données accumulées au cours des différentes études effectuées *in vitro* convergent vers la conclusion que ces deux composés présentent un comportement très similaire aux intercalants de l'ADN. En conséquence, leur activité serait due à une interaction non-spécifique avec l'ADN et non à une fixation sur le site actif de l'enzyme APE1. Cette hypothèse est confortée notamment par les données de la littérature.^{132,133} En effet AR03 a déjà été décrit pour interagir avec l'ADN, en démontrant la capacité à activer le gène p53 mais également à inhiber la transcription de l'ARN polymérase I. Ces études appuient ainsi nos conclusions et mettent en évidence une interaction non-spécifique d'AR03 avec l'ADN.

Concernant le composé CRT0044876, notre étude valide de nouveau l'absence d'affinité de ce composé pour l'ADN. En effet l'augmentation de la concentration en ADN n'induit aucune modification de son absorbance. Ainsi ces derniers résultats viennent appuyer les données de la littérature ainsi que celles précédemment établies et suggèrent une inhibition de l'activité d'APE1 suite à une interaction directe du composé avec l'enzyme.

3- Comparaison de l'activité inhibitrice de composés connus avec celle des macrocycles et effet de la présence d'ADN compétiteur

Dans le but de comparer l'activité inhibitrice et ainsi d'évaluer le potentiel des macrocycles, l'inhibition du clivage enzymatique de quelques inhibiteurs de la littérature a été évaluée. L'étude a été effectuée dans les mêmes conditions de concentration, de tampon et de température que lors de l'évaluation de l'activité inhibitrice des macrocycles précédemment détaillée, excepté que l'oligonucléotide 17-TΦ utilisé est porteur du fluorophore FAM en 5' d'un des brins et de l'extincteur de fluorescence TAMRA en 3' du brin complémentaire. En effet, les spectres d'émission et

d'excitation de certains inhibiteurs commerciaux, notamment les composés AR03 et 9-aminoacridine présentent un recouvrement avec les spectres d'émission et d'excitation du fluorophore ATTO 390, ne permettant pas de suivre correctement l'évolution de la fluorescence du fluorophore liée au clivage enzymatique. De plus pour cette étude comparative, seuls les ligands 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O ont été étudiés. Ces composés présentent la structure type des macrocycles et n'affichent pas d'interaction notable avec le fluorophore FAM sur les gammes en concentrations étudiées.

Dans un second temps, la capacité d'inhibition enzymatique des différents composés a été étudiée en présence d'ADN compétiteur dans le but de refléter leur affinité pour l'enzyme. En effet, l'activité inhibitrice des composés interagissant directement sur le site actif de l'enzyme ne doit pas être impactée par la présence d'ADN compétiteur et les IC_{50} de ces composés doivent rester inchangées. En revanche, l'activité d'inhibition doit diminuer en présence d'ADN compétiteur principalement pour les ligands interagissant avec l'ADN mais étant peu sélectifs pour les sites abasiques. En d'autres termes, plus la sélectivité des ligands pour les sites abasiques est importante moins la présence d'ADN compétiteur impacte l'activité d'inhibition de ces derniers.

La capacité d'inhibition d'APE1 par les composés a donc été testée en présence d'ADN génomique de veau (ct DNA) à une concentration de 26 μM soit 130 équivalents par rapport à l'oligonucléotide. L'évolution de la fluorescence du fluorophore FAM a été suivie ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) en temps réel puis l'activité enzymatique d'APE1 en fonction de la concentration en ligand a été déterminée comme précédemment (Figure 89). Les IC_{50} obtenues en absence et en présence d'ADN compétiteur sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 9- Tableau comparatif de l'activité d'inhibition du clivage enzymatique de l'oligonucléotide 17-T Φ par différents ligands en présence et en absence d'ADN compétiteur.^[a]

Ligands	IC_{50} (μM) en absence d'ADN compétiteur	IC_{50} (μM) en présence d'ADN compétiteur
2,7-BisNP-NH	0,06	0,10
2,7-BisNP-O	0,08	0,12
[Rh(bpy)₂(chrysi)]	0,12	0,08
AR03	0,50	1,10
APE1 inhibiteur III	0,26	0,60
CRT0044876	20,6	27,1
ATA	0,10	0,10
9-aminoacridine	1,32	1,49

[a] Conditions : [oligonucléotide] = 0,2 μM , dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, T = 37 °C, [ct DNA] = 26 μM .

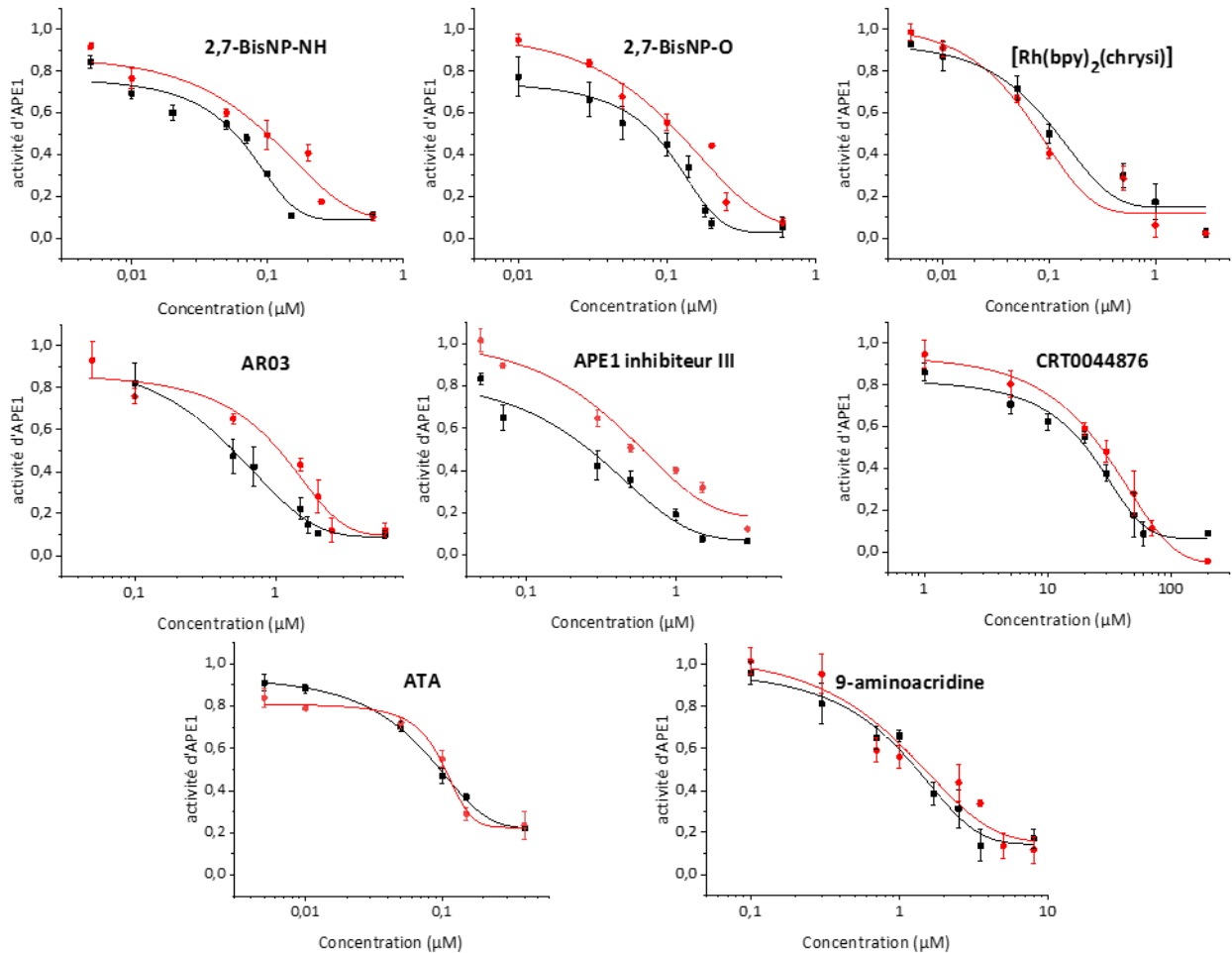


Figure 89- Représentations graphiques de l'inhibition de l'activité d'APE1 en fonction de la concentration en ligand en absence d'ADN compétiteur (courbes noires) et en présence d'ADN compétiteur (courbes rouges). Conditions : [oligonucléotide] = 0,2 μ M, dans le tampon HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 2 mM, pH = 8,0, T = 37 °C, [ct DNA] = 26 μ M.

Les ligands 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O mettent en valeur le fort potentiel des macrocycles en présentant au cours de l'étude les IC₅₀ les plus faibles, 0,06 μ M et 0,08 μ M respectivement en absence d'ADN compétiteur. En effet ils affichent une capacité d'inhibition du clivage enzymatique environ 4 à 300 fois supérieure à celle des inhibiteurs d'APE1 connus dans la littérature, par comparaison avec « APE1 inhibiteur III » et CRT0044876 respectivement. Ainsi en absence mais également en présence d'ADN compétiteur, les ligands macrocycliques présentent une activité d'inhibition comparable au ligand ATA qui, bien que non-spécifique à APE1, est décrit parmi les plus forts inhibiteurs des protéines interagissant avec l'ADN. Remarquablement le complexe de rhodium affiche dans ces conditions un comportement semblable aux macrocycles, malgré une affinité et une sélectivité pour les sites abasiques plus faibles démontrées au cours de l'étude par FRET-melting.

De plus, bien que son affinité et sa sélectivité pour les sites abasiques soient comparables à l'intercalant 9-aminoacridine, il est intéressant de relever que le ligand AR03 présente une meilleure capacité d'inhibition d'APE1 que ce dernier en absence d'ADN compétiteur. Cependant cette différence d'activité se réduit drastiquement en présence d'ADN génomique de veau, en effet

l'activité d'AR03 est alors divisée par 2,2 en présence d'ADN compétiteur. Cette constatation mise en parallèle avec la chute drastique d'affinité en présence d'ADN compétiteur observée par FRET-melting et l'interaction observée par titration UV-visible tend à confirmer qu'AR03 se fixe à l'ADN et non à l'enzyme, contrairement à ce qui est décrit. Il en est de même pour le ligand « APE1 inhibiteur III » qui affiche une activité diminuée d'un facteur 2,3 en présence d'ADN compétiteur.

Concernant l'inhibiteur CRT0044876, les résultats mettent en valeur sa faible capacité d'inhibition du clivage enzymatique. Cependant, il est intéressant de noter une plus faible variation d'IC₅₀ en présence d'ADN compétiteur (diminution de l'activité d'un facteur 1,3) par comparaison aux inhibiteurs AR03 et « APE1 inhibiteur III ». Ce fait corrélé au manque d'affinité de ce composé pour l'ADN observé par FRET-melting, permet de renforcer l'hypothèse d'une interaction directe de la molécule avec l'enzyme APE1, comme explicitée dans la littérature.¹¹⁰

VII- Conclusion

Les études biophysiques et biochimiques présentées au cours de ce chapitre ont permis de montrer les différentes interactions des macrocycles avec l'ADN *in vitro*, mettant en valeur le fort potentiel des ligands 2,7-BisNP (Figure 90). En effet, les résultats obtenus ont permis de démontrer que la très bonne affinité de la grande majorité des ligands pour les sites abasiques (étudiée par FRET-melting) conduit à une inhibition efficace de l'activité de clivage d'APE1, validant remarquablement la stratégie d'une inhibition enzymatique indirecte. De plus, certains ligands ont affiché la capacité de cliver le site abasique par β -élimination ce qui pourrait ainsi conduire à une amplification des dommages à l'ADN, activité cependant dépendante de la structure moléculaire du macrocycle. Enfin, un ligand a présenté la capacité à former un adduit stable covalent avec son produit de coupure de type β -élimination, ouvrant la voie à de nouvelles applications.

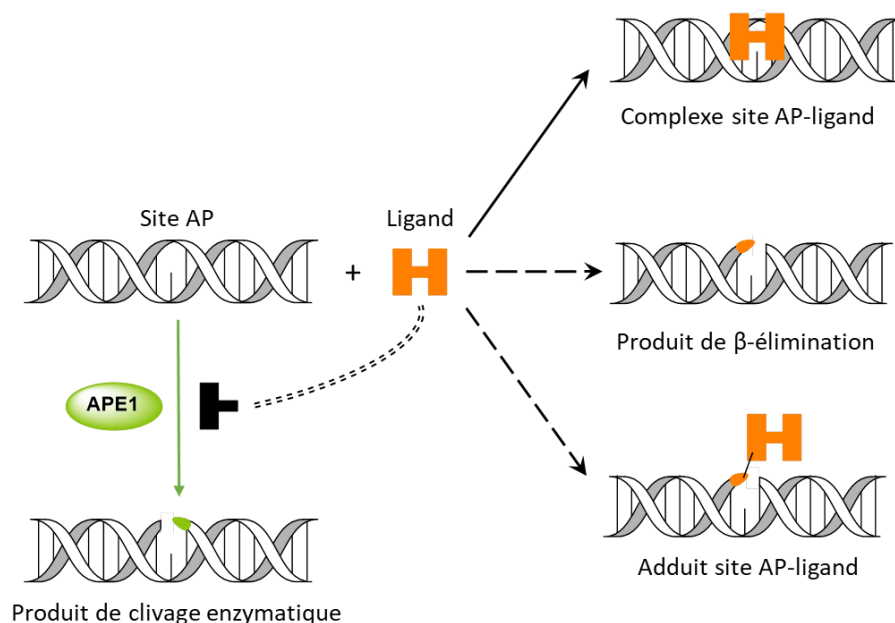


Figure 90- Schématisation des différentes interactions des ligands macrocycliques avec l'ADN porteur d'un site abasique. Les flèches en pointillé représentent une activité dépendante de la structure moléculaire du macrocycle.

Dans le détail, en premier lieu la plupart de ces macrocycles ont affiché une très bonne stabilisation de l'ADN porteur d'un site abasique, comparable voire même meilleure que celle présentée par des ligands affins de l'ADN bien connus comme le bromure d'éthidium. De plus ils ont démontré une sélectivité envers les sites abasiques remarquablement supérieure aux ligands décrits dans la littérature, dont le complexe de rhodium $[Rh(\text{chrysi})(\text{bpy})_2]$, mis en évidence notamment par la faible perte de stabilisation de l'oligonucléotide porteur du site abasique en présence d'ADN compétiteur. La variété structurale des ligands a permis d'évaluer l'influence de la position des différents substituants présentés par les macrocycles sur l'affinité et la sélectivité de ces derniers pour les sites abasiques. Il a ainsi été montré que la présence de groupements alkyles au milieu de la chaîne polyamine n'induit pas de perte de stabilisation, à l'inverse de la substitution des fonctions amino benzyls. Cette dernière empêcherait la formation de liaisons hydrogènes entre les amines protonées du ligand et les groupements carbonyles présents sur les bases guanines et thymines, ce qui expliquerait la baisse d'affinité observée avec certains macrocycles comme le 2,7-BisNP-O8Me.

Dans un second temps, les macrocycles ont montré une très bonne capacité à inhiber l'activité de clivage d'APE1, en affichant pour le meilleur inhibiteur (2,7-BisNP-NNH₂) une constante d'inhibition K_i de 39 nM. Les constantes d'affinité des ligands pour les sites abasiques ($1/K_i$) alors obtenues corrélaient remarquablement avec la stabilisation de l'ADN par les ligands ($\Delta T_m^{T\Phi}$) en présence d'un excès en ADN compétiteur. En effet, les macrocycles présentant la meilleure affinité et sélectivité pour les sites abasiques (2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe) affichent la meilleure inhibition de l'activité enzymatique. Ces résultats prometteurs confortent alors le modèle d'une inhibition indirecte de l'activité d'APE1 par les ligands et mettent en valeur l'efficacité d'une inhibition de la réparation de l'ADN qui ciblerait directement le substrat de l'enzyme, l'ADN. De plus, en démontrant une inhibition du clivage enzymatique de 4 à 300 fois supérieure à celle d'inhibiteurs d'APE1 décrits dans la littérature, notamment AR03 et CRT0044876, les macrocycles apparaissent comme des composés très prometteurs dans le cadre d'une stratégie anticancéreuse par inhibition de la réparation de l'ADN.

Enfin la diversité structurale des ligands macrocycliques a permis de mettre en évidence la capacité de certains d'entre eux à endommager l'ADN *in vitro*. En effet, certains composés ont montré une activité de clivage des sites abasiques modulée par la présence et la position de substituants sur leur structure. Une étude plus approfondie a permis de séparer les macrocycles en trois groupes, les ligands fortement clivants (2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-NNH₂), les ligands possédant une activité de clivage modérée (2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-NH, 1,5-BisNP-O et 9,10-BisAN) et les ligands ne montrant aucune activité de clivage (2,7-BisNP-O4Me, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua, 2,7-BisNP-Im). Les produits de coupure ainsi formés, de type β -élimination et/ou de type β,δ -élimination, sont différents de ceux générés à la suite du clivage enzymatique du site abasique par APE1. En conséquence, ils ne peuvent donc pas être pris en charge et réparés par la voie BER. Ainsi, certains ligands pourraient permettre d'augmenter les dommages à l'ADN et ainsi renforcer l'action des agents alkylants.

De plus, au cours des différentes études *in vitro*, la formation d'un adduit entre le ligand 2,7-BisNP-NH et son produit de clivage de l'ADN de type β -élimination a remarquablement été mise en valeur. La formation de cet adduit est particulièrement intéressante, en effet elle ouvre la possibilité de l'utilisation des macrocycles pour diverses autres applications comme la détection, la quantification ou encore le marquage des sites abasiques. Mais également par analogie avec la formation d'adduits à l'ADN suite à l'action de certains agents alkylants, la formation de cet adduit pourrait potentiellement être fortement cytotoxique pour la cellule en empêchant la réplication de l'ADN par les ADN polymérases.

Pour finir, l'évaluation des inhibiteurs AR03 et « APE1 inhibiteur III », décrits dans la littérature, au cours des différentes études effectuées *in vitro* a soulevé quelques interrogations. En effet, alors que ces derniers sont décrits pour interagir avec le site actif de l'enzyme APE1, ils ont affiché dans nos études une forte affinité pour l'ADN sans néanmoins démontrer une bonne sélectivité pour les sites abasiques. De plus, l'absence d'interaction directe avec l'enzyme a également été mise en valeur. Ainsi les conclusions des différentes études tendent à valider un mode d'action des ligands AR03 et « APE1 inhibiteur III » par interaction avec le substrat de l'enzyme contrairement à ce qui est décrit.

Les résultats présentés dans ce chapitre et résumés dans les *Tableau 10* et *Tableau 11* ont fait l'objet d'une publication.²⁷²

Tableau 10- Sommaire qualitatif des différentes propriétés des macrocycles.

Ligand	Interaction avec les sites AP ^[a]		Inhibition indirecte d'APE1 ^[b]	Clivage des sites AP ^[c]	Formation d'un adduit
	Affinité	Sélectivité			
2,7-BisNP-NH	+++	++	+++	+	++
2,7-BisNP-O	+++	+++	+++	+	± ^[d]
2,7-BisNP-S	++	+	+	+++	± ^[d]
2,7-BisNP-NMe	+++	++	+++	+	-
2,7-BisNP-NNH ₂	+++	+++	+++	++	-
2,7-BisNP-NOH	+++	++	+++	+	-
2,7-BisNP-O4Me	+	+	+	-	-
2,7-BisNP-O8Me	++	++	++	-	-
2,7-BisNP-O4Gua	++	++	+++	-	-
2,7-BisNP-Im	+	++	++	-	-
1,5-BisNP-O	+++	+	++	+	-
2,7-TrisNP	++	+++	+++	+	-

[a] $\Delta T_m^{T\Phi} < 6$ (+), 6 à 9 (++) , > 9 °C (+++). [b] $K_i > 2000$ (+), 200 à 2000 (++) , < 200 nM (+++). [c] comme discuté dans le Chapitre II- IV. [d] Traces.

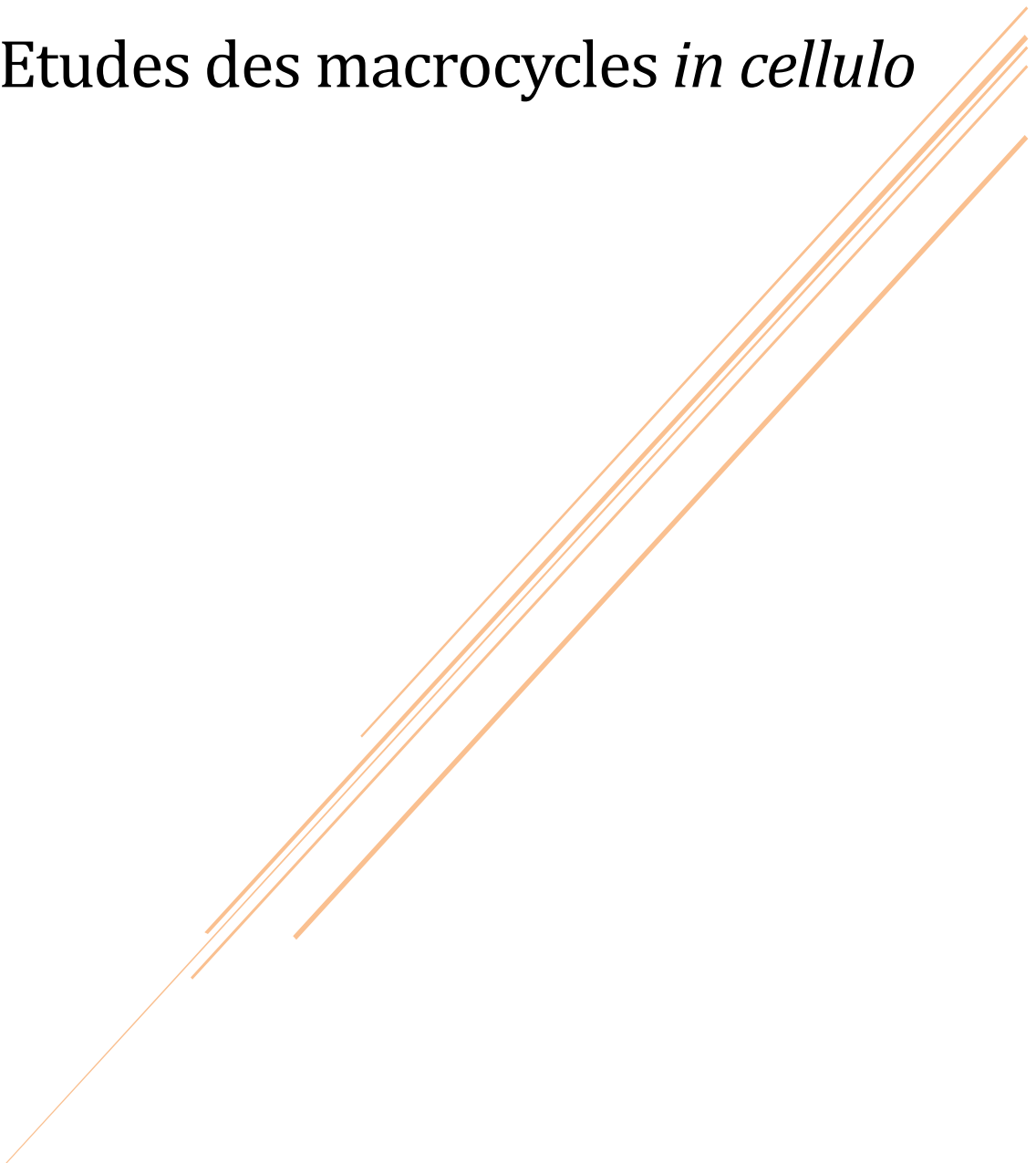
Tableau 11- Comparaison qualitatif des propriétés du macrocycle 2,7-BisNP-NH et d'inhibiteurs d'APE1 connus.

Inhibiteurs	Interaction directe avec APE1 ^[a]	Inhibition de l'activité d'APE1 ^[b]	Interaction non spécifique avec l'ADN	Interaction avec les sites AP ^[c]	
				Affinité	Sélectivité
2,7-BisNP-NH	-	+++	n.t.	+++	++
[Rh(bpy) ₂ (chrysi)]	n.t.	+++	n.t.	++	+
CRT0044876	+	+	-	-	-
AR03	-	++	+	+	-
APE1 inhibiteur III	-	++	+	+	-
ATA	++	+++	n.t.	n.t.	n.t.
9-aminoacridine	-	++	+	+	-

[a] $\Delta T_m^{APE1} < 1$ (-), 1 à 5 (+), > 5 °C (++) . [b] $IC_{50} > 20$ (+), 2 à 0,2 (++) , < 0,20 μM (+++). [c] $\Delta T_m^{T\Phi} < 2$ (-), 2 à 6 (+), 6 à 9 (++) , > 9 °C (+++). n.t. = non testé.

Chapitre III :

Etudes des macrocycles *in cellulo*



I- Etude de la cytotoxicité des macrocycles

1- Méthodes

a- Evaluation de la cytotoxicité et de l'effet de la combinaison des composés

Afin d'évaluer la cytotoxicité de nos composés sur différentes lignées de cellules cancéreuses adhérentes, seuls ou en combinaison avec un agent alkylant, deux méthodes ont principalement été utilisées : l'étude de la prolifération cellulaire et l'étude de la viabilité cellulaire.

La prolifération des cellules a été évaluée à l'aide d'un compteur de cellules. Celui-ci permet de déterminer le nombre de cellules adhérentes présentes en fin d'expérience après trypsinisation et en ayant préalablement éliminé les cellules mortes qui n'adhèrent alors plus. Cette méthode est précise mais fastidieuse car elle nécessite de traiter chaque condition séparément, ce qui en limite le nombre effectué simultanément.

Dans le but de pouvoir tester un plus grand nombre de conditions en simultanément, le test CellTiter-Glo® commercialisé par la société Promega a été utilisé. Ce test permet de déterminer le nombre de cellules viables dans le milieu, c'est-à-dire le nombre de cellules métaboliquement actives, en quantifiant l'ATP des cellules grâce à une mesure de luminescence. Après lyse des cellules, l'ATP est dosé par un test luminescent utilisant la luciférase et son substrat, la luciférine. L'intensité du signal luminescent généré alors est proportionnelle à la quantité d'ATP présent dans la cellule, qui est elle-même proportionnelle au nombre de cellules vivantes. En effet, la luciférase catalyse la mono-oxygénation de la luciférine en présence de Mg^{2+} , d'oxygène et d'ATP, ce qui aboutit à l'émission d'un signal luminescent (Figure 91).

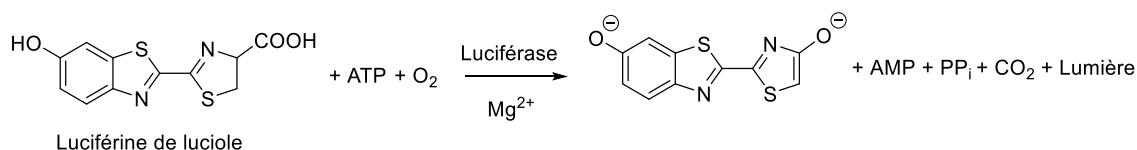


Figure 91- Réaction catalysée par la luciférase.

L'utilisation de ce test a nécessité au préalable de déterminer, pour chaque lignée cellulaire, les concentrations cellulaires initiales optimales, c'est-à-dire la gamme de concentrations dans laquelle le signal luminescent est bien proportionnel à la concentration en cellules. En effet, si le nombre de cellules est trop important, une saturation du signal luminescent est observée (Figure 92).

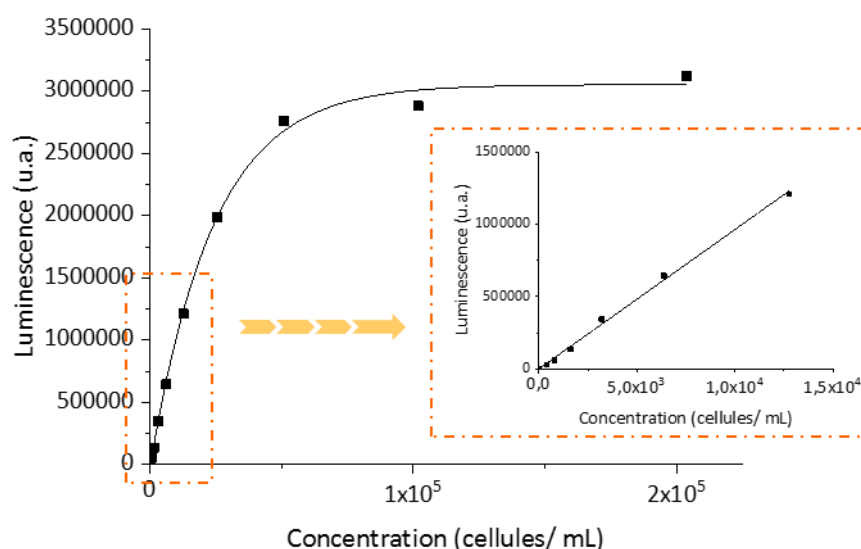


Figure 92- Exemple de l'évolution de la luminescence en fonction de la concentration des cellules U87MG.

L'utilisation de ce test a été préférée à celle du test Resazurin, commercialisé par la société Cell Signaling Technology qui permet de déterminer également la viabilité des cellules mais en mesurant un signal fluorescent. En comparant les deux tests, le test CellTiter-Glo® a révélé être plus sensible, en effet pour de faibles concentrations cellulaires celui-ci est plus précis.

Afin d'évaluer l'effet cytotoxique de la combinaison des macrocycles avec les agents alkylants, le modèle *Bliss Independance* a été utilisé, ce dernier étant le plus couramment utilisé.^{273,274} Celui-ci est basé sur la comparaison de l'effet de la combinaison des deux composés (E_{AB} , c.-à-d. l'inhibition de la prolifération des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées) avec l'effet individuel des deux composés (E_A et E_B). Il suppose l'absence d'interaction entre les deux drogues et que ces dernières agissent de manière indépendante mais que chacune peut contribuer à un résultat commun. Avec ce modèle, la viabilité des cellules traitées avec une combinaison de deux composés ($V_{AB} = 1 - E_{AB}$) est comparée avec les viabilités (V_A et V_B) des cellules traitées avec les composés A et B individuellement, ainsi : $V_{AB} > V_A \times V_B$ caractérise un effet antagoniste entre les deux composés, $V_{AB} = V_A \times V_B$ un effet additif et $V_{AB} < V_A \times V_B$ un effet synergique. Pour analyser les résultats obtenus, la viabilité expérimentale des cellules traitées en combinaison avec les ligands et le TMZ (V_{L-TMZ}^{exp}) est donc comparée à la viabilité théorique, calculée en multipliant la viabilité expérimentale des cellules traitées avec les macrocycles seuls et la viabilité expérimentale des cellules traitées avec le TMZ seul, suivant l'équation (7):

$$V_{L-TMZ}^{théorique} = V_L^{exp} \times V_{TMZ}^{exp}. \quad (7)$$

L'écart type σ est alors donné par l'équation (8) :

$$\sigma^2 = (V_{L-TMZ}^{théorique})^2 \times \left(\frac{\sigma_x^2}{x^2} + \frac{\sigma_y^2}{y^2} \right), \quad (8)$$

avec $x = V_L^{exp}$, $y = V_{TMZ}^{exp}$ et σ_x , σ_y les écarts types respectifs.

Ainsi, les effets suivant pourront être observés entre les deux composés :

- **effet antagoniste** : $V_{L-TMZ}^{exp} > V_{L-TMZ}^{théorique}$
- **effet additif** : $V_{L-TMZ}^{exp} = V_{L-TMZ}^{théorique}$
- **effet synergique** : $V_{L-TMZ}^{exp} < V_{L-TMZ}^{théorique}$

Dans les cas où un effet combinatoire intéressant a été relevé, les indices combinatoires (*combinatorial index* – C.I.) ont été calculés en utilisant le logiciel CompuSyn basé sur la méthode Chou – Talalay. Cette dernière, principalement utilisée, présente l'avantage de proposer un algorithme permettant la quantification de l'effet cytotoxique obtenu suite à la combinaison de plusieurs composés.^{275,276}

Ainsi avec ce modèle, les effets combinatoires sont caractérisés par :

- **effet antagoniste** : C.I. > 1
- **effet additif** : C.I. = 1
- **effet synergique** : C.I. < 1

b- Présentation des lignées cellulaires

L'étude de la toxicité des macrocycles a été effectuée sur trois lignées de cellules cancéreuses adhérentes, deux lignées de glioblastome (T98G et U87MG) et une lignée de colon (HCT116).

Le glioblastome est la forme maligne de cancer du cerveau la plus fréquente chez l'adulte et la plus agressive. Pour 100 000 personnes en Europe et en Amérique du Nord, le glioblastome représente deux à trois cas, cependant, très peu de traitements existent. Malgré le développement de la radiothérapie et des traitements médicamenteux, le taux de survie sur deux ans est inférieur à 20%. De plus, environ 50% des patients ne répondent pas correctement aux traitements existants. Ainsi l'intérêt d'augmenter la cytotoxicité des agents anticancéreux ayant la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique est très grand.

La lignée T98G est une lignée de glioblastome principalement décrite pour sa résistance à l'action des agents alkylants dont notamment le témozolomide ($GI_{50} = 600 \mu M$ après 48 h de traitement).^{104,277} En effet, pour rappel, le témozolomide est un agent alkylant de type S_N1 conduisant ainsi à la formation d'adduits de type azoté (N^7 -méthylguanine et N^3 -méthyladénine principalement) mais également à la formation de la base O^6 -méthylguanine. La principale source de résistance identifiée de la lignée T98G réside en l'expression de la MGMT au sein de cette lignée impliquée dans la réparation de la base fortement cytotoxique O^6 -méthylguanine (Figure 14). Le témozolomide, ayant la capacité de pénétrer la barrière hémato-encéphalique grâce à sa nature lipophile, est un agent anticancéreux d'intérêt clinique ainsi l'augmentation de son efficacité est un enjeu important. De ce fait, l'évaluation des ligands macrocycliques en combinaison avec le témozolomide, dans un premier temps, sur cette lignée est apparue comme de fort intérêt.

Afin d'étendre l'étude de la toxicité cellulaire des macrocycles, une deuxième lignée de glioblastome a été choisie, la lignée U87MG. Cette dernière, contrairement à la lignée T98G, est décrite dans la littérature pour sa sensibilité aux agents alkylants et notamment au témozolomide.^{104,277} En effet, la

voie de réparation MGMT n'est que peu exprimée au sein de la lignée U87MG, conséquence de la méthylation partielle du promoteur.²⁷⁸

Pour finir, l'effet cytotoxique de la combinaison des ligands avec les agents alkylants a également été évalué sur la lignée cancéreuse de colon HCT116. Cette lignée présente la particularité d'être déficiente en la voie de réparation MMR, cette dernière conduisant notamment à l'effet cytotoxique des agents alkylants formant la base O⁶-méthylguanine (*Figure 14*). La lignée HCT116 présente ainsi une résistance notamment au témozolomide. Des études ont cependant montré que l'incubation combinée de la méthoxyamine avec le témozolomide permettait d'augmenter la sensibilité des cellules.^{279,280} La méthoxyamine ayant potentiellement la même cible biologique que les macrocycles, il est intéressant d'évaluer l'effet des ligands sur cette lignée.

2- Evaluation de la cytotoxicité des macrocycles sur la lignée de glioblastome T98G

a- Etude de la cytotoxicité des macrocycles seuls

La toxicité des différents macrocycles sur la lignée T98G a été déterminée tout d'abord en absence d'agents alkylants en évaluant la prolifération des cellules après 96 h de traitement en présence d'une gamme de concentrations en composés (*Figure 93*). Après modélisation des courbes obtenues basée sur le modèle dose-réponse, la cytotoxicité des ligands a ensuite été retranscrite sous le paramètre GI₅₀ (*Growth Inhibition*) représentant la concentration en ligand inhibant 50% de la prolifération des cellules (*Tableau 12*).

Afin d'évaluer le potentiel des ligands macrocycliques, la cytotoxicité des inhibiteurs d'APE1 décrits dans la littérature AR03, « APE1 inhibiteur III », CRT0044876, méthoxyamine mais aussi celle du complexe de rhodium [Rh(chrysi)(bpy)₂] a été déterminée dans les mêmes conditions. Les agents alkylants TMZ, MMS et BCNU ont également été étudiés afin de déterminer les concentrations pour l'évaluation de leur combinaison avec les ligands. Il est important de noter que les résultats obtenus avec les différents composés connus sont difficilement comparables à ceux décrits dans la littérature car les GI₅₀ sont fortement dépendantes du temps d'incubation avec les cellules ainsi que de la lignée cellulaire utilisée.

Tableau 12- Valeurs des GI_{50} obtenues sur la lignée T98G après 96 h de traitement.

	Inhibiteurs	GI_{50}^{T98G} (μM) ^[a]	
Ligands macrocycliques	1,5-BisNP-O	0,20	(0,10 – 0,30)
	2,7-TrisNP	0,30	(0,10 – 0,50)
	2,7-BisNP-O	0,40	(0,40 – 0,50)
	2,7-BisNP-NMe	0,60	(0,50 – 0,70)
	2,7-BisNP-O4Gua	0,70	(0,10 – 2,50)
	2,7-BisNP-S	1,20	(1,20 – 1,30)
	2,7-BisNP-NOH	1,60	(0,60 – 1,90)
	2,7-BisNP-NH	2,20	(0,90 – 3,50)
	2,7-BisNP-O4Me	3,10	(2,50 – 4,10)
	2,7-BisNP-Im	3,30	(1,25 – 10,6)
	2,7-BisNP-O8Me	> 70	
	2,7-BisNP-NNH ₂	> 70	
	Inhibiteurs connus	[Rh(chrysi)(bpy) ₂]	3,70
AR03		1,80	(1,50 – 2,30)
APE1 inhibiteur III		1,10	(0,05 – 1,40)
MX		> 70	
CRT0044876		> 70	
Agents alkylants	TMZ	345	(300 – 370)
	MMS	92,5	(88,5 – 96,6)
	BCNU	84,1	(84,0 – 85,4)

[a] GI_{50} déterminées après évaluation de la prolifération des cellules après 96 h de traitement des cellules T98G en présence des différents ligands. Résultats de trois évaluations indépendantes. En gris : intervalle de confiance à 95%.

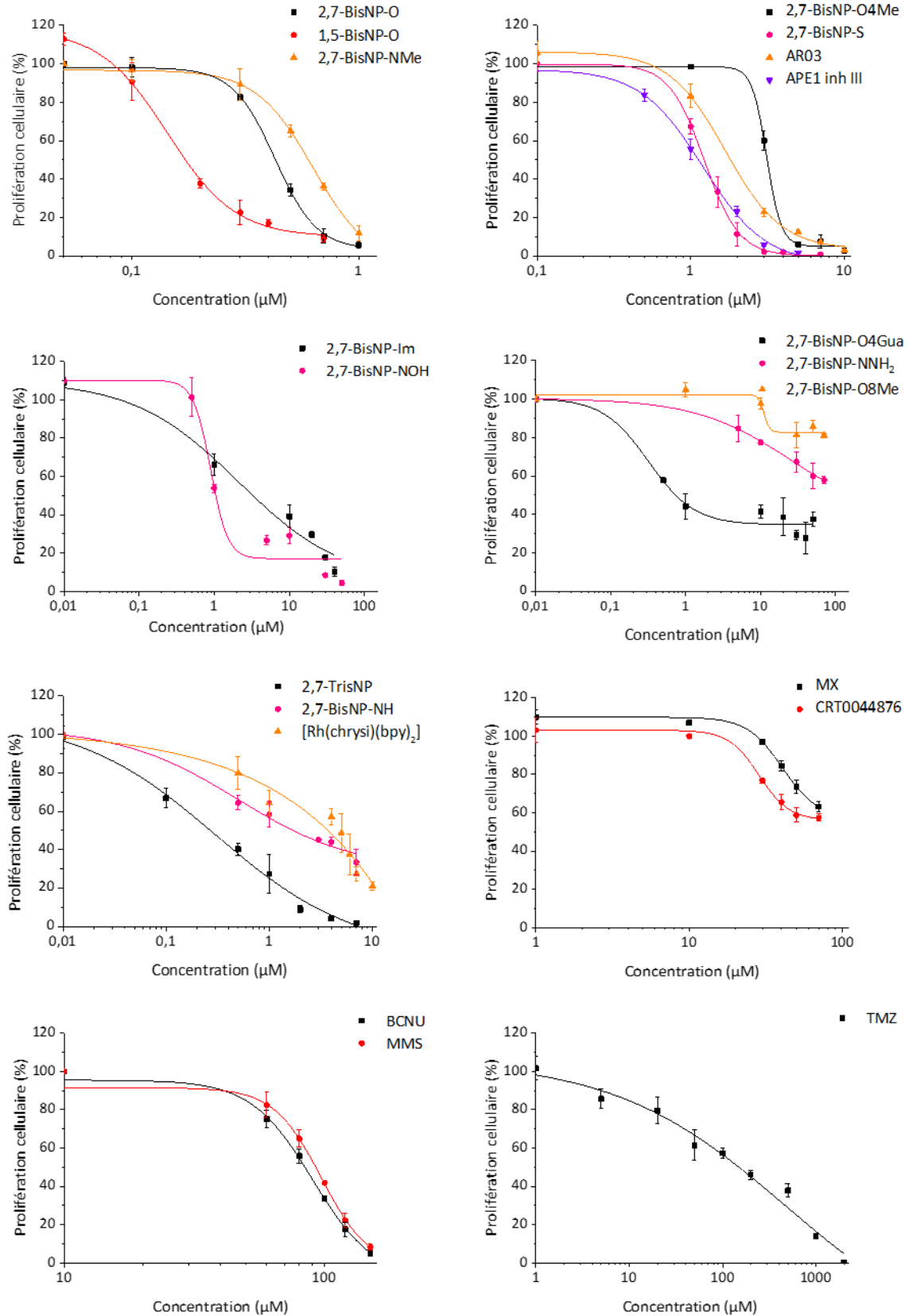


Figure 93- Prolifération des cellules T98G en présence des différents composés après 96 h de traitement. Résultats de trois expériences indépendantes évalués par comparaison avec la prolifération des cellules non traitées.

b- Etudes de la cytotoxicité des macrocycles en combinaison avec les agents alkylants

Ajout simultané des macrocycles et du témozolomide

La lignée T98G étant principalement décrite pour sa résistance au témozolomide, le potentiel des ligands macrocycliques à augmenter la cytotoxicité de cet agent alkylant a dans un premier temps été investigué. La première stratégie a été d'utiliser une concentration de témozolomide peu cytotoxique pour les cellules et de tester trois concentrations différentes de chaque ligand, en ajoutant simultanément les composés. Ainsi, six ligands ayant des GI_{50} faibles ($\leq 3,1 \mu\text{M}$) ont été évalués en combinaison avec le témozolomide à une concentration de $1 \mu\text{M}$ (GI_5). La viabilité des cellules après 96 h de traitement a ainsi été déterminée (Figure 94).

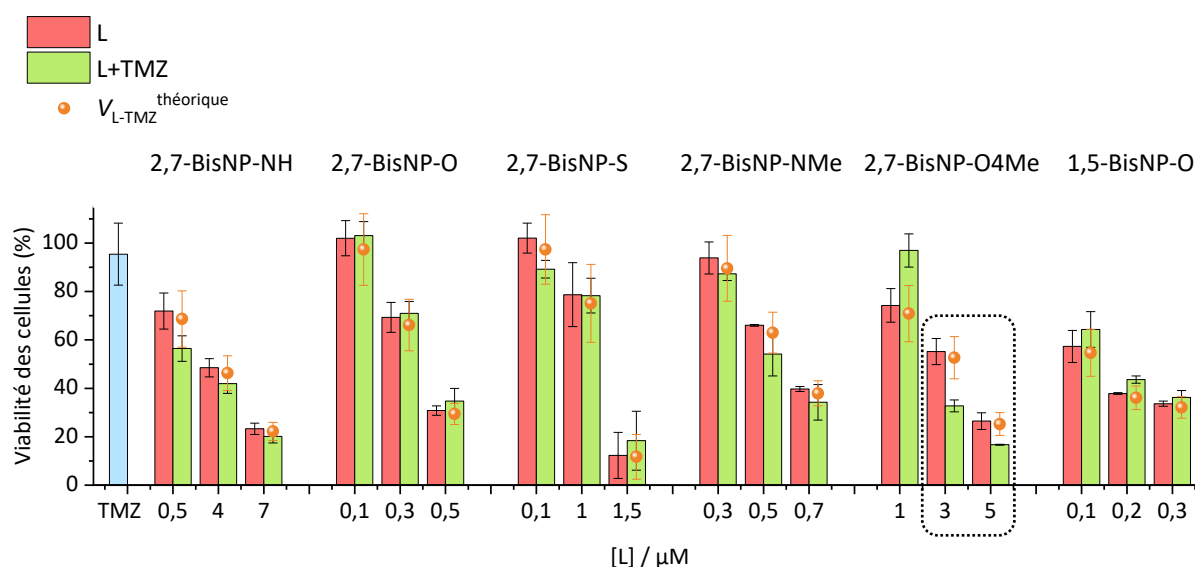


Figure 94- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec le TMZ seul ($1 \mu\text{M}$, GI_5 , barre bleue), les macrocycles seuls à différentes concentrations (barre rouge) et simultanément en combinaison avec le TMZ ($1 \mu\text{M}$, GI_5) et les macrocycles (barre verte). Le point orange représente la viabilité théorique des cellules traitées en combinaison avec le TMZ et le ligand conduisant à un effet additif. En pointillé : potentiel effet synergique entre le ligand et le TMZ. Résultats de trois mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Les résultats obtenus ont permis de constater que dans ces conditions la cytotoxicité observée lors de la combinaison avec le témozolomide (Figure 94, barre verte) est principalement liée à la cytotoxicité du ligand seul (barre rouge), excepté pour le composé 2,7-BisNP-O4Me. En effet, les cellules traitées avec ce ligand en combinaison avec le TMZ présentent une viabilité inférieure aux cellules traitées avec le TMZ seul et le macrocycle seul, cependant seulement à des concentrations en ligand de $3 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$. De façon notable, la viabilité des cellules traitées avec ces combinaisons est inférieure à l'effet additif de la combinaison ligand – TMZ théorique ($V_{L-TMZ}^{\text{théorique}}$; Figure 94, point orange), suggérant ainsi un potentiel effet synergique. Toutefois, l'effet est faible, la différence entre l'effet théorique et la viabilité des cellules traitées en combinaison obtenue expérimentalement n'étant pas importante (-20% au maximum). Il est également intéressant de relever qu'à une concentration faible en ligand 2,7-BisNP-O4Me ($1 \mu\text{M}$), ce dernier présenterait un effet non plus synergique mais antagoniste ($V_{L-TMZ}^{\text{exp}} > V_{L-TMZ}^{\text{théorique}}$).

Suite à ces constatations, une nouvelle stratégie a été envisagée. Ainsi, la concentration en ligand a été fixée, de façon à obtenir entre 50% et 90% de viabilité des cellules après 96 h de traitement et en combinaison une concentration croissante en témozolomide a été testée (Figure 95) dans le but d'évaluer la concentration en TMZ à laquelle un effet pourrait être observé. Neuf ligands ont donc été testés incluant l'inhibiteur d'APE1 le plus prometteur décrit dans la littérature, AR03 (Figure 22). En effet, ce dernier a démontré la capacité à augmenter la toxicité des agents alkylants TMZ et MMS sur la lignée de glioblastome (SF767) après un traitement de 96 h.¹³¹

Cette étude de la combinaison des ligands avec différentes concentrations de témozolomide a permis de mettre en valeur une légère augmentation de la cytotoxicité du témozolomide suite à une combinaison avec les ligands 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O4Me, 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-S, 2,7-BisNP-NNH₂ et 1,5-BisNP-O. Cependant pour cinq de ces macrocycles (2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe, 2,7-BisNP-NNH₂ et 1,5-BisNP-O), l'effet observé est principalement additif ($V_{L-TMZ}^{\text{théorique}} = V_{L-TMZ}^{\text{exp}}$; Figure 95, point orange et barre verte) et dépend de la concentration en TMZ. En effet, lorsque celle-ci devient trop importante (500 μM et 1000 μM, soit GI₆₀ et GI₉₀ respectivement), un effet antagoniste est observé. Ce phénomène pourrait ainsi être lié à une réaction chimique du témozolomide avec le ligand (méthylation) conduisant alors à l'inactivation de ce dernier. Cependant, un suivi par LC-MS a permis de mettre en évidence l'absence de dégradation des ligands 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-NH notamment, après 96 h d'incubation de ces derniers à 37 °C avec le TMZ à forte concentration (c = 1 mM).

De façon remarquable les ligands 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-S ont affiché la capacité à potentialiser la cytotoxicité du TMZ quelque soit sa concentration. De plus, pour certaines concentrations en TMZ, la viabilité des cellules traitées avec ces deux ligands en combinaison avec le TMZ est inférieure à l'effet théorique de la combinaison ($V_{L-TMZ}^{\text{théorique}}$), suggérant un effet synergique entre les macrocycles et l'agent alkylant. Enfin, il est intéressant de relever que le ligand 2,7-BisNP-O4Me, en combinaison avec le TMZ, permet une diminution plus importante de la viabilité cellulaire que le ligand 2,7-BisNP-S.

De façon notable, d'après les résultats, le macrocycle 2,7-TrisNP présente un effet antagoniste avec le témozolomide. En effet, la viabilité des cellules traitées en combinaison avec les deux composés est supérieure à l'effet théorique de la combinaison et cela quelque soit la concentration en témozolomide, pouvant suggérer une inactivation du ligand par le témozolomide (la viabilité des cellules traitées avec le 2,7-TrisNP seul étant inférieure à celle de la combinaison avec le TMZ). Enfin, bien qu'AR03 soit décrit dans la littérature pour augmenter la cytotoxicité du TMZ à une concentration subtoxique (0,75 μM) sur la lignée de glioblastome SF767 traitée 96 h,¹³¹ un effet strictement additif a été mis en évidence suite à la combinaison de ce dernier avec le TMZ dans nos conditions.

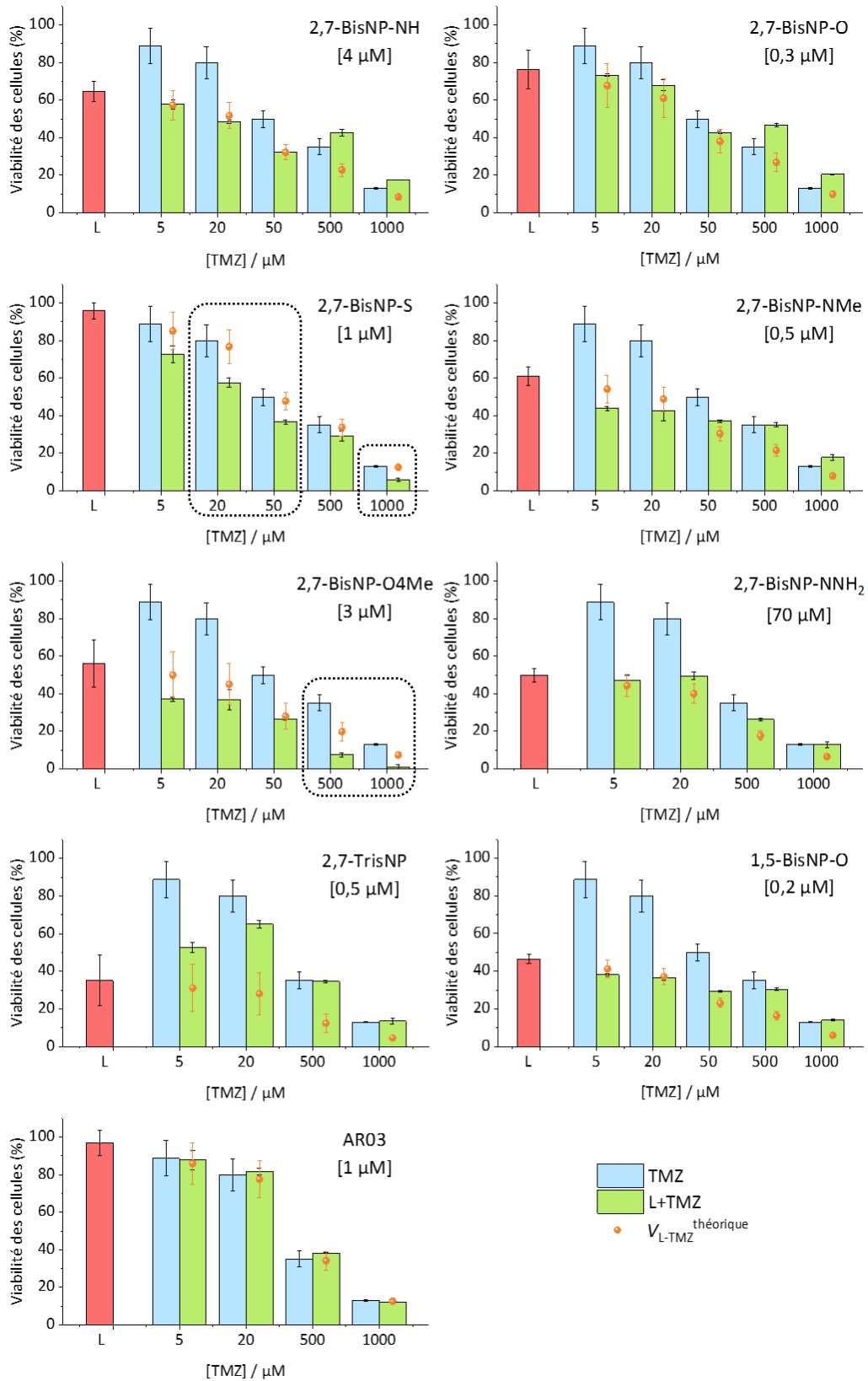


Figure 95- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec différentes concentrations en TMZ seul (barre bleue), les ligands seuls (barre rouge) et simultanément en combinaison avec le TMZ et les ligands (barre verte). Le point orange représente la viabilité théorique des cellules traitées en combinaison avec le TMZ et le ligand conduisant à un effet additif. En pointillé : potentiel effet synergique entre le ligand et le TMZ. Résultats de deux mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Suite à cette étude, l'effet cytotoxique du composé 1,5-BisNP-O, ligand de type bisnaphthalène présentant une variété structurale, et du composé 2,7-BisNP-O4Me, ligand ayant suggéré un effet synergique avec le TMZ, a été investigué plus en détail (Figure 96 et Figure 97). Chaque ligand a été testé à deux concentrations.

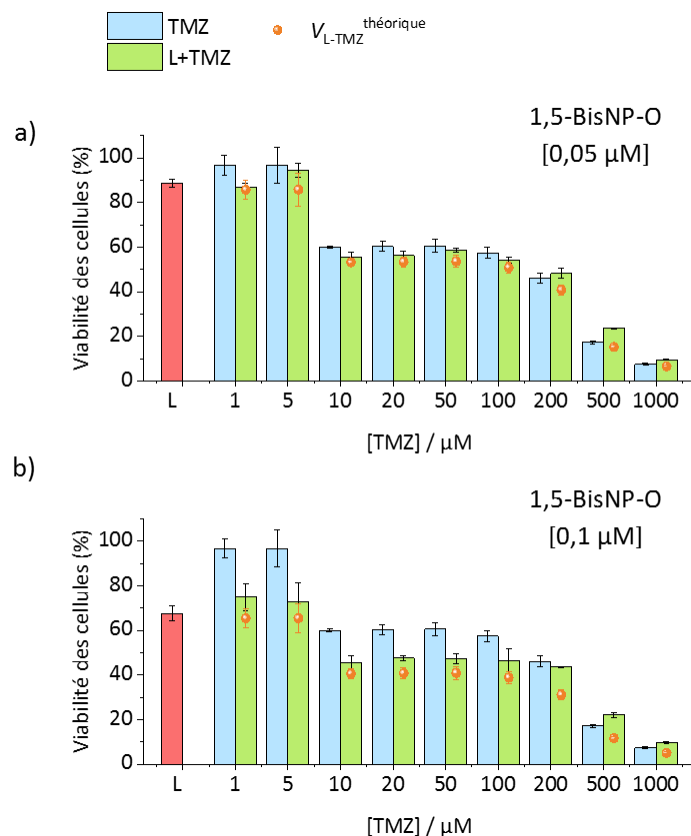


Figure 96- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec différentes concentrations en TMZ seul (barre bleue), le macrocycle 1,5-BisNP-O seul (barre rouge) et simultanément en combinaison avec le TMZ et le macrocycle 1,5-BisNP-O (barre verte) à une concentration de 0,05 µM (a) ou 0,1 µM (b). Le point orange représente la viabilité théorique des cellules traitées en combinaison avec le TMZ et le ligand conduisant à un effet additif Résultats de deux mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Comme le montrent les graphiques de la Figure 96, le ligand 1,5-BisNP-O a été évalué à 0,05 µM et 0,1 µM en combinaison avec une gamme en TMZ de 1 µM à 1000 µM. Cette étude présente une gamme de concentrations en TMZ élargie et vient ainsi compléter la première étude (Figure 95), où le ligand avait été évalué à une concentration de 0,2 µM. Les résultats affichent alors que le ligand 1,5-BisNP-O n'améliore pas la cytotoxicité du TMZ aux deux concentrations évaluées (0,05 µM et 0,1 µM). Comme précédemment avec une concentration en macrocycle de 0,2 µM, les données suggèrent un effet principalement additif ($V_{L-TMZ}^{exp} \approx V_{L-TMZ}^{théorique}$) qui, pour des concentrations supérieures à 100 µM de TMZ, devient antagoniste.

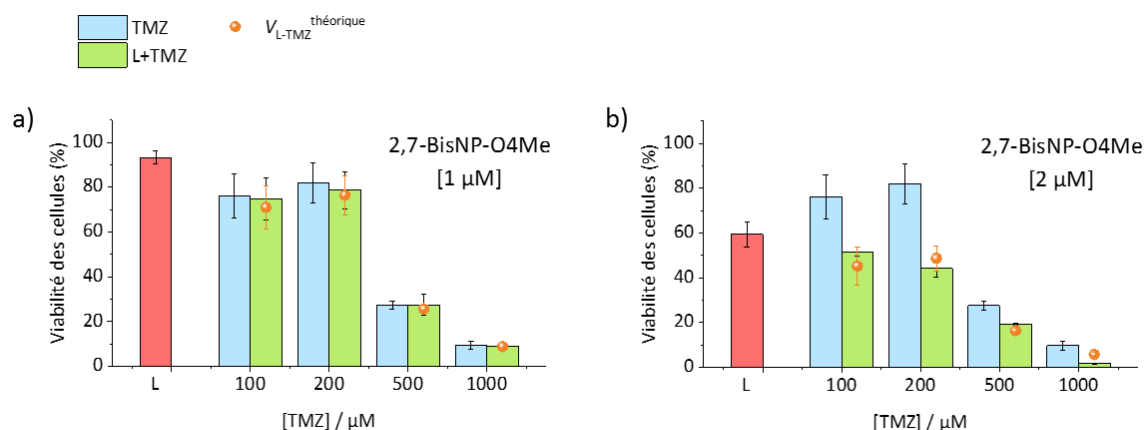


Figure 97- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec différentes concentrations en TMZ seul (barre bleue), le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me seul (barre rouge) et simultanément en combinaison avec le TMZ et le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me (barre verte) à une concentration de 1 µM (a) et 2 µM (b). Le point orange représente la viabilité théorique des cellules traitées en combinaison avec le TMZ et le ligand conduisant à un effet additif. Résultats de trois mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Le composé 2,7-BisNP-O4Me a été évalué à 1 µM et 2 µM en combinaison avec une gamme de concentrations en TMZ de 100 µM à 1000 µM (Figure 97). A une concentration peu cytotoxique en ligand (1 µM), l'effet du TMZ n'est pas amélioré. En effet, la viabilité des cellules traitées en combinaison avec le ligand et le TMZ (barre verte) est équivalente à la viabilité des cellules traitées uniquement avec le TMZ (barre bleue). Mais remarquablement, pour une concentration en ligand de 2 µM, une augmentation de la cytotoxicité du TMZ peut être observée quelque soit la concentration en TMZ, mise en évidence par la viabilité des cellules traitées en combinaison (barre verte) inférieure à la viabilité des cellules traitées uniquement avec le TMZ (barre bleue). Cependant, l'effet observé est principalement additif. Ces différents résultats, mis en parallèle avec les données obtenues lors de l'évaluation du ligand à 3 µM (Figure 95), mettent en valeur l'existence d'une dose minimale pour le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me afin de présenter un effet synergique avec le TMZ.

Ajout différé des macrocycles

Il a été mis en évidence que les dommages créés par le TMZ sont très rapidement réparés par les cellules. Ainsi, si la pénétration des ligands au sein des cellules est plus lente que celle du témozolomide, l'effet de celui-ci est déjà estompé lorsque le ligand est disponible dans le noyau de la cellule. Pour évaluer cette hypothèse, dans un second temps les cellules ont été incubées en présence des ligands une nuit avant l'ajout du témozolomide (Figure 98, condition 2).

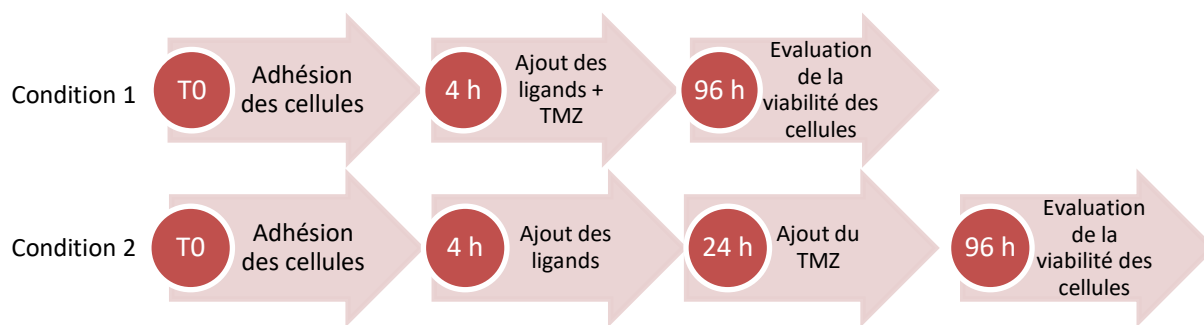


Figure 98- Schématisation des deux stratégies d'ajout des composés.

Cependant, malgré ces conditions plus favorables à la présence des ligands au sein des cellules lors de l'action du TMZ, aucun effet synergique n'a pu être mis en évidence (Figure 99). En effet, les composés, incluant AR03, présentent tous un effet additif en combinaison avec une faible concentration en TMZ (10 μM). A fortes concentrations en TMZ (100 μM et 500 μM), les données suggèrent alors un effet principalement antagoniste pour la grande majorité des composés. Seuls les ligands 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-S semblent afficher un léger effet synergique, cependant en combinaison avec une dose importante en TMZ (500 μM). Face à la faible influence de l'ordre d'ajout des différents composés, il a été choisi de garder la première stratégie d'ajout simultanée des drogues pour la suite des évaluations cytotoxiques.

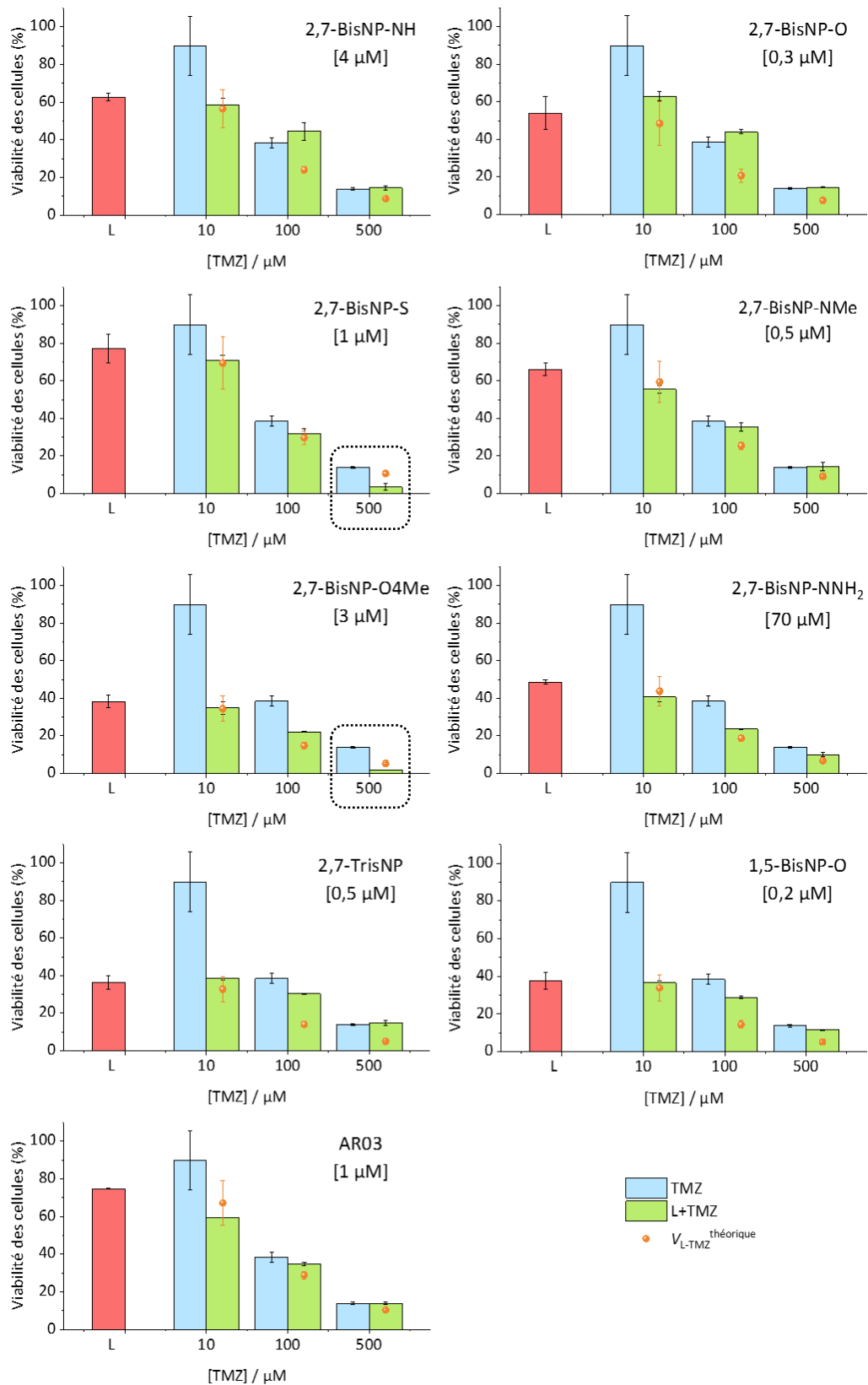


Figure 99- Viabilité des cellules T98G après un prétraitement de 24 h avec les ligands suivi de l'ajout du TMZ pendant 96 h supplémentaires. Le point orange représente la viabilité théorique des cellules traitées en combinaison avec le TMZ et le ligand conduisant à un effet additif. En pointillé : potentiel effet synergique entre le ligand et le TMZ. Résultats de deux mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Etude approfondie du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me en combinaison avec le témozolomide

A la suite des premiers résultats encourageants obtenus avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me, l'étude de ce macrocycle a été approfondie en affinant la gamme de concentrations étudiée ainsi que celle en témozolomide. Les résultats ont permis de mettre de nouveau en valeur l'amélioration de la cytotoxicité du témozolomide (Figure 100, courbe noire) par la présence du ligand et ce à différentes concentrations en ligand (Figure 100, 2,0 μM , 2,5 μM et 3,0 μM) suite au traitement combiné des cellules pendant 96 h. Les indices combinatoires, calculés avec le logiciel CompuSyn et présentés dans le Tableau 13, suggèrent alors un effet additif (C.I. = 0,99 – 1,01) voire même synergique ($0,67 \leq \text{C.I.} < 0,99$) entre les deux drogues lorsque le ligand est combiné avec de fortes concentrations en témozolomide ($\geq 400 \mu\text{M}$).

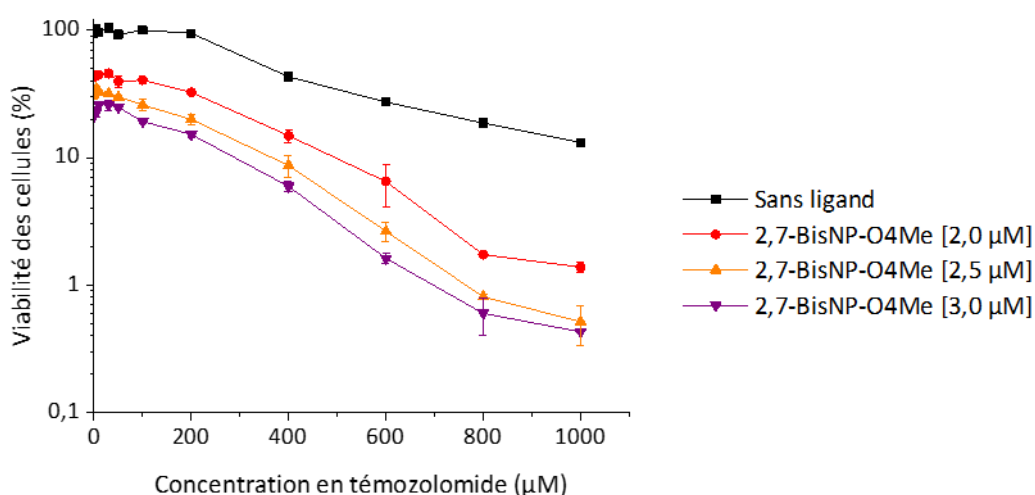


Figure 100- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec une concentration croissante en témozolomide en combinaison avec différentes concentrations en ligand 2,7-BisNP-O4Me. Résultats de trois mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Tableau 13- Indices combinatoires (C.I.) des différentes combinaisons de concentration témozolomide/ligand 2,7-BisNP-O4Me. En vert : combinaisons conduisant à un effet additif (C.I. = 0,99 – 1,01), en rouge : combinaisons conduisant à un effet synergique (C.I. < 0,99) entre les deux drogues.

Concentration en 2,7-BisNP-O4Me	Concentration en TMZ					
	100 μM	200 μM	400 μM	600 μM	800 μM	1000 μM
2,0 μM	1,13	1,16	1,07	1,00	0,81	0,90
2,5 μM	1,07	1,08	0,99	0,83	0,70	0,72
3,0 μM	1,08	1,10	0,96	0,76	0,67	0,71

Afin de comparer l'effet de notre ligand à celui d'inhibiteurs connus et décrits dans la littérature, la méthoxyamine, le composé CRT0044876 et le composé « APE1 inhibiteur III » ont également été évalués dans les mêmes conditions de combinaison que le ligand 2,7-BisNP-O4Me. Ainsi, l'effet de la combinaison de ces derniers avec une gamme en témozolomide allant jusqu'à 1000 μM a été évalué.

Dans les conditions expérimentales choisies aucune amélioration de la cytotoxicité de l'agent alkylant n'a pu être détectée (*Figure 101*), contrairement aux résultats obtenus avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me. Toutefois, il est important de relever qu'aux concentrations en composé testées, l'inhibition de la viabilité des cellules n'est que d'environ 20% suite au traitement des cellules avec les composés en absence de témozolomide tandis qu'au cours de l'évaluation avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me, celle-ci est au minimum de 50%.

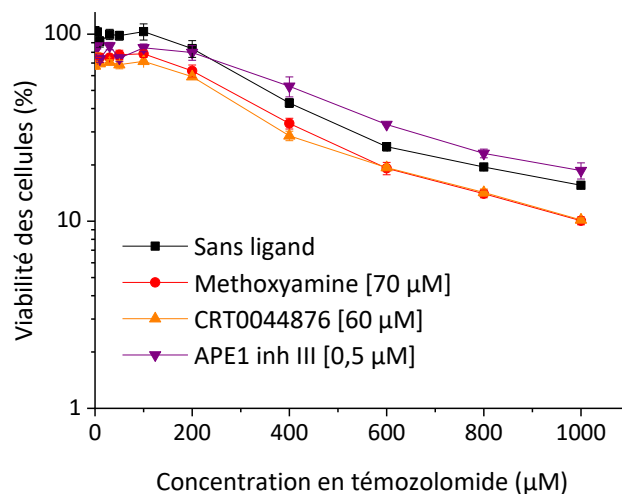


Figure 101- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec une concentration croissante en témozolomide en combinaison avec les composés méthoxyamine, CRT0044876 et APE1 inhibiteur III. Résultats de trois mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Etude du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me en combinaison avec d'autres agents alkylants

Dans le but de compléter et d'enrichir l'étude du ligand 2,7-BisNP-O4Me sur la lignée T98G, la capacité de ce dernier à augmenter la cytotoxicité de deux autres agents alkylants, le MMS et la BCNU, a été investiguée. Pour rappel, le MMS est un agent monofonctionnel méthylant de type S_N2 (contrairement au témozolomide) conduisant de ce fait très majoritairement à la formation de la base N^7 -méthylguanine. Ainsi, son effet cytotoxique est principalement dû à la formation des sites AP. La BCNU, appartenant à la famille des nitrosourées chloroéthylants, transfère un groupement chloroéthyle par l'intermédiaire d'un mécanisme de type S_N1 , aboutissant à la formation d'adduits azotés et oxygénés mais également à la formation de pontages interbrins (*Figure 10*).

Le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me a alors été incubé en présence de ces agents alkylants dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le témozolomide et le nombre de cellules viables a été évalué après 96 h de traitement. Les résultats obtenus mettent remarquablement en valeur la capacité du macrocycle à augmenter la cytotoxicité du MMS et cela à différentes concentrations en ligand (2,0 µM, 2,5 µM et 3,0 µM) et sur une gamme de concentrations en MMS allant jusqu'à 1000 µM (*Figure 102*, a). Cependant l'effet le plus intéressant est obtenu pour des concentrations en MMS inférieures à 200 µM car sur cette gamme de concentrations le MMS seul ne présente pas une très grande cytotoxicité (concentration $\leq GI_{60}$). Les indices combinatoires ont ainsi été calculés, comme dans le cas du TMZ, à l'aide du logiciel CompuSyn. Les résultats sont présentés dans le

Tableau 14. Ils montrent ainsi qu'un effet synergique ($0,34 \leq C.I. < 0,99$) serait principalement obtenu avec ces différentes combinaisons ligand/MMS.

En revanche, à la suite de la combinaison du ligand 2,7-BisNP-O4Me avec la BCNU aucun effet notable n'a été détecté (Figure 102, b). La BCNU ne conduisant pas aux mêmes lésions de l'ADN que le MMS et le TMZ (adduits chloroéthyles et pontages interbrins notamment), cette observation peut ainsi être le reflet de la spécificité du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me pour les dommages engendrés suite à l'action d'agents méthylants.

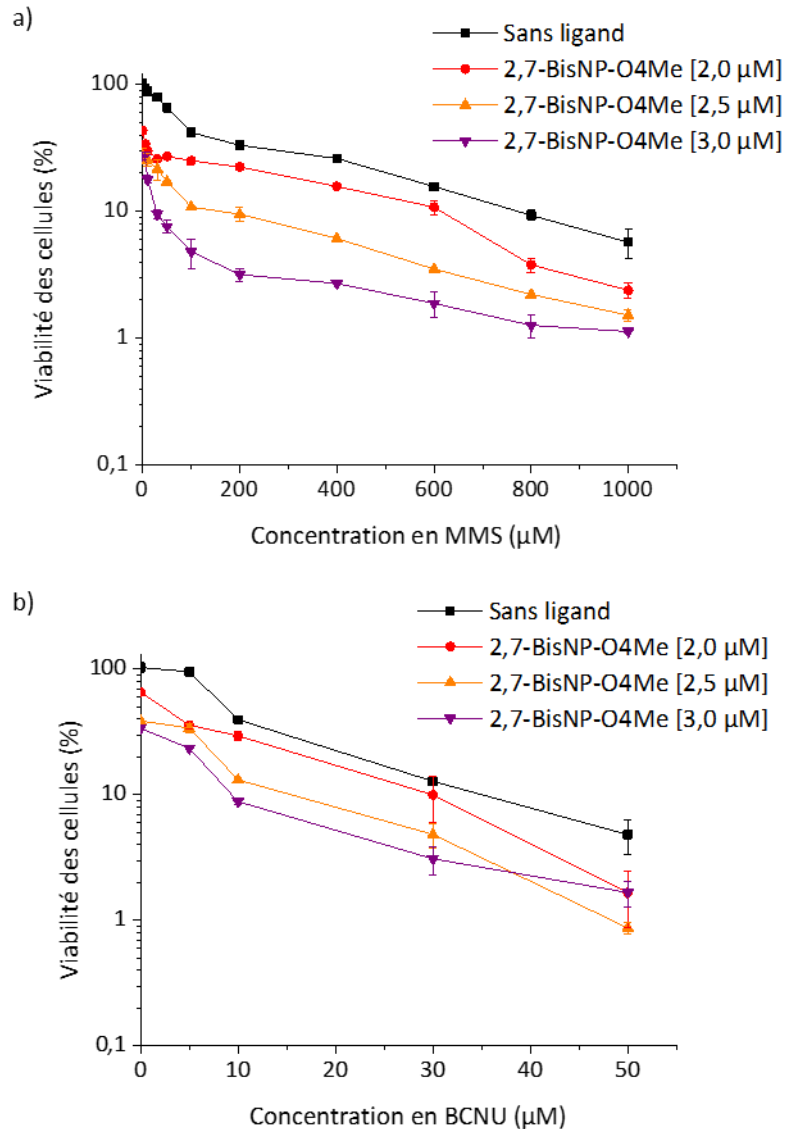


Figure 102- Viabilité des cellules T98G traitées 96 h avec différentes concentrations en macrocycle 2,7-BisNP-O4Me en combinaison avec les agents alkylants : a) MMS ; b) BCNU. Résultats de trois mesures indépendantes évalués par comparaison avec la viabilité des cellules non traitées.

Tableau 14- Indices combinatoires (C.I.) des différentes combinaisons de concentrations en MMS avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me. En rouge : combinaisons conduisant à un effet synergique (C.I. < 0,99) entre les deux drogues, en gras : combinaisons présentant l'effet synergique le plus marqué.

Concentration en 2,7-BisNP-O4Me	Concentration en MMS					
	5 µM	10 µM	30 µM	50 µM	100 µM	200 µM
2,0 µM	0,87	0,80	0,79	0,90	1,02	1,23
2,5 µM	0,85	0,87	0,83	0,74	0,60	0,65
3,0 µM	1,08	0,80	0,55	0,49	0,39	0,34

Etude de l'influence du temps de traitement cellulaire

Une étude de la combinaison du ligand 2,7-BisNP-O4Me et des agents alkylants (TMZ, MMS et BCNU) après 24 heures de traitement a ensuite été menée pour déterminer les meilleures conditions de ces effets synergiques et se placer dans des conditions déjà décrites dans la littérature.¹²¹

Dans un premier temps, le ligand a été testé aux mêmes concentrations que précédemment : 2,0 µM, 2,5 µM et 3,0 µM, en combinaison avec une gamme de concentrations en TMZ allant de 200 µM à 2500 µM ou en MMS allant de 30 à 1500 µM. Dans ces conditions, les différentes combinaisons testées n'ont révélé aucune amélioration de la cytotoxicité des agents alkylants en présence du ligand. Cependant dans ces conditions le ligand seul et le TMZ seul ne présentent aucune cytotoxicité pour les cellules aux concentrations testées, il est ainsi possible que l'absence d'effet soit liée à la faible proportion de drogues accumulées dans la cellule. En effet, lors du traitement combiné de 96 h, il a été noté qu'à des concentrations non cytotoxiques, le ligand ne présentait aucun effet synergique mettant en évidence la nécessité d'une dose minimale en ligand. L'étude de l'influence de la combinaison du ligand 2,7-BisNP-O4Me avec le MMS a donc été approfondie. Ainsi, le macrocycle a été testé tout d'abord à des concentrations de 4 à 9 µM en combinaison avec une gamme de concentrations en MMS allant de 50 à 800 µM (le MMS présentant une GI_{50} de 568 ± 46 µM après 24 heures). Cependant, aucune amélioration de la cytotoxicité de l'agent alkylant n'a alors été notée (*Figure 103, a*).

Mais le ligand ne présentant toujours pas de cytotoxicité seul à 9 µM, la stratégie suivante a ensuite été de tester une gamme plus importante de concentrations en ligand en combinaison avec deux concentrations fixes en MMS choisies autour de la GI_{50} . Le ligand a ainsi été évalué sur une gamme de concentrations allant jusqu'à 30 µM. A cette dernière concentration, il présente alors une inhibition de la viabilité des cellules d'environ 40% (GI_{50} à 24 h > 30 µM). Cependant, même dans ces conditions la cytotoxicité du MMS n'est pas améliorée par la présence du macrocycle (*Figure 103, b*).

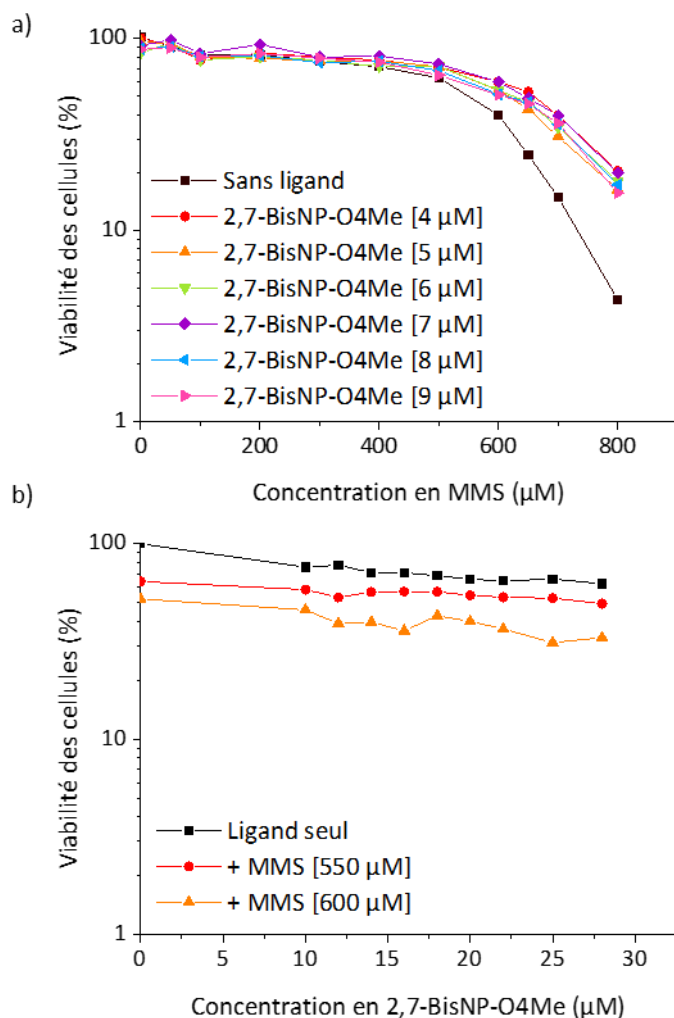


Figure 103- Viabilité des cellules T98G traitées 24 h avec différentes concentrations de MMS en combinaison avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me.

Aucun effet synergique entre les deux drogues n'a donc été obtenu même dans des conditions où le MMS seul et le ligand seul conduisent à des inhibitions de la viabilité des cellules après 24 heures de traitement. Ainsi, le temps de doublement de population des cellules T98G étant de 24 heures, ces résultats mettent en évidence le fait que plusieurs cycles de réplication des cellules traitées par les deux drogues sont nécessaires pour observer un effet synergique. Cette observation suggère que l'effet cytotoxique se traduit lors de la réplication et fait probablement intervenir les systèmes de réparation devenus alors incompetents.

c- Etudes de la cytotoxicité des ligands en combinaison avec les radiations ionisantes

Enfin pour finaliser l'étude sur la lignée T98G, le potentiel radio-sensibilisant des macrocycles a été investigué. En effet, la radiothérapie est une des méthodes majeures de traitement du glioblastome qui demeure cependant résistant à ce traitement. Toutefois, la chimiothérapie permet de favoriser le traitement de ces cancers. Dans ce contexte, il est ainsi intéressant d'évaluer la cytotoxicité des macrocycles en combinaison avec les radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes endommagent l'ADN de façon beaucoup plus aléatoire et provoquent des dommages sur l'ADN plus importants (bases endommagées, coupures simple-brins et coupures double-brins) sur un temps très court. Différentes voies de réparation sont ainsi mises en jeu pour réparer les lésions causées dont la voie BER mais aussi HR ou NHEJ.⁹ Il est donc aussi intéressant d'évaluer si les ligands macrocycliques peuvent inhiber la voie BER (ou HR ou NHEJ) lors de la réparation des différents dommages à l'ADN induits en proportion importante par les radiations.

Dans le cadre de l'étude, les cellules ont été traitées 24 heures avec les ligands avant d'être irradiées à différentes doses de rayons γ (source au ^{137}Cs). La prolifération des cellules a été ensuite évaluée 6 jours après l'irradiation, de façon à permettre au minimum 5 cycles de réplication cellulaire.

Dans ce domaine, l'efficacité des ligands est évaluée à l'aide de deux paramètres, nommés D_{10} et D_{37} . Ces paramètres représentent la dose de radiation (Gy) ne permettant la prolifération des cellules qu'à hauteur de 10% et 37% respectivement. Afin de déterminer ces paramètres, les courbes correspondant à la prolifération des cellules en fonction de la dose de radiations sont tracées en utilisant le modèle dit « linéaire-quadratique ».²⁸¹ Celui-ci traduit le fait que deux paramètres sont impliqués dans la mort cellulaire, un premier paramètre proportionnel à la dose (linéaire) ainsi qu'un deuxième proportionnel au carré de la dose (quadratique).

Sept ligands macrocycliques ont ainsi été évalués en combinaison avec différentes doses de radiations (*Figure 104*) sur la lignée T98G. La concentration de chaque ligand a été choisie de façon à ce que la prolifération des cellules ne soit pas inhibée de plus de 40% après 6 jours de traitement.

Les valeurs des D_{37} et D_{10} ainsi obtenues ne permettent pas de mettre en valeur un effet radiosensibilisant des macrocycles. En effet, aucun ligand n'affiche une diminution significative des doses D_{10} et D_{37} par comparaison aux radiations seules (*Tableau 15*). De plus, de façon intéressante le macrocycle 2,7-BisNP- NNH_2 semble afficher un effet radio-protecteur. En effet, les résultats mettent en évidence la capacité des cellules traitées avec ce ligand à résister à des doses plus importantes de radiations (Radiation seule : $D_{10} = 8,5$ Gy, $D_{37} = 4,2$ Gy ; Radiation + 2,7-BisNP- NNH_2 : $D_{10} = 11,6$ Gy, $D_{37} = 7,7$ Gy). Toutefois cette observation reste à être confirmée de nouveau.

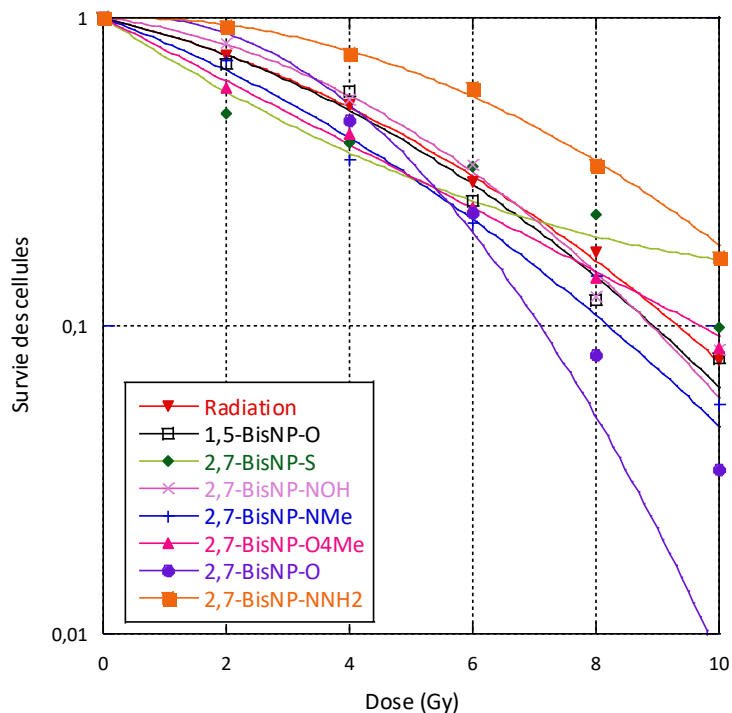


Figure 104- Survie après six jours des cellules T98G traitées 24 h avec les ligands avant irradiation à différentes doses.

Tableau 15- Valeurs des D_{10} et D_{37} affichées après combinaison des radiations avec différents macrocycles.^[a]
En rouge : effet radio-protecteur du ligand 2,7-BisNP-NNH₂.

Conditions	D_{10} (Gy)	D_{37} (Gy)
Radiation sans ligand	8,5	4,2
1,5-BisNP-O [0,1 μ M]	8,7	4,2
2,7-BisNP-S [0,5 μ M]	11,7	4,5
2,7-BisNP-NOH [0,5 μ M]	8,6	4,7
2,7-BisNP-NMe [0,3 μ M]	8,3	3,8
2,7-BisNP-O4Me [1 μ M]	9,9	5,7
2,7-BisNP-O [0,2 μ M]	7,0	3,6
2,7-BisNP-NNH ₂ [0,5 μ M]	11,6	7,7

[a] Traitement des cellules T98G avec les ligands 24 heures avant irradiation à différentes doses. Prolifération des cellules évaluée six jours post-irradiation.

3- Evaluation de la cytotoxicité des ligands sur les lignées cellulaires U87MG et HCT116

a- Etudes cellulaires sur la lignée U87MG

Dans le but d'estimer les concentrations pour étudier l'effet de la combinaison des composés sur la lignée U87MG, la viabilité des cellules en présence des différents ligands mais également des agents alkylants (*Tableau 16* ; *Figure 105*) pris séparément a été évaluée dans les mêmes conditions que lors de l'étude de la lignée T98G, c'est-à-dire après 96 h de traitement des cellules.

Tableau 16- Cytotoxicité des agents alkylants sur la lignée U87MG et T98G après 96 h de traitement.

Agent alkylant	GI ₅₀ ^{U87MG} (μM)	GI ₅₀ ^{T98G} (μM)
TMZ	298	345
MMS	75,5	92,5
BCNU	47,3	84,1

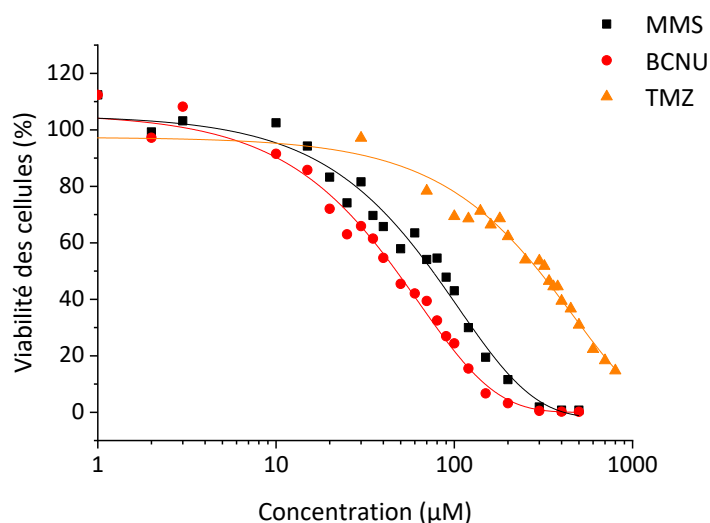


Figure 105- Viabilité des cellules U87MG traitées 96 h avec les différents agents alkylants.

De façon notable le témozolomide a présenté sur cette lignée et dans nos conditions d'étude, une GI₅₀ que légèrement inférieure à celle obtenue sur la lignée T98G (GI₅₀^{U87MG} = 298 μM, GI₅₀^{T98G} = 345 μM). Or la lignée U87MG aurait dû présenter une sensibilité plus importante au TMZ (GI₅₀ = 100 μM et > 500 μM sur les lignées U87MG et T98G respectivement après 48 h d'incubation selon les données de la littérature).²⁸² Toutefois, ces constatations ne sont que peu étonnantes car plusieurs publications de la littérature font état d'observations similaires en décrivant des variations de la cytotoxicité du TMZ suite aux passages en série des mêmes cellules de cette lignée ainsi qu'en fonction de la provenance des cellules.^{283,284} De plus, des fluctuations importantes de la cytotoxicité entre les duplicatas au sein d'une même expérience ont été observées lors du traitement des cellules avec les ligands seuls mais également lors de la combinaison avec les agents alkylants. Pour ces différentes raisons, l'étude sur cette lignée a été stoppée.

b- Etudes cellulaires sur la lignée HCT116

Afin de compléter les études cellulaires, les macrocycles ont également été évalués sur la lignée de colon HCT116. Après une estimation de la cytotoxicité des composés seuls sur cette nouvelle lignée après 96 h de traitement, l'effet de leur combinaison avec le témozolomide, affichant alors une GI_{50} de 300 μM sur cette lignée, a été testé. Le ligand 2,7-BisNP-O4Me, présentant un effet positif sur la lignée T98G, a été testé à différentes concentrations allant jusqu'à sa GI_{50} (GI_{50} [2,7-BisNP-O4Me] = 1,7 μM) en combinaison avec une gamme de concentrations en TMZ. Six autres macrocycles ont également été combinés avec cet agent alkylant. Aux concentrations testées, ces derniers inhibent la viabilité des cellules entre 10% et 40% en absence de témozolomide. Cependant, suite à ces différentes combinaisons, aucune sensibilisation des cellules au TMZ due à la présence des macrocycles n'a été observée (Figure 106). De plus, il est intéressant de relever que sur cette lignée cellulaire, le ligand 2,7-BisNP-O4Me présente un effet antagoniste (C.I. > 1,01) avec le témozolomide dans tous les cas de combinaisons évaluées (Tableau 17).

A titre de comparaison, la viabilité des cellules après une incubation combinée de la méthoxyamine et du témozolomide a été déterminée. Les résultats (Tableau 17 ; Figure 107) mettent en évidence une augmentation de la sensibilité du témozolomide due à la présence de la méthoxyamine. De plus, les indices combinatoires reflètent un effet synergique entre les composés (C.I. jusqu'à 0,34). Ces résultats sont ainsi en accord avec ceux décrits dans la littérature^{279,280} et permettent de valider nos conditions expérimentales.

Tableau 17- Indices combinatoires (C.I.) déterminés suite à la combinaison de la méthoxyamine ou du ligand 2,7-BisNP-O4Me avec le témozolomide sur la lignée HCT116.^[a] En rouge : combinaisons conduisant à un effet synergique (C.I. < 0,99) entre les deux drogues.

Concentration en TMZ (μM)	Méthoxyamine [5 mM]	2,7-BisNP-O4Me [0,5 μM]	2,7-BisNP-O4Me [1 μM]	2,7-BisNP-O4Me [1,7 μM]
200	0,87	1,43	1,30	1,26
250	0,69	1,27	1,39	1,26
300	0,82	1,24	1,33	1,18
400	0,54	1,30	1,37	1,31
500	0,43	1,26	1,36	1,21
600	0,34	1,42	1,62	1,14

[a] Viabilités des cellules HCT116 traitées 96 h avec la méthoxyamine (5 mM) ou le ligand 2,7-BisNP-O4Me (0,5 μM , 1 μM ou 1,7 μM) en combinaison avec différentes concentrations en TMZ.

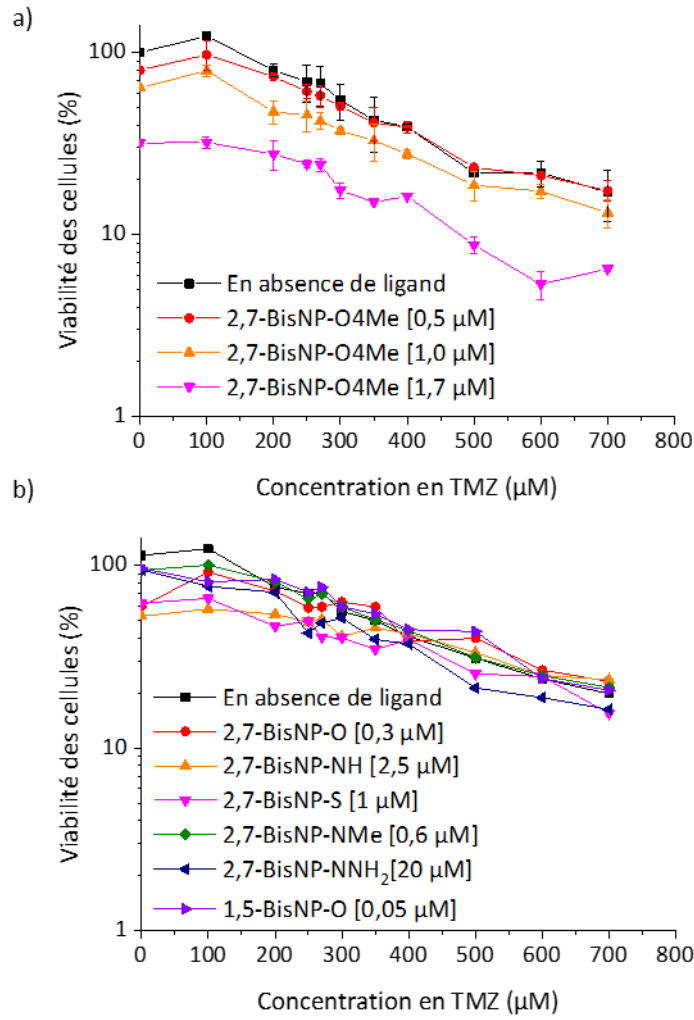


Figure 106- Viabilité des cellules HCT116 traitées 96 h avec différentes concentrations en TMZ en présence : a) de différentes concentrations en macrocycles 2,7-BisNP-O4Me ; b) de différents macrocycles.

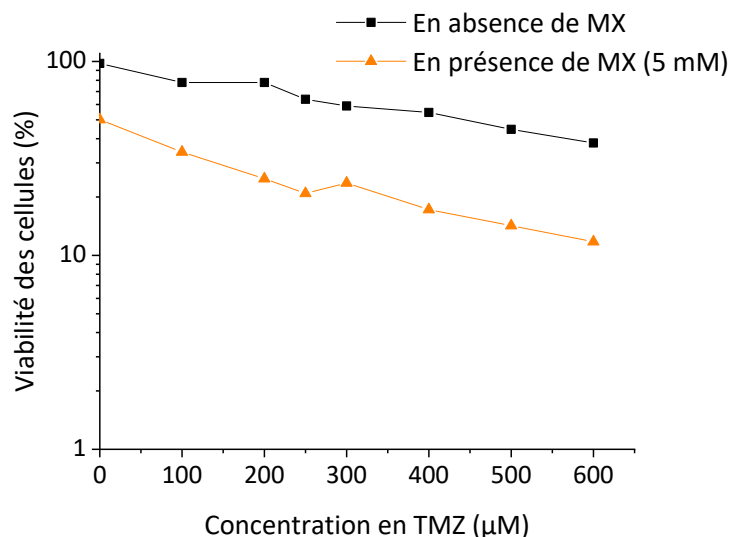


Figure 107- Viabilité des cellules HCT116 traitées 96 h avec différentes concentrations en TMZ en absence (courbe noire) ou en présence de méthoxyamine (courbe orange).

Ainsi, de façon intéressante, l'étude de la toxicité sur la lignée HCT116, mise en parallèle avec les conclusions établies sur la lignée T98G, suggère que le ligand 2,7-BisNP-O4Me semble avoir un mécanisme d'action différent de la méthoxyamine. En effet, ce macrocycle augmente la toxicité du TMZ et du MMS sur les cellules T98G alors que la méthoxyamine n'a affiché aucun effet lié à la combinaison avec ces agents alkylants sur cette lignée (*Figure 101*). A l'inverse le ligand 2,7-BisNP-O4Me ne potentialise pas la toxicité du TMZ sur la lignée HCT116 en affichant un effet antagoniste avec cet agent alkylant contrairement à la méthoxyamine qui présente un effet principalement synergique.

II- Visualisation de la pénétration des ligands au sein des cellules à l'aide de la technique de la nanoSIMS

La nanoSIMS, *nano-scale secondary ion mass spectrometry*, est une technique d'analyse développée dans les années 90. Initialement utilisée dans le domaine de la biologie, l'utilisation de cette technique s'est élargie à d'autres champs et des applications en biochimie, géochimie ou encore biominéralisation ont été décrites.²⁸⁵ Cette technique consiste au bombardement d'ions dits « primaires » de haute énergie (plusieurs keV) sur l'échantillon à analyser (Figure 108). Ce faisceau d'ions, notamment de type Cs^+ dans le cadre de cette étude, entre alors en collision avec les atomes et les petites molécules constituant la surface de l'échantillon, d'une profondeur de 5 à 20 nm. Ces particules pour la plupart neutres sont alors éjectées. Une partie est toutefois ionisée et ces ions dits « secondaires » sont alors transférés vers un spectromètre de masse qui va permettre leur séparation en fonction du rapport masse sur charge. Ces derniers sont ensuite comptés, ce qui permet alors d'obtenir une cartographie de la répartition des ions à la surface de l'échantillon.

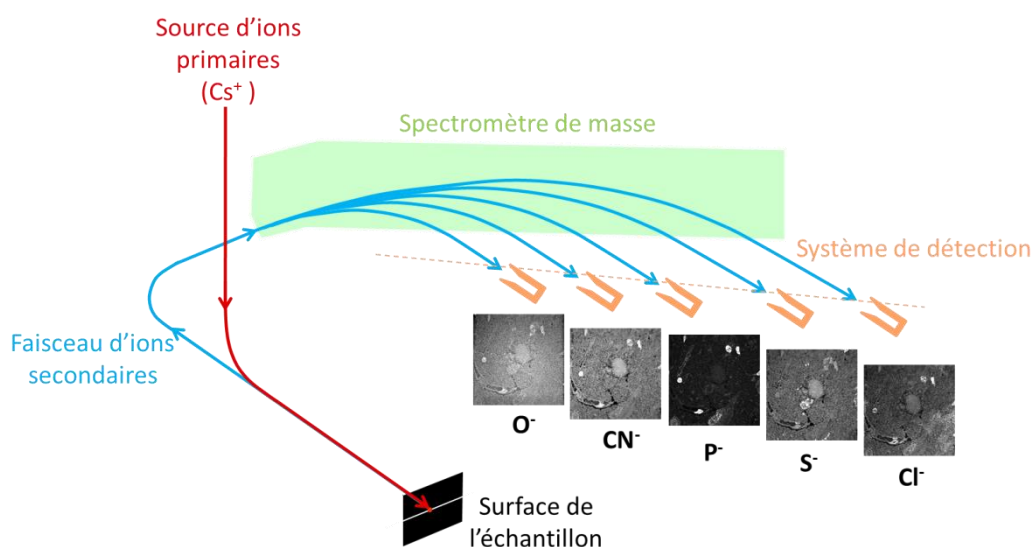


Figure 108- Schématisation du principe de la nanoSIMS.

La nanoSIMS permet la détection de plusieurs isotopes du même élément. Ainsi le rapport entre la présence de ces isotopes, comptés dans la même zone de l'échantillon, peut être effectué et comparé à l'abondance naturelle de l'élément afin de déterminer la présence d'un excès d'un des isotopes. Dans le cadre de l'étude, la localisation du macrocycle marqué ($^{15}\text{N}_4$)-2,7-BisNP-NH (Figure 109) est rendue possible suite à l'analyse de la présence en excès de l'isotope ^{15}N . Cependant les ions N^- ne se forment pas et sont donc détectés sous la forme d'ion cyanure CN^- . Ainsi, pour étudier sa localisation au sein des cellules, le ligand ($^{15}\text{N}_4$)-2,7-BisNP-NH a donc été incubé 24 heures avec les cellules de glioblastome T98G à une concentration de $50 \mu\text{M}$ (GI_{40}).

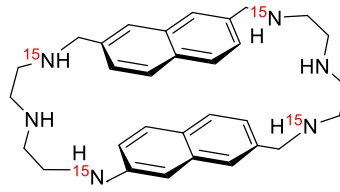


Figure 109- Structure du macrocycle ($^{15}\text{N}_4$)-2,7-BisNP-NH.

L'étude de la répartition des ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ et $^{31}\text{P}^-$ a permis en premier lieu de déterminer la localisation du noyau et des nucléoles au sein des cellules (Figure 110, a et c). Puis dans un second temps, la localisation de l'excès en ^{15}N , par comparaison du ratio $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^- / ^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ trouvé au sein de l'échantillon à celui de l'abondance naturelle (0,365%), a permis de révéler une accumulation du ligand majoritairement dans les vésicules présentes dans le cytoplasme de la cellule (Figure 110, b, zones lumineuses blanches et d, zones rouges).

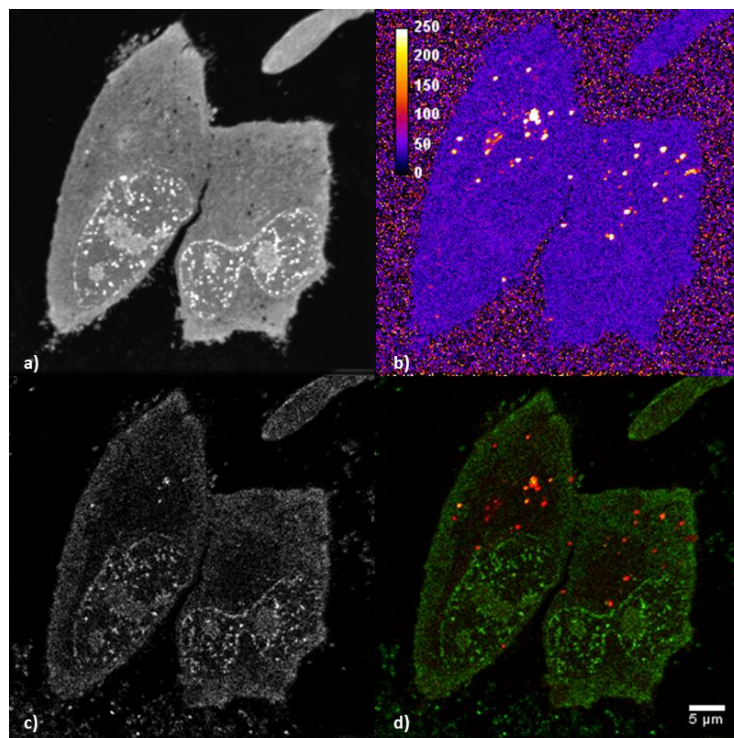


Figure 110- a) Répartition des ions $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ permettant la localisation du noyau et des nucléoles au sein de cellules T98G ; b) Localisation d'excès d'azote ^{15}N au sein des mêmes cellules (zones lumineuses) ; c) Répartition des ions $^{31}\text{P}^-$ au sein des mêmes cellules ; d) Co-localisation de la répartition des ions $^{31}\text{P}^-$ en vert et des ions $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$ en rouge.

De plus et de façon intéressante, alors qu'il n'est pas visible à l'œil nu, un excès de ^{15}N de 17% par rapport à l'abondance naturelle a pu être quantifié au sein des nucléoles, révélant la présence du ligand marqué (Figure 111).

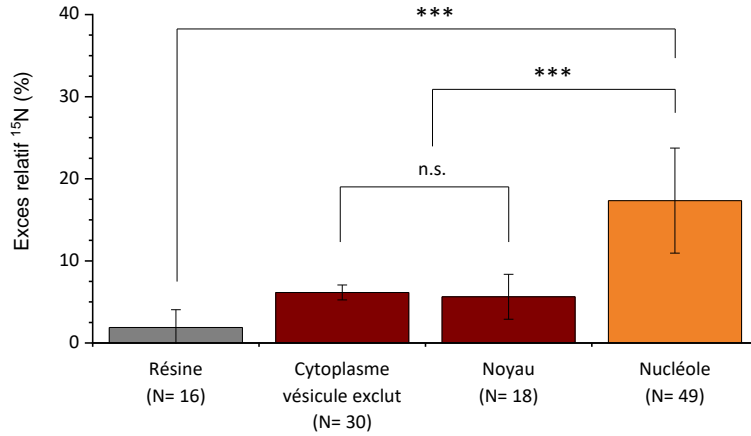


Figure 111- Quantification de l'excès d'azote ¹⁵N par rapport à l'abondance naturelle dans les différents compartiments cellulaires avec N le nombre de cellules étudiées. Les valeurs *p* ont été calculées en utilisant le test de Student (n.s., *p* > 0,05 ; *, *p* ≤ 0,0001).**

Ainsi les résultats de l'étude révèlent qu'après 24 heures le ligand a pénétré dans les cellules et se retrouve confiné dans les vésicules de transport. Mais de façon remarquable, la concentration élevée en ligand observée dans le noyau, notamment au sein des nucléoles, permet également d'appuyer l'hypothèse qu'une des cibles biologiques des macrocycles pourrait être l'ADN.

III- Evaluation de la stabilité de complexes ligand - site AP par RMN *in cellulo*

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr. Lukas Trantirek au *Central European Institute of Technology* (CEITEC, Brno, République Tchèque), la stabilité des complexes formés entre les sites abasiques et les ligands macrocycliques dans le milieu intracellulaire a été évaluée par une méthode développée récemment par le laboratoire.²⁸⁶ Cette méthodologie permet l'acquisition de spectres ^1H RMN *in-cell* de fragments d'ADN exogènes introduits dans les cellules. La présence de ces derniers peut être détectée grâce aux signaux caractéristiques dans la région imino du spectre ^1H RMN *in-cell*, servant de signatures spectrales au fragment d'ADN introduit (Figure 112). La fixation d'un ligand sur l'oligonucléotide conduit alors à la modification de ces signaux caractéristiques, ainsi l'étude de ces derniers permet d'évaluer la formation des complexes ligand-ADN directement dans l'environnement intracellulaire.

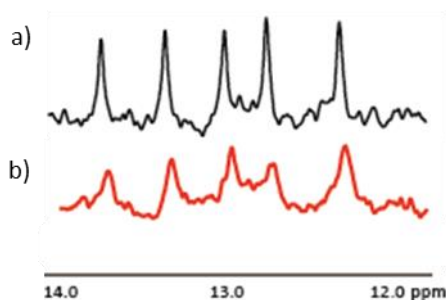


Figure 112- Exemple de signaux caractéristiques d'un fragment d'ADN de 12 paires de bases d(GCTGATATCAGC)₂ dans la région imino du spectre ^1H RMN : a) acquisition *in vitro* ; b) acquisition *in-cell*.

Basée sur une technique d'électroporation, le laboratoire a développé une procédure permettant d'introduire au sein des noyaux des cellules l'ADN exogène en quantité suffisante, environ 10-15 μM , pour permettre l'analyse par RMN. La transfection des cellules est ainsi permise en imposant des pulses de forts et de faibles puissances (1000 V, 100 μs et 350 V, 30 ms).

Dans le cadre de l'étude l'oligonucléotide 17-T Φ (Tableau 1), porteur d'un site abasique de type THF afin d'éviter le clivage de celui-ci par les ligands, a été utilisé dans le but d'étudier la stabilité des complexes formés avec les macrocycles 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-Im.

Cependant au cours des études ^1H RMN préliminaires de la stabilité des différents complexes *in vitro* dans des tampons mimant la composition du cytoplasme ou du noyau, il a été constaté que la complexation des ligands 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-O4Me avec l'ADN 17-T Φ n'induit pas de modifications assez prononcées des signaux caractéristiques de ce dernier pour permettre de déterminer avec certitude la présence du complexe dans l'environnement cellulaire (Figure 113). En effet, la présence du complexe est mise en évidence suite à la comparaison de son spectre ^1H RMN *in-cell* obtenu à celui de l'ADN seul *in-cell*. Ainsi pour palier à la perte de résolution induite par une acquisition dans l'environnement cellulaire, les signaux présentés par l'ADN seul et l'ADN complexé doivent être suffisamment différents. Suite à ces constatations, seule la stabilité du complexe formé entre le ligand 2,7-BisNP-Im et l'oligonucléotide a été investiguée plus en détail, la signature spectrale de ce complexe présentant un pic caractéristique à environ 12,3 ppm (Figure 113, e).

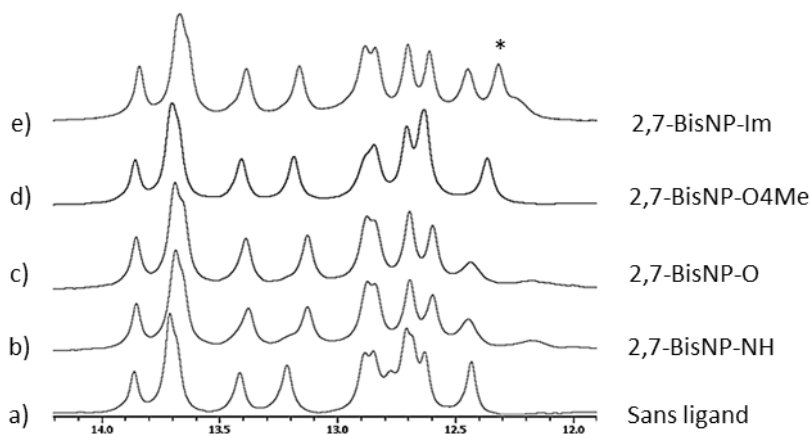


Figure 113- Spectres ^1H RMN *in vitro* de l'ADN 17-T Φ (a) et des complexes formés entre l'ADN 17-T Φ et les macrocycles : b) 2,7-BisNP-NH ; c) 2,7-BisNP-O ; d) 2,7-BisNP-O4Me et e) 2,7-BisNP-Im dans le tampon mimant la composition du noyau cellulaire (phosphate de sodium 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, chlorure de potassium 10 mM, pH = 7,9). Le pic caractéristique du complexe ADN 17-T Φ – 2,7-BisNP-Im est marqué avec un astérisque (*).

Dans un premier temps la formation du complexe ligand-ADN, vérifiée par analyse ^1H RMN, a été effectuée pré-transfection dans le tampon d'électroporation (phosphate de sodium 140 mM, MgCl_2 10 mM, chlorure de potassium 5 mM, pH 7,2). En effet, la formation du complexe directement au sein des cellules, nécessitant deux étapes d'électroporation (ADN en premier puis ligand ou ligand puis ADN) conduit à une diminution d'environ 25% de la viabilité des cellules, ainsi il est préférable de transfecter les cellules directement avec le complexe préformé. Afin d'évaluer l'efficacité de l'électroporation ainsi que de déterminer la localisation de l'ADN transfecté au sein des cellules, environ 3% de l'ADN utilisé est marqué avec le fluorophore FAM en 5' servant ainsi de marqueur fluorescent pour tracer l'ADN introduit.

L'analyse par cytométrie de flux (FCM) des cellules HeLa transfectées a permis de mettre en évidence l'efficacité de la procédure d'électroporation. En effet environ 85% des cellules ont intégré le complexe ADN 17-T Φ – ligand 2,7-BisNP-Im (Figure 114, b-2). De plus, l'ajout post-transfection de iodure de propidium (PI), se localisant spécifiquement dans les cellules mortes ou celles dont l'intégrité de la membrane est compromise, a permis de mettre en avant que la présence du complexe ainsi que son électroporation n'affectent pas la viabilité des cellules. Enfin, la localisation du complexe transfecté au sein des noyaux des cellules a pu être validée par microscopie confocale (Figure 115). Pour déterminer la stabilité du complexe *in-cell* par comparaison avec les signaux de l'ADN 17-T Φ seul, la transfection de ce dernier, conduisant alors aux mêmes étapes de vérification, a également été opérée.

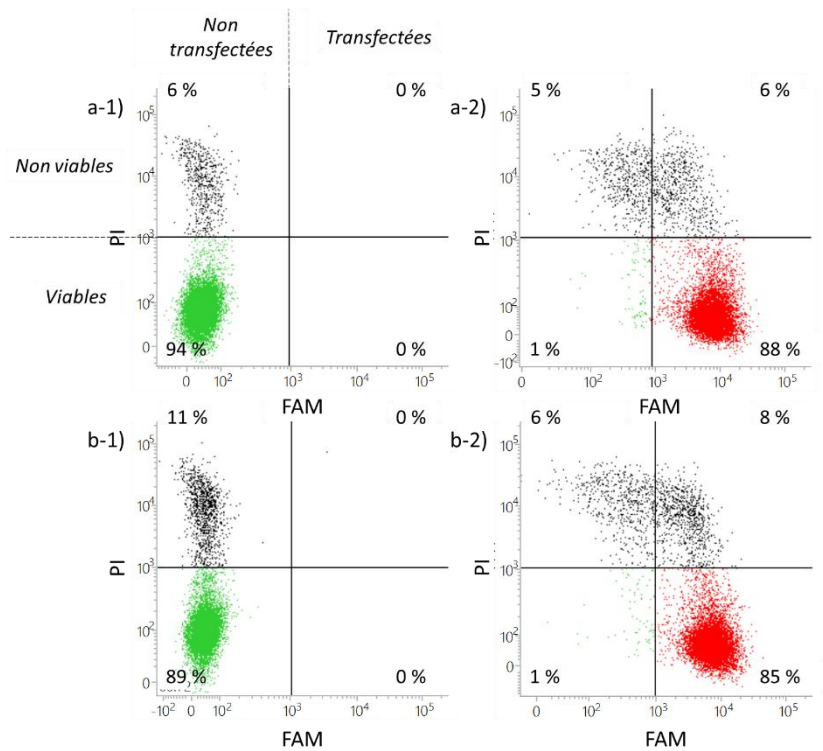


Figure 114- Doubles analyses FCM (PI/FAM) des cellules HeLa transfectées par : a) l'ADN 17-TΦ ; b) le complexe préformé ADN 17-TΦ-ligand 2,7-BisNP-Im. 1) transfection témoin en absence d'ADN ; 2) transfection en présence d'ADN. Pourcentage de cellules viables et non viables, en bas et en haut respectivement, non transfectées à gauche et transfectées avec l'ADN à droite.

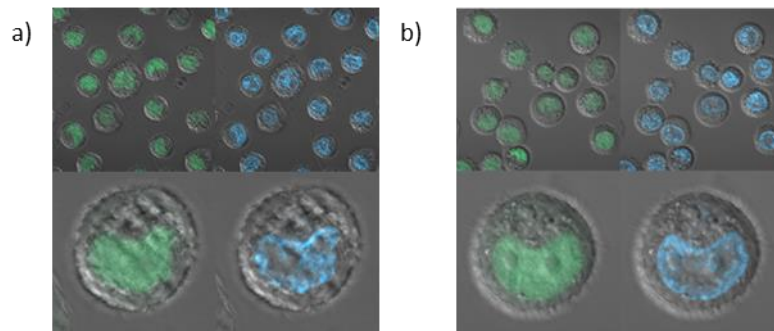


Figure 115- Images de microscopie confocale de la localisation : a) de l'ADN 17-TΦ ; b) du complexe ADN 17-TΦ-ligand 2,7-BisNP-Im. En vert, localisation du fluorophore FAM utilisé pour marquer l'ADN. En bleu, marquage des noyaux des cellules avec Hoechst 33342.

L'acquisition des spectres ^1H RMN a ensuite été effectuée à 20 °C (Figure 116).

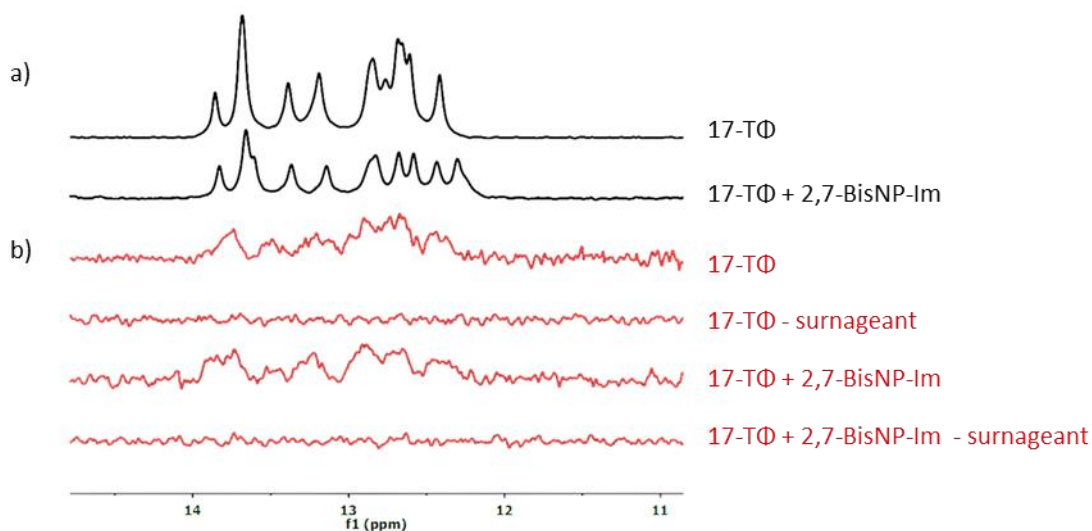


Figure 116- Spectres ^1H RMN (600 MHz) de l'ADN 17-T Φ et du complexe formé entre l'ADN 17-T Φ et le ligand 2,7-BisNP-Im a) *in vitro* ; b) *in-cell*. Les spectres ^1H RMN du surnageant cellulaire permettent de confirmer l'acquisition de signaux caractérisant l'ADN au sein des cellules.

Les spectres alors obtenus ne permettent pas de conclure sur la stabilité du complexe formé entre le ligand 2,7-BisNP-Im et le site abasique dans le contexte cellulaire. En effet, la très faible résolution présentée par les spectres RMN *in-cell* ne permet pas d'établir de réelles différences entre les déplacements chimiques affichés par les signaux des spectres de l'ADN complexé (Figure 116, b) 17-T Φ + 2,7-BisNP-Im) ou non (Figure 116, b) 17-T Φ). Cette très faible résolution soulève alors des questionnements quant à la possible dégradation de l'oligonucléotide par l'enzyme APE1 sur le temps de l'acquisition du spectre RMN (40 minutes), diminuant ainsi la quantité d'ADN disponible pour l'acquisition des signaux.

Cependant, il est intéressant de noter que l'étude similaire ^1H RMN des complexes formés entre un oligonucléotide présentant un mésappariement de type T-T (ADN-TT, Figure 117, a) et les ligands macrocycliques 1,5-BisNP-O, 2,7-BisNP-NH et 2,7-BisNP-O a permis de mettre en évidence la stabilité du complexe formé entre le ligand 2,7-BisNP-NH et l'ADN localisé au sein des noyaux des cellules HeLa. Facilitant l'étude, l'ADN complexé présente des signaux caractéristiques dans la région imino du spectre ^1H RMN (Figure 117, signaux marqués par un astérisque) très différents de l'ADN non complexé permettant de mettre en évidence la formation du complexe. Tandis que la disparition ou l'atténuation des signaux caractérisant les complexes 1,5-BisNP-O – ADN-TT et 2,7-BisNP-O – ADN-TT respectivement sur les spectres *in-cell* met en évidence la déstabilisation de ces complexes dans l'environnement cellulaire. Ces résultats ont mené à une publication.²⁸⁷

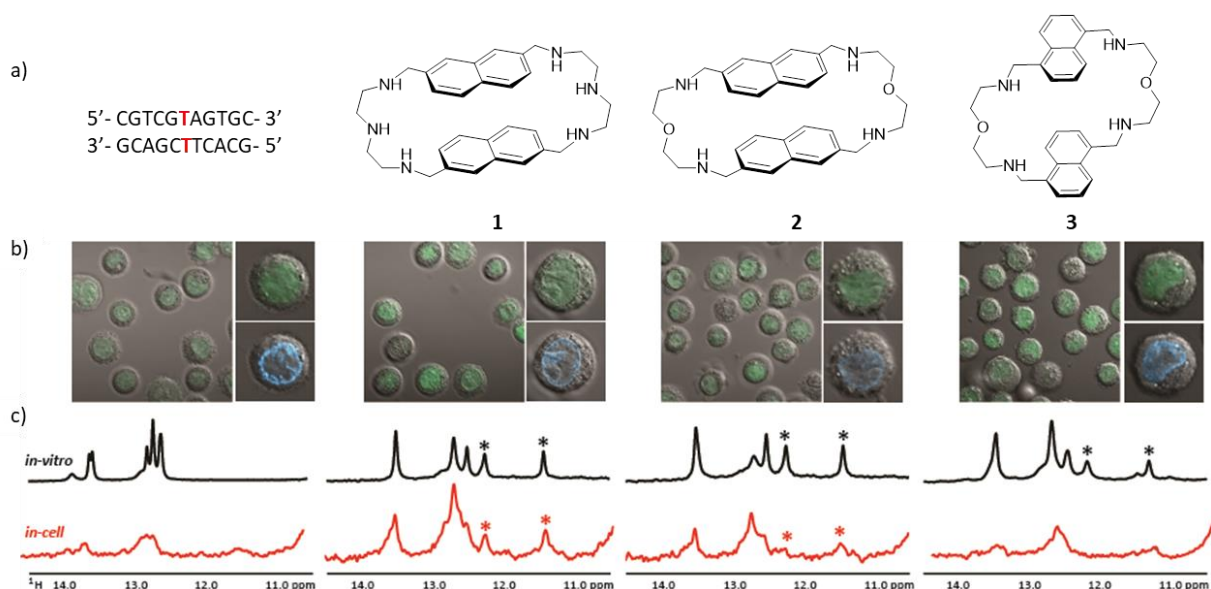


Figure 117- a) Séquence de l'ADN présentant un mésappariement TT (ADN-TT) utilisé pour l'étude. Structure des macrocycles 1, 2 et 3. b) Images acquises par microscopie confocale des cellules HeLa transfectées avec (de gauche à droite) l'ADN-TT ou les complexes formés entre l'ADN-TT et les ligands 1, 2 et 3. En vert, localisation du fluorophore FAM utilisé pour marquer l'ADN-TT. En bleu, marquage des noyaux des cellules avec Hoechst 33342. c) Spectres ¹H RMN *in vitro* et *in-cell* de l'ADN-TT ou des complexes formés entre l'ADN-TT et les ligands 1, 2 et 3 (de gauche à droite). Les signaux caractérisant la formation des complexes sont marqués avec un astérisque (*).

De façon remarquable, ces résultats obtenus *in-cell* sont en accord avec les données acquises *in vitro*. En effet, la constante de dissociation de ces complexes a pu être déterminée à l'aide de la technique *MicroScale Thermophoresis* (MST). Cette méthode est basée sur l'étude de la réponse de biomolécules à l'application d'un gradient de température observée par fluorescence. La fixation d'un ligand sur une biomolécule induit notamment une réorientation des molécules d'eau formant la couche d'hydratation de cette dernière, ce qui conduit alors à une modification de la mobilité de la molécule. La réponse au champ de température visible par fluorescence est alors différente. Pour une concentration fixe en ADN, l'étude d'une gamme de concentrations en ligand permet ainsi de déterminer la constante de dissociation des différents complexes.

Les résultats mettent alors en avant la plus forte affinité du ligand 2,7-BisNP-NH avec l'ADN-TT, le complexe présentant une constante de dissociation $K_d = 0,15 \mu\text{M}$ (Figure 118). De plus, alors que le complexe ADN-TT – ligand 1,5-BisNP-O présente une constante de dissociation élevée ($K_d = 5,3 \mu\text{M}$), expliquant la disparition *in-cell* des signaux ¹H RMN propres à la formation du complexe, le complexe formé entre l'ADN et le ligand 2,7-BisNP-O présente lui une situation intermédiaire avec une constante de dissociation $K_d = 0,99 \mu\text{M}$, en accord avec une atténuation et non pas une disparition des signaux observés sur le spectre ¹H RMN.

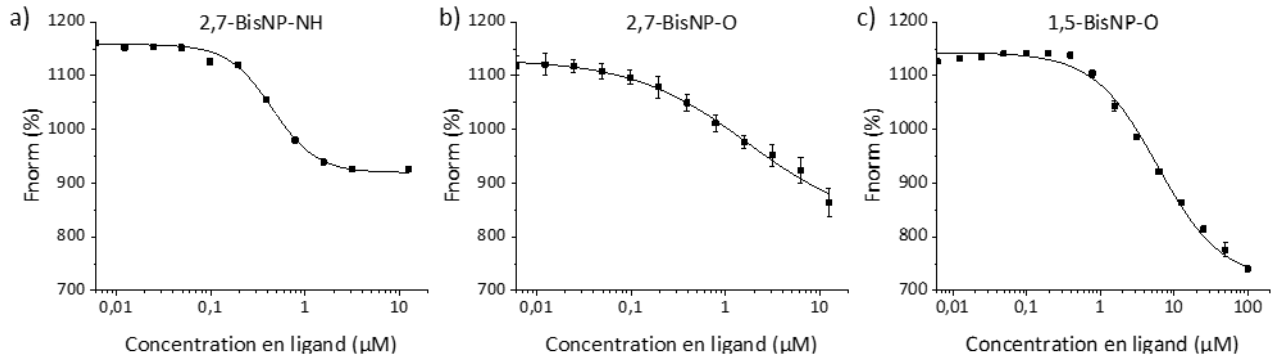


Figure 118- Représentations graphiques de l'affinité des ligands pour l'ADN présentant un mésappariement TT évaluée par *MicroScale Thermophoresis* : a) ligand 2,7-BisNP-NH ; b) ligand 2,7-BisNP-O ; c) ligand 1,5-BisNP-O. Oligonucléotide (5'-TAMRA-CGTCGTAGTGC-3'/5'-GCAGCTTCACG-3') = [0,5 μM], tampon = KPi 20 mM, KCl 90 mM, NaCl 40 mM, pH = 7,2, T = 20 °C.

IV- Etudes mécanistiques des dommages à l'ADN induits par les ligands *in cellulo*

Dans le but de valider le mode d'action des ligands macrocycliques de type 2,7-BisNP au sein des cellules, les dommages à l'ADN induits dans les cellules dont notamment les sites abasiques, les coupures simple-brins et double-brins ont été évalués par différentes méthodes.

1- Quantification des sites abasiques *in cellulo*

Les différentes études de cytotoxicité effectuées sur les lignées cellulaires ont permis de mettre remarquablement en valeur la capacité du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me à augmenter l'effet cytotoxique de différents agents alkylants. Cependant parmi les différents macrocycles 2,7-BisNP, ce ligand a affiché au cours des études *in vitro* la plus faible affinité pour les sites abasiques, corrélant avec sa plus faible capacité d'inhibition de l'activité d'APE1 (Tableau 4). Ainsi afin de valider la cible biologique potentielle de ce ligand, c'est-à-dire les sites abasiques, une quantification de ces derniers au sein de l'ADN génomique après incubation avec le composé a été effectuée. En effet, une augmentation du nombre de sites abasiques devrait être observée dans l'hypothèse où le ligand inhibe leur réparation.

Dans le but de valider cette hypothèse, les cellules de la lignée T98G ont été traitées simultanément avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et l'agent alkylant MMS pendant 24 heures afin de se rapprocher de conditions décrites dans la littérature. Les concentrations en composé ont été choisies pour inhiber la prolifération des cellules à hauteur de 30 – 40%. Suite à la période d'incubation, l'ADN des cellules a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction (Qiagen) en prenant soin de ne pas induire de nouveaux dommages ou de cliver les sites AP présents en maintenant les échantillons dans la glace tout au long du processus. Puis la quantification des sites abasiques a été effectuée à l'aide du kit « DNA Damage Quantification – AP Site Counting kit », commercialisé par Dojindo.

La détection des sites abasiques avec ce kit est basée sur la réactivité de la fonction aldéhyde présentée par la forme ouverte du site abasique avec un réactif ARP porteur d'un groupement biotine (Figure 119). Ainsi les sites abasiques peuvent être quantifiés à l'aide de l'interaction entre la biotine et d'un conjugué enzymatique de la streptavidine de type peroxydase de raifort (HRP). Après liaison de la biotine avec la streptavidine, l'enzyme induit la formation de composés permettant une détection colorimétrique (lecture d'absorbance) suite à l'oxydation de son substrat en présence d'H₂O₂. Il est important de noter que, dans notre cas, le kit détecte également les produits de coupure de type β-élimination pouvant être générés par les macrocycles, ces derniers présentant également une fonction aldéhyde (Figure 26).

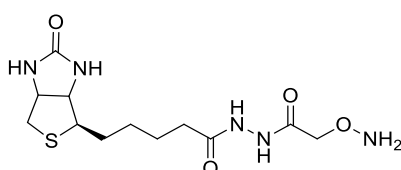


Figure 119- Structure de la sonde ARP utilisée pour la détection des sites AP.

Afin de valider les conditions expérimentales, l'inhibiteur d'APE1 connu AR03 a également été ajouté à l'étude, ce dernier étant décrit dans la littérature pour augmenter le nombre de sites abasiques en combinaison avec le MMS au sein de l'ADN génomique des cellules de glioblastome SF767 traitées pendant 24 h.¹³¹ Les données présentées sont le résultat de trois expériences indépendantes.

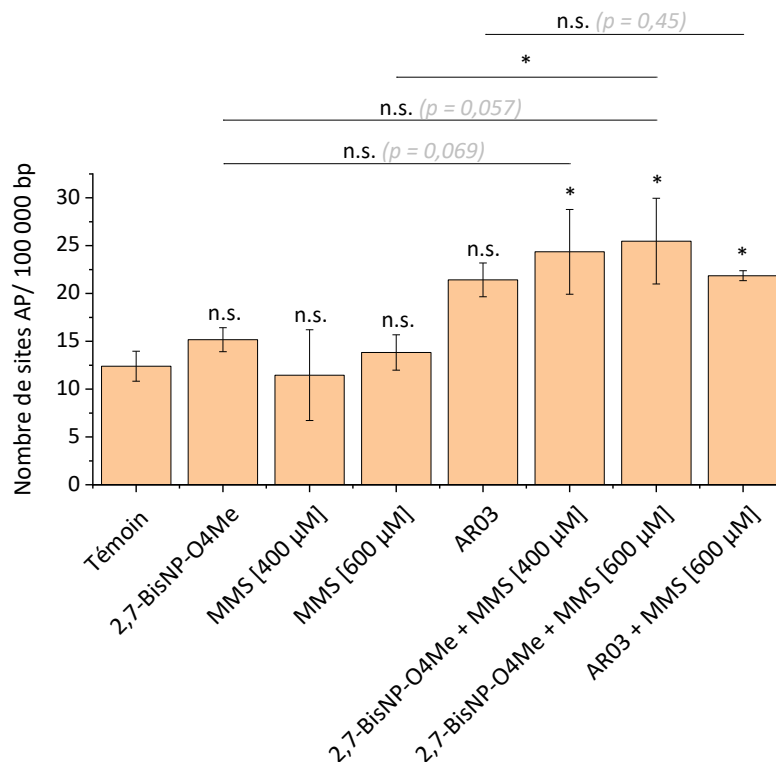


Figure 120- Nombre de sites abasiques présents dans l'ADN génomique des cellules T98G traitées 24 h avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me, AR03 et le MMS seuls ou en combinaison. Résultats de trois expériences indépendantes. Les valeurs p sont déterminées avec le test de Student en comparaison avec le nombre de sites AP dans les cellules témoins non traitées ou les cellules traitées seulement avec les composés 2,7-BisNP-O4Me, AR03 ou MMS (n.s., $p > 0,05$; *, $p \leq 0,05$).

En premier lieu, les résultats montrent que le ligand 2,7-BisNP-O4Me seul n'induit pas de variations significatives du nombre de sites abasiques au sein des cellules. Ainsi en ne présentant pas de diminution ni d'augmentation de leurs nombres, les données suggèrent que le ligand n'inhibe pas l'activité d'APE1 sur les sites abasiques endogènes et ne clive pas les sites abasiques *in cellulo*, validant les différentes observations obtenues *in vitro*.

De plus, de façon notable les cellules incubées avec le MMS, quelque soit sa concentration, ne présentent pas un nombre plus important de sites abasiques après 24 heures, bien que l'action de cet agent alkylant conduise à la formation de sites abasiques. Cette constatation est cohérente avec la rapide prise en charge de ces lésions par les systèmes de réparation. En effet, bien que dépendant de la lignée cellulaire étudiée, Madhusudan et al. ont mis en avant une diminution d'un facteur deux du nombre de sites abasiques présents après 1 heure (environ 40 sites AP / 100 000 bp) et 2 heures de traitement avec le MMS seul sur la lignée HT1080.¹¹⁰

En revanche, les résultats de la combinaison du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me avec l'agent alkylant mettent en évidence une augmentation du nombre de sites abasiques d'un facteur deux, à deux concentrations en MMS. Les sites abasiques induits par l'action du MMS n'étant plus visibles après 24 heures et le ligand seul n'augmentant pas fortement leurs formations, ces résultats combinatoires suggèrent que la présence du ligand permet d'augmenter la durée de vie des sites abasiques formés après l'action du MMS. Ainsi le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me inhiberait la prise en charge des sites abasiques par l'enzyme APE1. Ces données permettent remarquablement de valider la cible biologique du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et son mécanisme d'action *in cellulo*.

Une augmentation du nombre de sites abasiques (d'un facteur 1,7 par comparaison avec les cellules non traitées) suite à la combinaison du composé AR03 avec le MMS a également été observée, en accord avec la littérature.¹³¹ Cependant, l'augmentation observée suite à cette combinaison n'est pas significativement différente de l'augmentation du nombre de sites AP induite par AR03 seul. Il est toutefois difficile de discuter ces données par comparaison à celles publiées, les résultats dépendant trop fortement de la concentration en composé, du temps d'incubation et de la lignée cellulaire étudiée. Néanmoins, il est intéressant de relever que l'augmentation observée suite au traitement avec AR03 est moindre que dans le cas de la combinaison avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me, suggérant une meilleure capacité d'inhibition de la réparation des sites abasiques *in cellulo* du macrocycle par rapport à AR03.

2- Evaluation des coupures double-brins au sein de l'ADN par étude de la localisation des protéines γ -H2AX

Parmi les différentes lésions pouvant survenir au sein de l'ADN, les coupures double-brins sont très fréquentes. Elles peuvent être causées par une variété de facteurs directs tels que suite à l'exposition à des radiations ionisantes ou aux espèces réactives de l'oxygène mais également indirectement suite à divers processus métaboliques ou à des déficiences dans les voies de réparation. Ainsi, les différents intermédiaires formés au cours des processus de réparation, dont notamment la voie BER, peuvent conduire à la formation de coupures double-brins s'ils ne sont pas correctement pris en charge. Les travaux récemment menés par le laboratoire de Greenberg ont notamment permis de mettre en évidence que les sites abasiques peuvent aboutir, au sein des nucléosomes, à la formation de coupures double-brins, conséquence de la formation de pontages entre les sites abasiques et les protéines (*Figure 14*).⁶⁴ Mais les coupures double-brins peuvent également être le résultat de processus secondaires mis en place suite à la formation de coupures simple-brins non réparées ou de pontages interbrins.⁶⁷ Face à la forte cytotoxicité des coupures double-brins, de nombreux traitements anticancéreux ont pour but d'engendrer ce type de lésion au sein de l'ADN. Ainsi, le développement de méthodes permettant de quantifier les coupures double-brins est devenu un enjeu pour permettre d'évaluer l'efficacité des traitements thérapeutiques.

La formation d'une lésion de type coupure double-brin implique très rapidement la phosphorylation de la protéine H2AX par des protéines kinases sur le résidu sérine 139 conduisant ainsi à la protéine nommée γ -H2AX. Cette dernière est alors recrutée au niveau de la lésion permettant dans un second temps le recrutement d'autres enzymes de réparation.^{288,289} La protéine H2AX appartient à la famille des histones H2A, comptant parmi les cinq familles d'histones permettant l'organisation de l'ADN eucaryote en chromatine.

Les premières applications de la co-localisation des protéines γ -H2AX avec les coupures double-brins ont été mises en avant au début des années 2000.^{290,291} En effet, il a été démontré que la protéine γ -H2AX qui s'agglutine sur des milliers de paires de bases forme des foyers nucléaires distincts qui peuvent être aisément détectés par immunofluorescence et quantifiés par microscopie ou par cytométrie de flux.²⁹²

Bien qu'un foyer rassemble au moins plusieurs centaines de protéines γ -H2AX, il a pu être établi que le nombre de foyers reflète le nombre de coupures double-brins présents au sein de l'ADN, notamment suite à l'action des radiations,^{290,293} principalement dans des conditions engendrant moins de 100 – 150 coupures double-brins par génome.²⁹⁴ Cependant des controverses existent. En effet, il a été mis en évidence que la réparation des lésions à l'ADN par la voie par excision de nucléotides mais également la réparation des pontages interbrins peuvent se mettre en place sans le recrutement de γ -H2AX.²⁹⁵ A l'inverse, la présence de la protéine γ -H2AX a également été notée dans divers processus n'impliquant pas la formation (directe ou indirecte) de coupures double-brins, comme au cours de la spermatogénèse. Cependant la présence de ces protéines n'induit pas, dans ces cas, la formation et la localisation de foyers distincts.^{292,295}

Dix ans après les premières applications, différentes études ont permis de valider l'utilisation de la protéine γ -H2AX comme biomarqueur des dommages engendrés à l'ADN par des petites molécules n'induisant pas directement des coupures double-brins. Parmi ces études, la formation de pontages intrabrins au sein de l'ADN par des composés comme le cisplatine a notamment été suivie en utilisant l'histone phosphorylée γ -H2AX comme marqueur.²⁹⁶ Mais également, Watters et al. ont mis remarquablement en avant la corrélation entre la concentration en MMS et le nombre de foyers γ -H2AX visualisés et quantifiés par microscopie.²⁹⁷ De plus, en parallèle, l'implication de la protéine γ -H2AX dans la réparation des dommages induits par le témozolomide a pu être mise en valeur.²⁹⁵ Fort de ces résultats, l'étude des dommages engendrés au sein de l'ADN par les ligands macrocycliques seuls mais également en combinaison avec des agents alkylants a été effectuée en visualisant par microscopie le nombre de foyers γ -H2AX, détecté par immunofluorescence.

Les cellules T98G ont ainsi été traitées pendant quatre jours avec les différents ligands, les agents alkylants MMS et TMZ seuls mais également en combinaison à une concentration égale à leur GI_{50} . Suite à cette période, les cellules ont été fixées, perméabilisées et la protéine γ -H2AX a alors été marquée à l'aide d'anticorps spécifiques. Afin de permettre la détection des histones, l'anticorps secondaire utilisé est marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et l'ADN nucléaire est marqué à l'aide d'un colorant de l'ADN double-brin fluorescent, le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). La visualisation de la localisation des noyaux cellulaires ainsi que des foyers γ -H2AX a été effectuée par microscopie de fluorescence.

De façon notable, des différences de marquage γ -H2AX dans la réponse des cellules selon les traitements ont été observées (*Figure 121*). En effet, alors que certains ligands augmentent le nombre de foyers γ -H2AX visuellement comparables à ceux des cellules non traitées comme le ligand 1,5-BisNP-O, d'autres conduisent à la formation de foyers plus petits mais plus intenses, notamment le ligand 2,7-BisNP-NOH. Ainsi, afin de refléter au mieux ces différences, le nombre mais également la taille et l'intensité des foyers ont été évalués pour chaque condition (*Figure 122*).

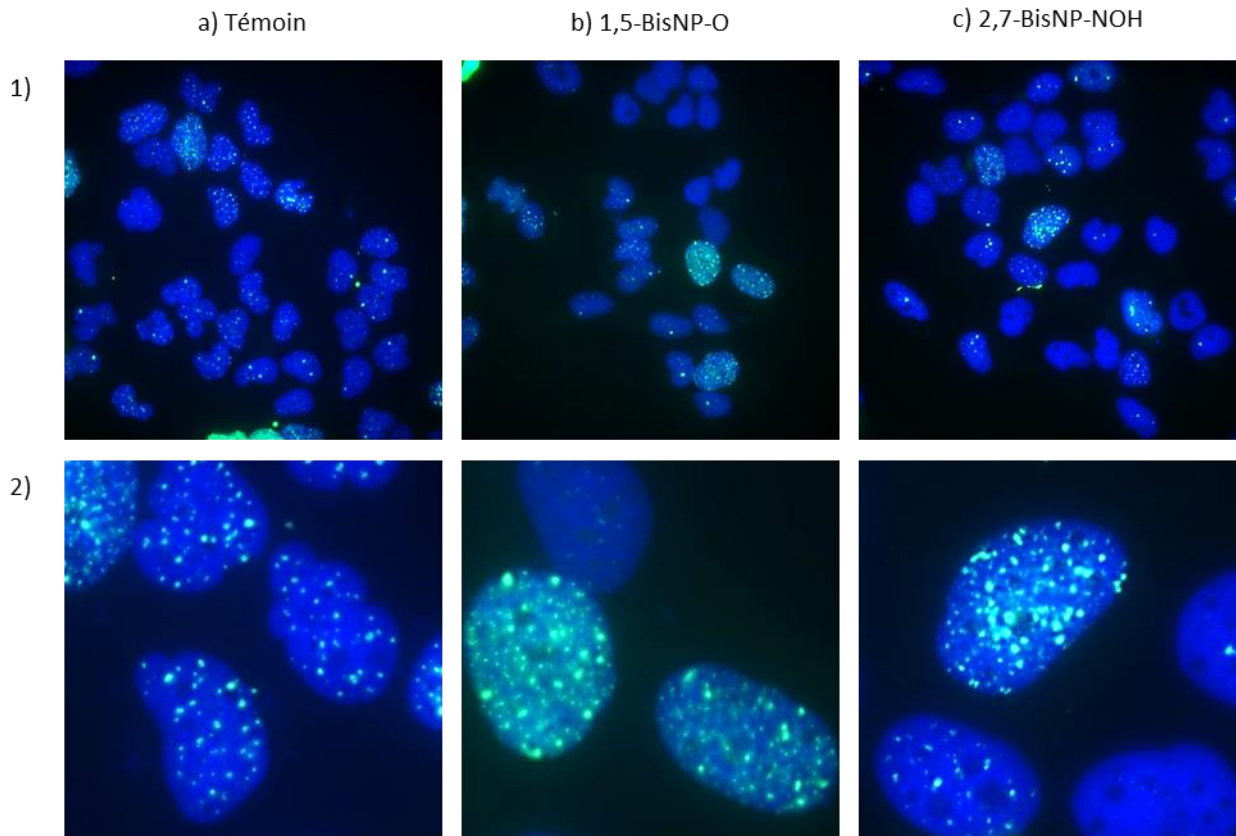


Figure 121- Foyers γ -H2AX visualisés par fluorescence de FITC (en vert) dans le noyau (marquage DAPI en bleu) des cellules T98G : a) non traitées ; b) traitées 96 h avec le ligand 1,5-BisNP-O ; c) traitées 96 h avec le ligand 2,7-BisNP-NOH. 1) Images visualisées par microscopie à épifluorescence (objectif x63) ; 2) Sections d'image (grossissement 4x). Acquisition des images par plans focaux puis projection suivant l'axe z. Les composés ont été évalués à une concentration égale à leur GI_{50} .

En premier lieu, il est important de noter que, bien qu'une variation du nombre de foyers γ -H2AX puisse être observée dans certaines conditions (*Figure 122*), celle-ci reste néanmoins limitée. En effet, alors que les cellules non traitées affichent en moyenne 11 foyers γ -H2AX, le nombre moyen de foyers γ -H2AX observés au maximum au sein des cellules traitées avec les macrocycles seuls n'est que de 16 (ne représentant qu'une augmentation de 37%) et n'augmente que jusqu'à 24 dans le cas d'une combinaison avec le MMS. A titre de comparaison, le traitement des cellules par le cisplatine peut conduire à augmenter le nombre de foyers γ -H2AX jusqu'à 60 en moyenne.

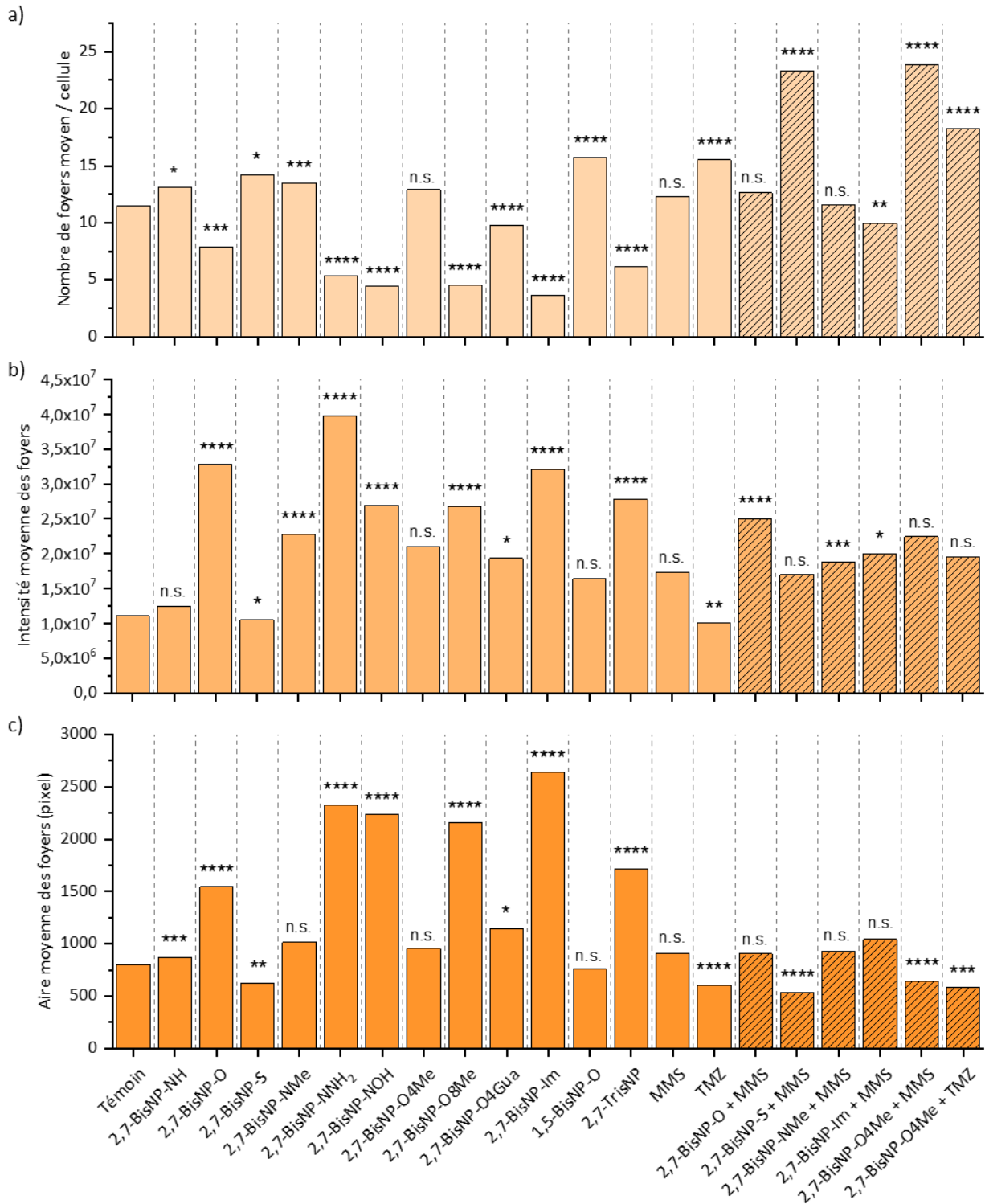


Figure 122- Foyers γ -H2AX formés dans les cellules T98G traitées 96 h par différents composés : a) nombre moyen de foyers γ -H2AX par cellule ; b) intensité moyenne des foyers ; c) aire moyenne des foyers.

Les barres hachurées représentent les résultats obtenus suite à un traitement combiné des cellules avec un macrocycle et un agent alkylant. Les ligands ont été testés à une concentration égale à leur GI_{50} . Les valeurs p sont déterminées par test de Mann Whitney par comparaison aux cellules témoins non traitées (n.s., $p > 0,05$; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ****, $p \leq 0,0001$). Résultats d'un triplicata expérimental. Traitement pour chaque condition et par expérience d'environ 300 cellules.

Résultats de l'étude des foyers γ -H2AX formés suite au traitement des cellules avec les composés seuls

Dans un premier temps, les résultats obtenus après traitement des cellules avec les composés seuls (Figure 122) mettent en évidence qu'aucun ligand ne permet seul d'augmenter fortement le nombre moyen de foyers γ -H2AX après 96 h de traitement. Toutefois, les données permettent de séparer les composés en différentes catégories.

- Les macrocycles 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me mais également le MMS ne présentent pas d'augmentation du nombre de foyers γ -H2AX ni de leur intensité et de leur taille, ainsi la réponse des cellules traitées avec ces composés est comparable aux cellules non traitées. Dans le cas du traitement des cellules avec le MMS, cette observation est en accord avec une réparation rapide des sites abasiques engendrés par cet agent alkylant, comme déjà suggérée par l'absence d'augmentation du nombre de sites abasiques après 24 h de traitement, ne permettant donc pas une évolution potentielle de ces derniers en coupures double-brins.

- Le macrocycle 1,5-BisNP-O et le TMZ affichent une augmentation, toutefois relative (augmentation seulement de 37%), du nombre de foyers γ -H2AX, sans induire de modification de l'intensité et de la taille de ces foyers.

- Le macrocycle 2,7-BisNP-NMe présente une très légère augmentation du nombre de foyers γ -H2AX (environ 20%) mais l'intensité de ces derniers est deux fois plus importante.

- Les macrocycles 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua, 2,7-BisNP-Im et 2,7-TrisNP induisent étonnamment une diminution du nombre de foyers γ -H2AX, pouvant conduire à une réduction de moitié pour les ligands dont l'effet est le plus marqué (2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-Im et 2,7-TrisNP), mais d'intensité et de taille au minimum deux fois plus importantes. Hypothétiquement, cette observation peut être expliquée par la localisation des coupures double-brins (en nombre plus important ou non) sur une zone restreinte de l'ADN, conduisant ainsi à une accumulation de protéines γ -H2AX dans un environnement très proche. Cette agglomération des histones pourrait alors être détectée seulement sous la forme d'un seul foyer mais de taille plus importante.

L'augmentation de l'intensité des foyers γ -H2AX induite par les deux dernières catégories de macrocycles peut suggérer un agencement spatial particulier de la chromatine induit par les ligands. En effet, cette hypothèse est appuyée sur les récentes découvertes mises en avant par le laboratoire de Cardoso.²⁹⁸ Ces recherches ont permis de révéler que les foyers γ -H2AX conventionnellement observés par microscopie reflètent une condensation et association particulière de la chromatine. En effet, un foyer est le résultat de l'association de plusieurs boucles de chromatines liées à des protéines γ -H2AX, appelées alors nano-foyers γ -H2AX. Lorsque les nano-foyers γ -H2AX sont dans un environnement proche (< à 500 nm), ils forment un réseau (*cluster*) conduisant à la visualisation d'un seul foyer γ -H2AX. Ainsi, la taille d'un foyer γ -H2AX est dépendante du nombre de nano-foyers γ -H2AX le constituant mais également de la distance entre ces nano-foyers délimitant un volume dit inter-focal.

Ainsi le traitement des cellules avec les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua, 2,7-BisNP-Im et 2,7-TrisNP pourraient conduire à la localisation des coupures double-brins d'ADN (en nombre plus important ou non), suite à une organisation particulière de la chromatine, induisant une accumulation de nano-foyers γ -H2AX dans un environnement proche. Cette accumulation de nano-foyers γ -H2AX impliquerait alors à la formation d'un cluster visualisé sous la forme d'un seul foyer γ -H2AX, expliquant ainsi la diminution du nombre de foyers par comparaison aux cellules non traitées, mais de taille plus importante. Enfin hypothétiquement, la taille importante des foyers γ -H2AX serait le reflet d'un nombre important de nano-foyers γ -H2AX constituant le réseau et non d'une distance plus importante (respectant toutefois une distance < à 500 nm) entre des boucles de chromatines moins nombreuses. En effet cette hypothèse, impliquant la présence d'un nombre important d'histones γ -H2AX, corrélait avec l'augmentation de l'intensité des foyers observés.

Enfin, il est intéressant de noter que ces résultats ne peuvent cependant pas être mis en corrélation avec l'activité de clivage du site AP affichée par les ligands *in vitro*. En effet, alors que les ligands 2,7-BisNP-NNH₂ et 2,7-BisNP-NOH, notamment, présentent une vitesse de clivage importante *in vitro*, ce n'est pas le cas des ligands 2,7-BisNP-Im, 2,7-BisNP-O4Gua et 2,7-BisNP-O8Me ([Tableau 6](#)).

Résultats de l'étude des foyers γ -H2AX formés suite au traitement combiné des cellules avec les macrocycles et les agents alkylants

Dans un deuxième temps, les foyers γ -H2AX formés après un traitement combiné des cellules avec le MMS et différents macrocycles ont été étudiés. Les ligands ont été choisis de façon à représenter différents comportements des macrocycles de la série 2,7-BisNP, établis *in cellulo* mais aussi *in vitro*. Pour rappel, les macrocycles 2,7-BisNP-O et 2,7-BisNP-NMe présentent une forte cytotoxicité (GI₅₀ = 0,4 μ M et 0,6 μ M respectivement) et une vitesse de clivage des sites AP modérée *in vitro* ([Tableau 6](#)). Le macrocycle 2,7-BisNP-Im présente une cytotoxicité moins importante (GI₅₀ = 3,3 μ M) et une vitesse de clivage des sites AP nulle *in vitro*. Le macrocycle 2,7-BisNP-S affiche une vitesse de clivage élevée *in vitro* et présente notablement la capacité à augmenter la cytotoxicité du TMZ. Enfin, le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me conduit *in cellulo* à un effet synergique en combinaison avec les agents alkylants (MMS et TMZ) et montre la capacité à augmenter le nombre de sites AP.

Les résultats obtenus mettent en évidence que le traitement avec les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe et 2,7-BisNP-Im, qui augmentent seuls l'intensité et la taille des foyers γ -H2AX, en combinaison avec le MMS ne permet pas d'augmenter ni le nombre, ni la taille des foyers γ -H2AX. Cependant les foyers γ -H2AX présentent une intensité légèrement plus importante. Ainsi le traitement des cellules avec les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NMe et 2,7-BisNP-Im en combinaison avec le MMS conduit à la même tendance que le traitement des cellules avec ces macrocycles seuls, mais de façon néanmoins moins prononcée.

De façon notable seuls les macrocycles 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me augmentent sensiblement les coupures double-brins en combinaison avec le MMS, mettant de nouveau en valeur le fort potentiel de ces ligands contrairement aux autres ligands de la série 2,7-BisNP. En effet, les données mettent remarquablement en évidence un doublement du nombre de foyers γ -H2AX d'intensité et de taille cependant comparables à ceux des foyers des cellules non traitées. De façon similaire, les cellules

traitées avec le TMZ en combinaison avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me présentent une augmentation du nombre de foyers γ -H2AX, cependant légèrement moindre que lors de la combinaison avec le MMS (Figure 123). Ainsi, ces ligands n'induisent pas seuls d'augmentation du nombre de foyers γ -H2AX, la présence de ces derniers permettrait d'inhiber la réparation des sites abasiques engendrés suite à l'action du MMS, conduisant alors à la formation de coupures double-brins au sein de l'ADN, lésions fortement toxiques pour les cellules. Cette hypothèse corrèlerait ainsi avec l'augmentation du nombre de sites abasiques observée suite au traitement des cellules en combinaison avec le MMS et le ligand 2,7-BisNP-O4Me mais aussi pourraient contribuer à apporter des éléments de réponse quant à la potentialisation de la cytotoxicité des agents alkylants par le ligand 2,7-BisNP-O4Me mise en évidence par notre étude. De plus, il est intéressant de relever qu'au cours des études préliminaires de cytotoxicité sur la lignée T98G, la capacité du ligand 2,7-BisNP-S à augmenter la cytotoxicité du TMZ a déjà été mise en valeur (Figure 95). Cependant l'effet étant moindre que celui affiché avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me, les études biologiques ont dans un second temps principalement été centrées sur l'étude de ce dernier. Toutefois, les résultats présentés ici contribuent à renforcer les premières constatations. A l'instar du ligand 2,7-BisNP-O4Me, la potentialisation de la cytotoxicité des agents alkylants par le macrocycle 2,7-BisNP-S pourrait être la conséquence de l'augmentation des coupures double-brins observées au sein de l'ADN lors de la combinaison des composés.

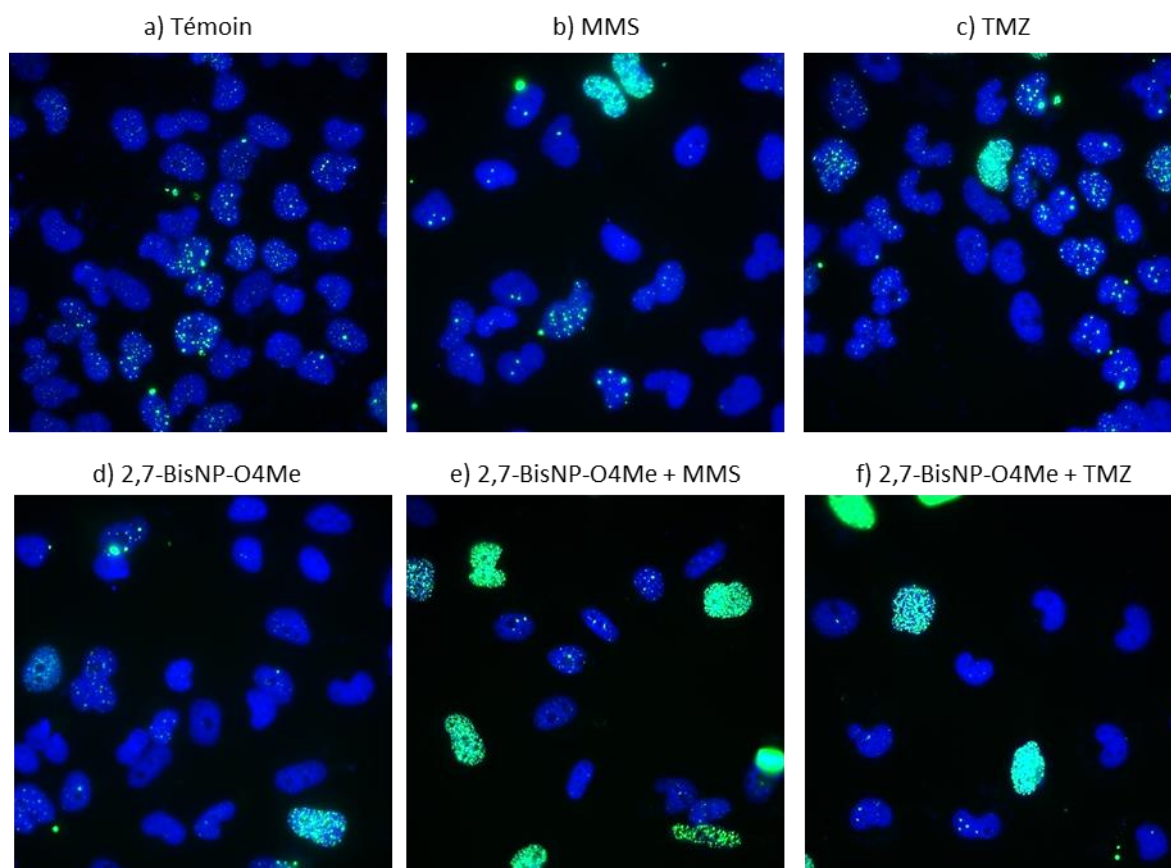


Figure 123- Co-localisation des noyaux cellulaires marqués à l'aide de DAPI (en bleu) et des foyers γ -H2AX visualisés par fluorescence de FITC (en vert) après 96 h d'incubation des cellules T98G : a) non traitées ; b) traitées avec le MMS (GI_{50}) ; c) traitées avec le TMZ (GI_{50}) ; c) traitées avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me (GI_{50}) ; d) traitées avec le MMS (GI_{50}) en combinaison avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me (GI_{50}) ; e) traitées avec le TMZ (GI_{50}) en combinaison avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me (GI_{50}), visualisées par microscopie (objectif x 63). Les composés ont été évalués à une concentration égale à leur GI_{50} .

3- Evaluation des dommages à l'ADN par le test des comètes

L'étude de la formation des foyers γ -H2AX a permis d'évaluer la capacité des ligands à conduire seuls ou en combinaison à la formation de coupures double-brins d'ADN. Cependant, ces lésions ne sont pas induites directement par les macrocycles ou par les agents alkylants ainsi la visualisation de ces dernières n'est possible que suite à des processus secondaires consécutifs à la formation de sites AP non réparés (conduisant à la formation de coupures simple-brins dans un premier temps), de pontages interbrins et / ou de pontages ADN – protéine. De ce fait, les coupures double-brins d'ADN observées ne reflètent pas nécessairement tous les dommages au sein de l'ADN. Ainsi, de façon complémentaire, il est intéressant d'évaluer la quantité de lésions présentes incluant notamment les coupures simple-brins après le traitement des cellules avec les macrocycles. L'évaluation des dommages induits à l'ADN par les ligands seuls ou en combinaison a donc été réalisée par test des comètes.

Le concept du test des comètes (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) a été mis au point pour la première fois en 1984 par Osting et Johanson²⁹⁹ puis optimisé quelques années plus tard en 1988 par Singh et al.³⁰⁰ dans le but de mesurer les dommages à l'ADN en visualisant la vitesse de migration des brins de l'ADN. La méthode développée alors consiste en l'électrophorèse dans des microgels d'agarose de l'ADN des cellules emprisonnées. Après une lyse des cellules, l'incubation des gels dans un tampon d'électrophorèse basique permet alors la dénaturation de l'ADN cellulaire et expose également les sites sensibles aux agents alcalins, notamment les sites abasiques, ce qui conduit alors à des coupures simple-brins formant ainsi des fragments d'ADN de poids moléculaire plus faible que l'ADN non endommagé. Dans une seconde étape, l'ADN est soumis à un champ électrique puis sa migration est analysée et visualisée à l'aide d'un intercalant de l'ADN fluorescent.³⁰¹ L'ADN non endommagé, ne migrant pas, est révélée sous la forme d'une sphère compacte constituant ce que l'on appelle la tête de la comète. Mais les fragments d'ADN, en présentant une vitesse de migration, se détachent de la tête de la comète pour former un halo représentant alors la queue de la comète (*Figure 124*).

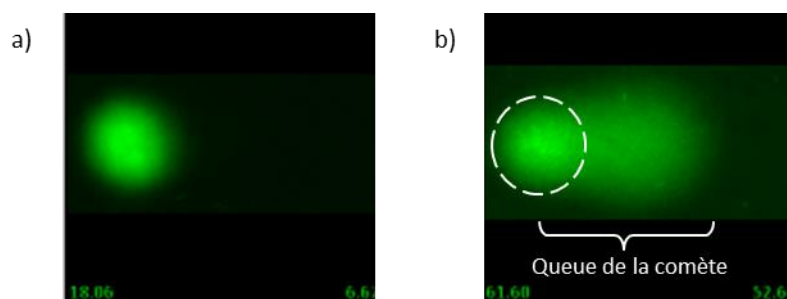


Figure 124- Exemple de comète visualisée par microscopie (objectif x20) : a) en absence de dommages à l'ADN ; b) en présence de dommages de l'ADN. Tête de la comète délimitée en pointillé.

L'étude de la queue de la comète permet alors d'évaluer la quantité de lésions présentes au sein de l'ADN cellulaire. Cette dernière est retranscrite sous le paramètre « moment de la queue de comète », qui représente le pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète multiplié par la longueur de la queue de la comète.

Alors que l'électrophorèse en condition alcaline permet de détecter, cependant sans distinction, les lésions de type coupure double-brin, coupure simple-brin et les sites sensibles aux conditions alcalines (les sites AP notamment), il est intéressant de noter que la méthode a également été développée dans des conditions neutres n'impliquant donc pas la dénaturation de l'ADN, ainsi seules les coupures double-brins sont observées.³⁰¹

Dans le cadre de l'étude, les cellules T98G ont été traitées pendant 96 h avec les différents ligands seuls mais également en combinaison avec les agents alkylants MMS ou TMZ, à une concentration égale à leur GI₅₀. L'électrophorèse sur gel d'agarose a dans un second temps été réalisée en condition alcaline et la migration de l'ADN marqué, post-électrophorèse, par le bromure d'éthidium a été visualisée par microscopie de fluorescence.^b Le moment de la queue de la comète a ensuite été déterminé par analyse des images ainsi acquises.

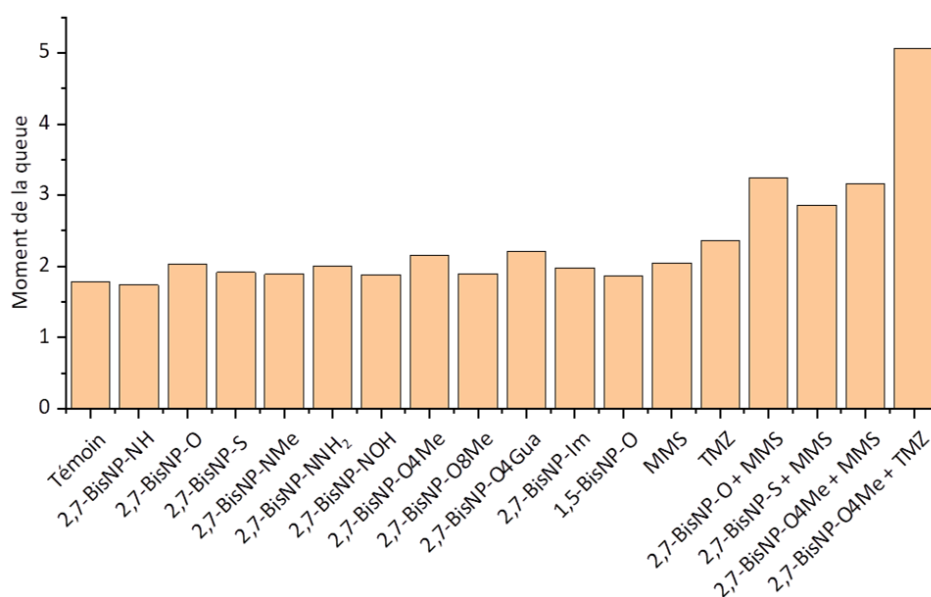


Figure 125- Evaluation par test des comètes des dommages au sein de l'ADN nucléaire induits par les macrocycles seuls ou en combinaison avec un agent alkylant après quatre jours de traitement des cellules T98G. Les composés ont été évalués à une concentration égale à leur GI₅₀. Données obtenues après évaluation de 100 cellules par condition en moyenne.

Résultats de l'étude des comètes des cellules traitées avec les composés seuls

L'étude du moment de la queue des comètes met en évidence que l'ADN nucléaire traité avec les différents macrocycles seuls ne présente pas de fragments d'ADN plus courts que l'ADN des cellules non traitées (Figure 125). Ainsi, les données présentent que les ligands n'augmentent pas le nombre de coupures simple-brins et double-brins d'ADN. Ce résultat est cohérent avec le faible nombre de foyers γ -H2AX observés au cours de la précédente étude, reflétant ainsi la présence de cassures d'ADN mais en nombre probablement trop faible pour être détectée par le test des comètes. En effet, il a déjà été décrit qu'une augmentation des dommages à l'ADN quantifiée par les foyers γ -H2AX n'était cependant pas toujours reflétée par les résultats obtenus avec le test des comètes, mettant ainsi en évidence la sensibilité plus faible de ce test.³⁰² Ainsi, bien que l'absence de

^b Tests de comètes réalisés par la plateforme de radiothérapie expérimentale *RadExp*, interne à l'Institut Curie.

dommages soit observée par le test des comètes, les résultats ne permettent pas de conclure sur la capacité de ces macrocycles à induire ou non des coupures double-brins.

Résultats de l'étude des comètes des cellules traitées avec les composés en combinaison avec un agent alkylant (MMS ou TMZ)

Les données révèlent que le traitement combiné des cellules avec le MMS et les macrocycles 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me permet d'augmenter sensiblement les dommages de l'ADN génomique. En effet, les comètes formées par l'ADN après le traitement des cellules avec l'agent alkylant en présence de ces ligands présentent une queue environ deux fois plus importante que les cellules non traitées. L'absence de dommages induits par ces ligands ayant été mise en valeur, les résultats mènent à la conclusion que les macrocycles 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me permettent d'augmenter la durée de vie des dommages engendrés par le MMS.

La quantification des foyers γ -H2AX a déjà permis de mettre en évidence la capacité des ligands 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me à potentialiser l'accumulation de coupures double-brins au sein de l'ADN en présence de MMS. De plus, le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me a remarquablement démontré la capacité à augmenter les dommages à l'ADN en combinaison également avec le TMZ. Les résultats ainsi obtenus par le test des comètes sont en accord avec les premières conclusions établies et permettent de confirmer les résultats de détection de cassures d'ADN double-brins mis en évidence par γ -H2AX. Ainsi, ces deux macrocycles induisent la formation de dommages à l'ADN, pouvant expliquer la capacité de ces derniers à sensibiliser les cellules à l'action des agents méthylants (MMS ou TMZ). Cependant aucune augmentation du nombre de foyers γ -H2AX n'avait été mise en évidence en présence du MMS et du ligand 2,7-BisNP-O (*Figure 122*), mais cette combinaison n'ayant été évaluée par test des comètes qu'une seule fois, ces conclusions restent à être validées de nouveau.

Ainsi les résultats de cette étude, en corrélation avec ceux des foyers γ -H2AX, suggèrent que les ligands 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-S permettent d'augmenter la durée de vie des sites abasiques formés suite à l'action des agents méthylants (MMS ou TMZ). L'évolution de ces derniers en coupures simple-brins conduirait alors ensuite aux coupures double-brins. De façon intéressante, le test des comètes révèle que le ligand 2,7-BisNP-O4Me semble favoriser de façon plus importante l'accumulation au sein de l'ADN des dommages engendrés par le TMZ par comparaison au MMS (augmentation d'un facteur trois du nombre de dommages avec le TMZ et d'un facteur deux avec le MMS). Cependant une telle différence est inversée lors de la quantification des dommages de type coupure double-brin par γ -H2AX. Cette observation serait le reflet d'un plus grand nombre de lésions de type site abasique et / ou coupure simple-brin, dommages révélés uniquement par le test des comètes, engendrées par le TMZ par comparaison au MMS. Ce fait pourrait hypothétiquement s'expliquer par le mécanisme réactionnel différent entre ces deux agents alkylants. En effet, contrairement au MMS, le témozolomide est un agent alkylant de type S_N1 conduisant donc également à la formation de lésions de type O^6 -méthylguanine qui, en absence de prise en charge par l'enzyme MGMT, peuvent également aboutir à la formation de coupures simple-brins dans un premier temps.

En conclusion, la capacité des ligands 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-S à augmenter les dommages à l'ADN visibles par le test des comètes ainsi que le nombre de foyers γ -H2AX après traitement des

cellules en combinaison avec les agents méthylants MMS ou TMZ a été mis en évidence. De façon remarquable, cette activité peut être corrélée avec l'augmentation de la durée de vie des sites abasiques observée au sein des cellules traitées en combinaison avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et le MMS. Cependant, les cellules traitées avec les macrocycles 2,7-BisNP-O4Me et 2,7-BisNP-S seuls n'ont pas présenté d'augmentation des dommages à l'ADN. Cette constatation pourrait être expliquée par un nombre basal de sites abasiques insuffisamment important pour observer une diminution de réparation des sites AP dans les cellules traitées seulement par les ligands. Mais également les données peuvent potentiellement être le reflet de la formation de pontages avec les protéines ou de pontages interbrins. En effet, il a été mis en évidence dans la littérature la capacité des sites abasiques à former ces pontages.^{64,66-68,303} L'augmentation de la durée de vie des sites AP par les macrocycles pourrait favoriser la formation de ces derniers, ce qui conduirait à augmenter le poids moléculaire du brin d'ADN, initialement porteur d'un site abasique, ne permettant alors pas au brin d'ADN de se détacher de la tête de la comète au cours de la migration par électrophorèse. En effet, la formation de pontages interbrins d'ADN est connue pour ralentir la migration des brins d'ADN, conduisant ainsi à une diminution de la taille de la queue des comètes.³⁰⁴ L'absence d'augmentation du nombre de foyers γ -H2AX dans les cellules traitées avec les macrocycles 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me observée pourrait être expliquée par le même phénomène. En effet, il a été mis en évidence dans la littérature que la réparation des pontages interbrins n'impliquait pas nécessairement le recrutement de la protéine γ -H2AX.²⁹⁵ Ainsi, les données de la littérature contribuent à appuyer cette hypothèse.

V- Conclusion

L'étude *in cellulo*, notamment sur la lignée T98G, des macrocycles seuls tout d'abord a permis de mettre en évidence des différences entre la cytotoxicité présentée par ces derniers. En effet, les GI_{50} affichées sur cette lignée de glioblastome s'étalent ainsi de 0,2 μ M pour le macrocycle le plus cytotoxique, 1,5-BisNP-O, à une concentration supérieure à 70 μ M, pour les macrocycles 2,7-BisNP- NNH_2 et 2,7-BisNP-O8Me. Bien que dans un premier temps, la faible cytotoxicité des deux derniers ligands ait été attribuée à un potentiellement manque de pénétration au sein des cellules, ces macrocycles ont présenté la capacité à modifier, seuls, la localisation et l'accumulation des protéines γ -H2AX reflétant alors leur présence au sein des cellules.

Synthétisés dans le but de potentialiser la cytotoxicité des agents alkylants, les macrocycles ont de ce fait été évalués dans un second temps en combinaison avec le MMS ou le TMZ. Les différentes combinaisons de concentrations, de temps d'incubation et de stratégies d'ajout ont permis de mettre alors en évidence une augmentation de la cytotoxicité du TMZ, en présence des ligands 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me. L'effet étant plus marqué avec ce dernier macrocycle, une étude plus approfondie de celui-ci a remarquablement permis de révéler un effet synergique entre le ligand et les agents alkylants MMS et TMZ, visible seulement après 96 h de traitement des cellules T98G (reflétant la nécessité de plusieurs cycles de réplication afin d'obtenir un effet synergique). Les composés connus dans la littérature dont la méthoxyamine, AR03 et le composé « APE1 inhibiteur III » ne présentent pas la capacité à diminuer la viabilité des cellules T98G en combinaison avec le MMS dans nos conditions. Ils mettent ainsi en valeur le potentiel très prometteur du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me, atténué cependant par la cytotoxicité relativement forte de ce ligand seul ($GI_{50} = 3,1 \mu$ M).

Cependant, aucun effet synergique du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me avec la BCNU n'a pu être noté. Comme l'action de cet agent alkylant ne conduit pas à la formation des mêmes lésions que le MMS et le TMZ en impliquant notamment la formation d'adduits de type chloroéthyle ou encore de ponts interbrins (*Figure 10*), cette constatation peut être le reflet de la spécificité du macrocycle pour les lésions engendrées suite à la méthylation des bases. Cette hypothèse est également appuyée par les résultats obtenus lors de la combinaison des macrocycles avec les radiations ionisantes, ces dernières conduisant principalement à la formation de coupures simple-brins mais également de coupures double-brins et de bases oxydées. En effet, l'irradiation des cellules T98G en présence de plusieurs ligands incluant le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me n'a pas permis de potentialiser l'effet des rayonnements ionisants. Ainsi, aucun ligand n'a affiché un effet radio-sensibilisant en inhibant la réparation des dommages engendrés par les radiations. Cette observation suggère alors que le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me interviendrait dans le processus de réparation de l'ADN en amont de la formation des coupures simple-brins.

Toutefois, il est intéressant de noter que l'effet synergique affiché par le ligand 2,7-BisNP-O4Me n'a pas été observé sur la lignée de colon HCT116, contrairement à la méthoxyamine qui a présenté sur cette lignée la capacité à augmenter la cytotoxicité du MMS. Cette constatation, mise en parallèle avec les observations faites sur la lignée T98G, suggère que le macrocycle et la méthoxyamine présenteraient une cible biologique différente.

Fort de la visualisation par nanoSIMS de la localisation au sein des noyaux cellulaires de l'analogue 2,7-BisNP-NH présentant la structure type des macrocycles et de la stabilité des complexes ligand-ADN dans le milieu nucléaire, les données valident l'ADN comme cible biologique des macrocycles. Ainsi, afin de valider les effets biologiques du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me, les dommages présents au sein de l'ADN génomique ont donc été étudiés (sites AP, coupures simple-brins et coupures double-brins). Les résultats mettent alors en évidence la présence de dommages à l'ADN uniquement lorsque le macrocycle est combiné avec le TMZ ou le MMZ. En particulier, une augmentation des sites abasiques a pu être démontrée après 24 heures de traitement ainsi qu'une augmentation des coupures double-brins d'ADN après 96 h de traitement. Ces conclusions tendent alors à démontrer la capacité du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me à inhiber la réparation des sites abasiques formés après l'action des agents alkylants, ainsi ces derniers s'accumuleraient et conduiraient, après réplication de l'ADN, à la formation de cassures d'ADN double-brins.

L'étude en parallèle des dommages présents au sein de l'ADN des cellules traitées avec les différents macrocycles seuls, a révélé qu'outre le ligand 2,7-BisNP-O4Me, les macrocycles 2,7-BisNP-NH, 2,7-BisNP-S, 2,7-BisNP-NMe n'engendraient également pas de lésions particulières. Cependant, l'étude de la présence des foyers γ -H2AX a révélé que les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua et 2,7-BisNP-Im induisent potentiellement une modification de la structure de la chromatine, conduisant notamment au regroupement de cassures double-brins probablement endogènes dans un environnement proche. En effet, les foyers visualisés au sein de l'ADN des cellules traitées avec ces macrocycles présentent une intensité et une taille plus importante mais aussi une diminution du nombre moyen de foyers γ -H2AX par rapport aux cellules non traitées. Cependant, l'absence de dommages observés par test des comètes ne permet pas de conclure quant à une potentielle augmentation des cassures simple-brins et double-brins en présence de ces ligands.

Enfin, il est intéressant de relever que les constatations établies suite aux différentes études des dommages engendrés par les macrocycles à l'ADN *in cellulo* ne peuvent pas être mises en corrélation avec les vitesses de clivage des sites abasiques affichées *in vitro* par les ligands. En effet, aucune augmentation des dommages à l'ADN (sites AP et cassures double-brins) n'a pu être mise particulièrement en évidence avec les ligands présentant une activité de clivage, incluant le macrocycle 2,7-BisNP-S dont l'activité est la plus importante *in vitro*. Ainsi les résultats montrent que si les macrocycles clivent l'ADN *in cellulo* une réparation rapide des produits de coupure des sites abasiques, de type β -élimination et β,δ -élimination, est mise en place ou que le clivage des sites abasiques par les ligands ne se produit pas dans le contexte cellulaire. De plus, il est intéressant de noter que les différences de cytotoxicités affichées par les macrocycles seuls (GI₅₀) ne peuvent être expliquées par des différences dans la quantité de lésions présentes dans l'ADN, aucun ligand n'induisant de dommages particuliers en absence d'agents alkylants.

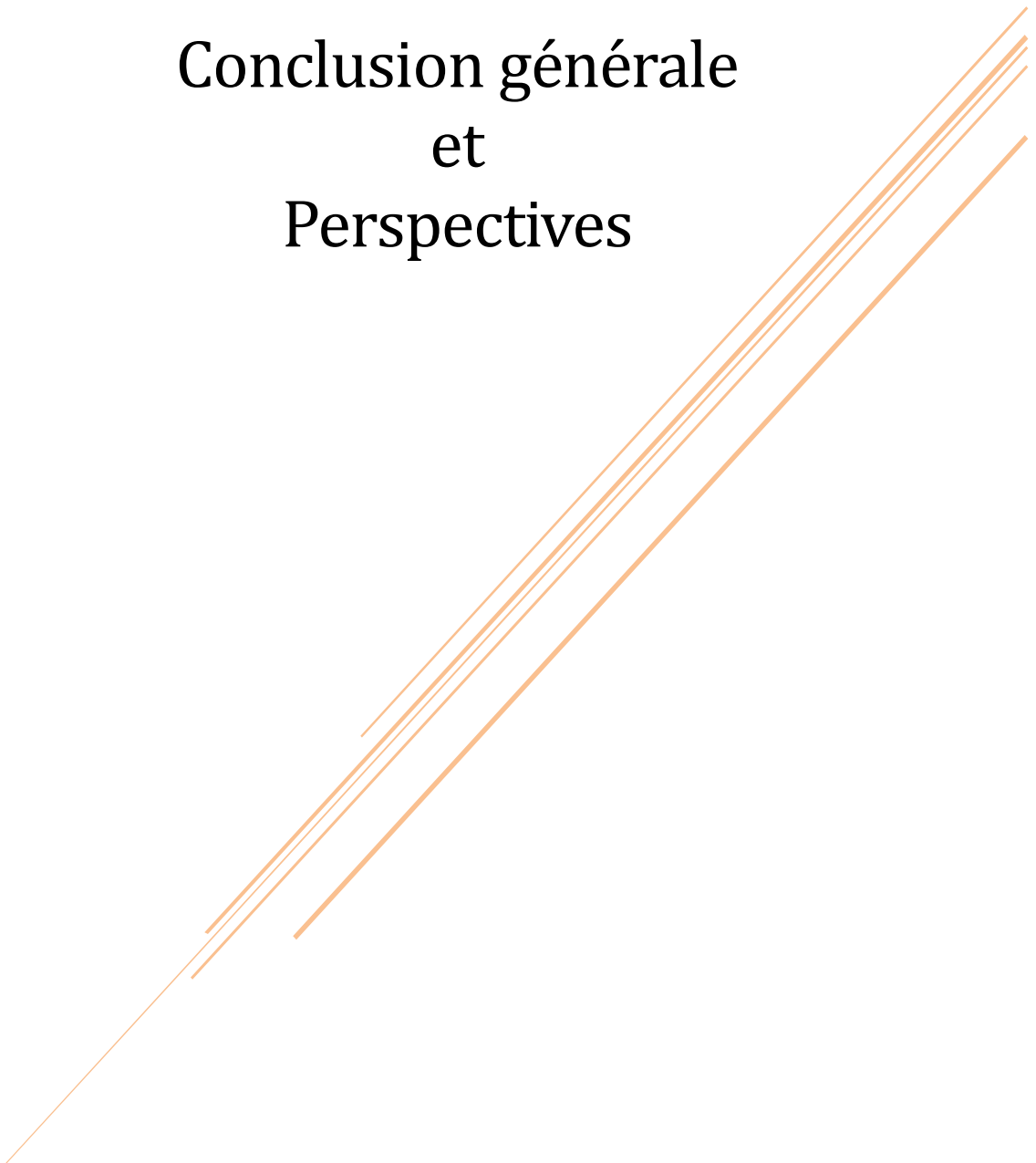
Les principaux résultats de ce chapitre sont résumés dans le [Tableau 18](#).

Tableau 18- Sommaire qualitatif des résultats des études des macrocycles effectuées *in cellulo* sur la lignée T98G.

Ligand	Cytotoxicité		Formation queue de comète ^[c]	Foyers γ -H2AX ^[d]			
	Seul ^[a]	Effet synergique ^[b]		Sans MMS		Avec MMS	
				Nombre	Intensité et taille	Nombre	Intensité et taille
2,7-BisNP-NH	+	-	-	-	-	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-BisNP-O	+++	-	- (*)	--	++	-	±
2,7-BisNP-S	++	+	- (*)	-	-	+++	-
2,7-BisNP-NMe	+++	-	-	±	++	-	±
2,7-BisNP-NNH ₂	-	-	-	--	++	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-BisNP-NOH	++	-	-	--	++	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-BisNP-O4Me ^[e]	+	+	- (*)	-	-	+++	-
2,7-BisNP-O8Me	-	-	-	--	++	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-BisNP-O4Gua	+++	-	-	--	++	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-BisNP-Im	+	-	-	--	++	-	±
1,5-BisNP-O	+++	-	-	+	-	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>
2,7-TrisNP	+++	-	-	--	++	<i>n.t.</i>	<i>n.t.</i>

[a] $GI_{50}^{T98G} \leq 1 \mu M$ (+++), $1 < GI_{50}^{T98G} \leq 2 \mu M$ (++), $2 < GI_{50}^{T98G} \leq 5 \mu M$ (+), $GI_{50}^{T98G} > 70 \mu M$ (-). [b] : effet obtenu en combinaison avec le TMZ après un traitement de 96 h. [c] (*) : formation d'une queue de comète en présence d'un agent alkylant (MMS ou TMZ). [d] comme discuté dans le Chapitre III- IV- 2. *n.t.* = non testé. [e] ligand ayant démontré la capacité à augmenter le nombre de sites abasiques présents dans l'ADN génomique en combinaison avec le MMS après un traitement de 24 h.

Conclusion générale et Perspectives



I- Conclusion

L'objectif des travaux menés était la compréhension de l'activité biologique des composés de type 2,7-BisNP, dont certains avaient été précédemment étudiés au laboratoire et avaient montré *in vitro* la capacité à inhiber indirectement l'activité d'APE1 et à cliver les sites abasiques. Une approche interdisciplinaire a ainsi été réalisée dans ce but.

Dans un premier temps, une nouvelle génération de macrocycles a été synthétisée. Cette dernière a été conçue de façon à pouvoir être divisée en deux familles de composés afin de différencier l'effet cytotoxique qui serait dû à l'inhibition enzymatique de l'effet cytotoxique qui serait lié au clivage des sites AP par les ligands. Ainsi, les ligands de la première famille ont été conçus pour préserver l'activité de clivage des sites abasiques par la présence de groupements nucléophiles (amines) tout en maintenant la capacité d'inhibition d'APE1. En revanche, les macrocycles de la deuxième famille présentent des groupements nucléophiles masqués afin de limiter leur activité de clivage via β -élimination et ne préserver que la capacité d'inhibition d'APE1.

Les études *in vitro* menées sur cette nouvelle génération de composés ont permis de mettre en valeur différentes interactions des macrocycles avec l'ADN (*Figure 90*). L'affinité et la sélectivité de ces derniers pour les sites abasiques ont ainsi été démontrées et ont été corrélées avec leur efficacité d'inhibition de l'activité de clivage d'APE1. Ces résultats ont permis de valider remarquablement la stratégie d'une inhibition indirecte du clivage des sites abasiques par APE1, impliquée dans la voie de réparation BER. De plus, dépendamment de leurs structures, certains ligands ont affiché la capacité à cliver le site abasique conduisant à la formation de produits de coupure de type β -élimination voire même également de type β,δ -élimination avec une activité dépassant très fortement celle des polyamines (activité de clivage du ligand 2,7-BisNP-S 125 fois plus importante que celle de la spermine).

Les études *in cellulo* conduites principalement sur la lignée de glioblastome T98G, ont permis dans un premier temps de mettre en évidence des différences au niveau de la cytotoxicité présentée par les macrocycles. En effet, alors que sur la lignée T98G la plupart des macrocycles présente des GI_{50} inférieures à 3 μ M, d'autres (2,7-BisNP-O8Me et 2,7-BisNP-NNH₂) affichent des GI_{50} supérieures à 70 μ M. Ces différences de cytotoxicité entre les macrocycles n'ont cependant pas pu être expliquées par leur capacité à cliver les sites abasiques *in vitro*. En effet, alors que le ligand 2,7-BisNP-O8Me notamment n'a pas démontré la capacité à cliver les sites AP, le macrocycle 2,7-BisNP-NNH₂ a présenté une vitesse de clivage importante. De plus, certains ligands n'affichant pas la capacité à cliver les sites abasiques *in vitro*, à l'image du macrocycle 2,7-BisNP-O4Gua, présente une GI_{50} parmi les plus faibles (0,7 μ M). Cette conclusion est confortée par le fait qu'aucun macrocycle clivant les sites AP *in vitro* n'affiche *in cellulo* une augmentation des coupures simple-brins et des coupures double-brins suite au test des comètes, ni une augmentation du nombre de foyers γ -H2AX, après 96 h de traitement des cellules.

De façon remarquable, les ligands 2,7-BisNP-O, 2,7-BisNP-NNH₂, 2,7-BisNP-NOH, 2,7-BisNP-O8Me, 2,7-BisNP-O4Gua et 2,7-BisNP-Im, indépendamment de leur capacité à cliver les sites AP *in vitro*, ont montré une diminution du nombre de foyers γ -H2AX accompagnée cependant d'une augmentation de l'intensité et de la taille de ces foyers. Cette observation a ainsi été attribuée à une modification potentielle de la structure de la chromatine induite par ces ligands, pouvant conduire à

l'accumulation des coupures double-brins sur une zone restreinte de l'ADN. Cependant, la diminution du nombre de foyers γ -H2AX et l'absence de dommages observées par le test des comètes n'a pas permis de conclure sur la capacité de ces macrocycles à augmenter le nombre de coupures double-brins. Ce remaniement structurel de la chromatine, en associant plusieurs régions endommagées, pourrait être lié à la formation d'interbrins et / ou de pontages entre les sites abasiques et les histones, qui se traduirait également par l'absence de modification de la taille des comètes et l'absence de recrutement de γ -H2AX aux sites de dommage.

Il est également intéressant de relever que le ligand 2,7-BisNP-NH ayant la capacité de former un adduit stable avec les produits de coupure des sites AP n'a pas présenté une cytotoxicité plus importante que la plupart des macrocycles. En effet, ce macrocycle a affiché une GI_{50} de 2,2 μ M sur la lignée T98G, supérieure à la GI_{50} du ligand 2,7-BisNP-O (0,3 μ M), macrocycle le plus cytotoxique de la même série. Hypothétiquement, ce résultat pourrait refléter l'absence de formation de cet adduit en milieu cellulaire mais également que ce dernier n'est pas présent en nombre suffisamment important pour avoir une conséquence sur la cytotoxicité induite par le macrocycle.

Dans un deuxième temps, l'effet cytotoxique de la combinaison des macrocycles avec différents agents alkylants (TMZ, MMS, BCNU) a été évalué. Les études ont permis de mettre remarquablement en évidence une augmentation de la cytotoxicité du TMZ en combinaison avec les deux macrocycles 2,7-BisNP-S et 2,7-BisNP-O4Me. L'effet combinatoire étant plus important avec ce dernier, des études plus approfondies de la combinaison de celui-ci avec les agents alkylants TMZ et MMS ont été menées et ont ainsi permis de mettre en évidence un effet synergique entre les composés, principalement sur la lignée de glioblastome T98G. Cependant, de façon intéressante, ce macrocycle n'a affiché aucun effet synergique avec la BCNU, ni avec les radiations ionisantes qui induisent des dommages à l'ADN différents que le TMZ et le MMS. Cette constatation suggère de ce fait une spécificité du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me pour le type de lésions engendrées suite aux agents méthylants.

Enfin, la visualisation *in cellulo* de l'analogue 2,7-BisNP-NH au sein des noyaux des cellules a permis de valider l'ADN comme cible biologique du ligand. Confortant ce résultat, l'augmentation du nombre de sites abasiques au sein des cellules T98G traitées en combinaison avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me et le MMS a été remarquablement mise en évidence. De plus, l'étude par test des comètes et l'étude des foyers γ -H2AX au sein des cellules traitées en combinaison avec ce dernier et les agents méthylants ont permis de montrer l'augmentation des coupures au sein de l'ADN génomique. Ces différentes données suggèrent ainsi qu'en inhibant la réparation des sites abasiques formés suite à l'action des agents méthylants, le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me permet alors la mise en place de processus secondaires conduisant à la formation de lésions fortement cytotoxiques dont notamment les coupures double-brins. Ces résultats expliqueraient ainsi l'augmentation observée de la cytotoxicité du MMS et du TMZ par le ligand. Enfin, il est intéressant de relever que les conclusions établies avec le ligand 2,7-BisNP-O4Me peuvent également potentiellement être transposées au ligand 2,7-BisNP-S. En effet, ce dernier a affiché une augmentation des dommages à l'ADN par test des comètes ainsi qu'une augmentation du nombre de foyers γ -H2AX comparables au macrocycle 2,7-BisNP-O4Me.

Pour finir, de façon intéressante, les études ont montré que les résultats positifs obtenus *in vitro* (forte sélectivité, forte inhibition d'APE1, activité de clivage des sites AP) ne sont pas toujours le

reflet de l'activité et de la cytotoxicité des composés *in cellulo*. En effet, les études *in vitro* ne permettent pas d'anticiper les éventuelles cibles secondaires ou les problèmes liés à la pénétration des composés pouvant ainsi détourner les propriétés des composés déterminées *in vitro*.

Pour conclure, les différentes études menées tout au long de ce projet doctoral ont permis de mettre en valeur le potentiel des macrocycles de type 2,7-BisNP comme très bon ligand des sites abasiques. La stratégie alors mise en place, consistant en la détermination d'un inhibiteur d'APE1 en ciblant les sites abasiques, a abouti remarquablement à la mise en évidence de deux nouvelles molécules. Parmi celles-ci, le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me a affiché un effet synergique avec les agents méthylants très prometteur dans le but de sensibiliser les cellules notamment dans le cadre de la chimiothérapie. Le potentiel de ce dernier, bien supérieur à celui des meilleurs inhibiteurs décrits dans la littérature, fait ainsi du macrocycle 2,7-BisNP-O4Me une molécule de fort intérêt thérapeutique.

II- Perspectives

Pour compléter la présente étude, il serait intéressant d'analyser le cycle cellulaire suivant le traitement avec les agents alkylants en présence des macrocycles. Un blocage ou une perturbation du cycle cellulaire permettrait de comprendre le mécanisme d'action de ces derniers. En effet, un blocage empêcherait la cellule de procéder à son cycle et donc de se diviser. Une perturbation du cycle cellulaire en phase S, par exemple, empêcherait la cellule de réparer efficacement ses lésions et conduirait alors à la mort cellulaire. Ainsi il serait aussi nécessaire de déterminer si les cellules rentrent en apoptose ou en senescence afin de comprendre si la diminution de la viabilité des cellules traitées avec les ligands est la conséquence du blocage de la réplication ou de la mort des cellules. De plus, bien que la localisation de l'analogue 2,7-BisNP-NH ait été visualisée *in cellulo* par nanoSIMS, la même étude effectuée cependant avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me pourrait également être intéressante afin de conforter la cible biologique de ce ligand d'intérêt (travail en cours au laboratoire).

Afin d'exploiter la combinaison du ligand 2,7-BisNP-O4Me et des agents méthylants aboutissant à l'inhibition de l'activité d'APE1, il serait intéressant d'évaluer la cytotoxicité de la combinaison d'un agent méthylant avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et un inhibiteur de PARP. En effet, les PARP sont impliquées majoritairement au sein de la voie BER dans la réparation des coupures simple-brins (*Figure 3*), étape successive à l'action d'APE1. Ainsi, dans l'hypothèse où le macrocycle inhibe la réparation des sites abasiques par APE1 *in cellulo*, la présence de l'inhibiteur de PARP ne devrait pas avoir de conséquences sur la cytotoxicité, les coupures simple-brins n'étant pas formées. Cependant, les PARP sont aussi impliquées dans les voies de réparation HR et NHEJ, ainsi un effet combinatoire pourrait également être observé suggérant alors que les cassures d'ADN engendrées suite aux traitements combinés des agents alkylants et du ligand 2,7-BisNP-O4Me sont prises en charge par d'autres voies de réparation. Ainsi, dans le cas où un effet synergique serait mis en évidence, ce dernier présenterait également un fort intérêt thérapeutique.

De plus, la résistance des cellules T98G au TMZ a notamment été attribuée à l'expression de MGMT conduisant à la réparation directe de la base endommagée O⁶-méthylguanine. Le ligand 2,7-BisNP-O4Me, permettant la sensibilisation de cette lignée à cet agent alkylant malgré l'expression de MGMT, il serait intéressant d'envisager un traitement des cellules T98G avec le TMZ en combinaison avec le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et d'un inhibiteur de MGMT comme par exemple la O⁶-

benzylguanine, connue dans la littérature.⁶² En effet, en bloquant les deux voies de réparation principalement impliquées dans la résistance au TMZ (*Figure 14*), la combinaison des deux inhibiteurs pourrait induire une forte sensibilisation des cellules à la toxicité du TMZ, ce qui pourrait permettre de réduire drastiquement la dose en TMZ utilisée dans le cadre d'un traitement par chimiothérapie et conduire à la diminution des effets secondaires chez les patients.

Parmi les limitations bien connues des traitements ciblant le glioblastome, la capacité des composés à traverser la barrière hémato-encéphalique en est l'une des principales. Ainsi, bien que le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me permette de potentialiser la cytotoxicité du témozolomide, l'absence de pénétration de la barrière hémato-encéphalique par le ligand pourrait réduire drastiquement son intérêt thérapeutique. Cependant des nanoparticules fonctionnalisées, contenant du témozolomide et un inhibiteur des protéines bromodomains BET impliquées dans les voies de signalisation des dommages à l'ADN, ont déjà été décrites pour leur capacité à traverser efficacement la barrière hémato-encéphalique conduisant alors à une forte diminution de la tumeur cérébrale par comparaison à l'utilisation des composés non encapsulés.³⁰⁵ Basé sur ces résultats, le développement de nanoparticules encapsulant le macrocycle 2,7-BisNP-O4Me et le témozolomide pourrait être envisagé afin de contourner le manque de pénétration du ligand.

Enfin, les propriétés des macrocycles mises en évidence *in vitro* pourraient également être exploitées pour différentes finalités. Tout d'abord, la bonne affinité et la sélectivité des macrocycles 2,7-BisNP pour les sites abasiques pourraient être utilisées afin de vectoriser préférentiellement au niveau de ces sites de lésions des agents endommageant l'ADN. Hypothétiquement, la localisation au niveau des sites abasiques d'agents induisant des coupures double-brins et / ou des pontages intra- et interbrins pourrait permettre de potentialiser la cytotoxicité des agents alkylants en augmentant la quantité de dommages à l'ADN. De façon intéressante, la structure moléculaire des macrocycles permet l'introduction de substituants notamment au niveau des chaînes polyamines. Ainsi, la synthèse de composés hybrides comme par exemple des complexes de type cisplatine – macrocycle 2,7-BisNP pourrait être envisagée dans ce but (*Figure 126*). En effet, le cisplatine est bien connu pour sa forte cytotoxicité en conduisant à la formation de pontages intrabrins notamment au sein de l'ADN, ce qui entraîne alors des distorsions au niveau de la double hélice d'ADN.³⁰⁶

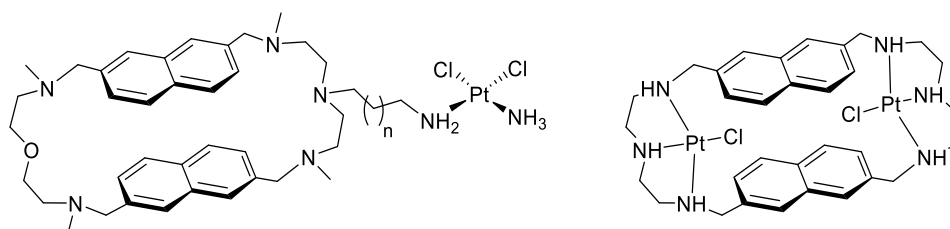


Figure 126- Exemples de complexes hybrides de type cisplatine – macrocycle 2,7-BisNP.

La formation d'un adduit stable entre le macrocycle 2,7-BisNP-NH et son produit de coupure de type β -élimination a également été remarquablement mis en évidence *in vitro*, ouvrant la voie à de nouvelles applications comme la détection, la quantification ou encore le marquage sélectif des sites abasiques. La majorité des méthodes de détection décrites dans la littérature ou utilisées dans les kits se base sur la réactivité des fonctions aldéhydes présentées par les sites AP avec une sonde ARP de type oxyamine. Ces dernières n'affichent cependant pas de sélectivité et réagissent avec toutes les fonctions aldéhydes présentes dans l'ADN. Ainsi, ces méthodes de détection ne permettent pas

de différencier les sites AP et les bases de type 5-formylcytosine (5-fC) ou 5-formyluracil (5-fU) (*Figure 127*).^{307,308} Le développement de méthodes permettant la détection sélective des sites AP est ainsi nécessaire. De façon très intéressante, l'adduit ADN – ligand 2,7-BisNP-NH présente l'avantage de n'être formé que suite au clivage du site AP (via β -élimination) par le ligand, ce qui permettrait ainsi de cibler sélectivement les sites abasiques.

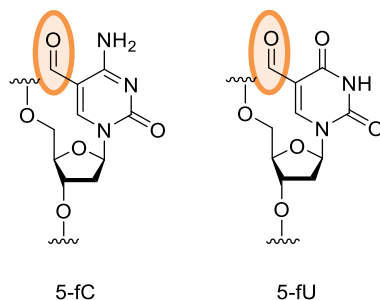


Figure 127- Structure des bases de type 5-formylcytosine (5-fC) et 5-formyluracil (5-fU). Les fonctions aldéhydes réagissant avec les sondes ARP sont entourées en orange.

De plus, il a très récemment été décrit une méthode permettant de localiser dans le génome les sites abasiques.³⁰⁹ Cette dernière est basée sur la réactivité de la fonction amine présentée par le composé **309.1** avec les groupements aldéhydes au sein de l'ADN (*Figure 128*). La fonction alcyne du composé permet dans un deuxième temps le marquage avec une biotine de tous les sites réactifs de type aldéhyde au sein de l'ADN, étape nécessaire à leur isolation. Puis un traitement en condition basique conduit au clivage de l'ADN par β -élimination spécifiquement au niveau des sites abasiques. Le séquençage (NGS) des fragments d'ADN permet alors de déterminer la location des sites AP.

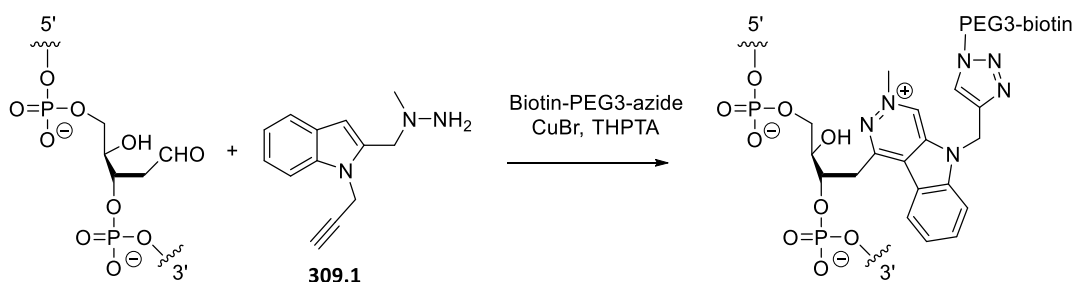


Figure 128- Principe de la sonde développée pour le séquençage sélectif des sites abasiques par Balasubramanian et al.³⁰⁹

De façon similaire, le macrocycle 2,7-BisNP-NH pourrait ainsi être exploité dans le but de développer une méthode de séquençage des sites AP dans l'ADN (AP-Seq). En effet, un dérivé de ce dernier porteur d'une fonction alcyne pourrait par exemple être synthétisé (*Figure 129*). Celui-ci présenterait l'avantage de cibler directement les sites abasiques, sans présélectionner tous les sites réactifs présentant une fonction aldéhyde, et permettrait de s'affranchir du traitement en condition basique en clivant directement le site AP. Puis à l'instar de la sonde développée par Balasubramanian, la fonction alcyne présentée par le dérivé du macrocycle 2,7-BisNP-NH servirait dans un second temps au marquage des sites AP avec une biotine par exemple, permettant ainsi leur séquençage.

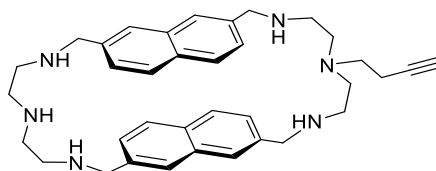


Figure 129- Exemple de dérivé du macrocycle 2,7-BisNP-NH pouvant servir au séquençage des sites AP.

Pour finir, nos études ont permis de mettre en évidence l'inhibition de l'activité d'APE1 par les macrocycles *in vitro*. Cependant, il a été mis en évidence que les résultats obtenus *in vitro* ne reflètent pas toujours l'activité des composés *in cellulo*. Ainsi il serait intéressant de développer une technique permettant d'étudier l'inhibition d'APE1 directement au sein des cellules. Similairement aux méthodes nouvellement développées pour étudier différentes activités enzymatiques *in cellulo*,^{310,311} cette dernière pourrait consister à traiter tout d'abord les cellules avec les présumés inhibiteurs (Figure 130). Puis dans un second temps, le substrat d'APE1 c'est-à-dire un oligonucléotide porteur d'un fluorophore en 5' sur un brin et d'un extincteur de fluorescence en 3' sur le brin complémentaire, pourrait être introduit au sein des cellules par électroporation ou transfection par exemple. Basé sur le même principe que l'étude de l'inhibition enzymatique *in vitro*, le clivage de l'oligonucléotide par l'enzyme APE1 endogène entraînerait une augmentation de la fluorescence qui pourrait alors être suivie par microscopie à épifluorescence. Cette augmentation serait alors limitée dans le cas d'une inhibition du clivage enzymatique par les composés.

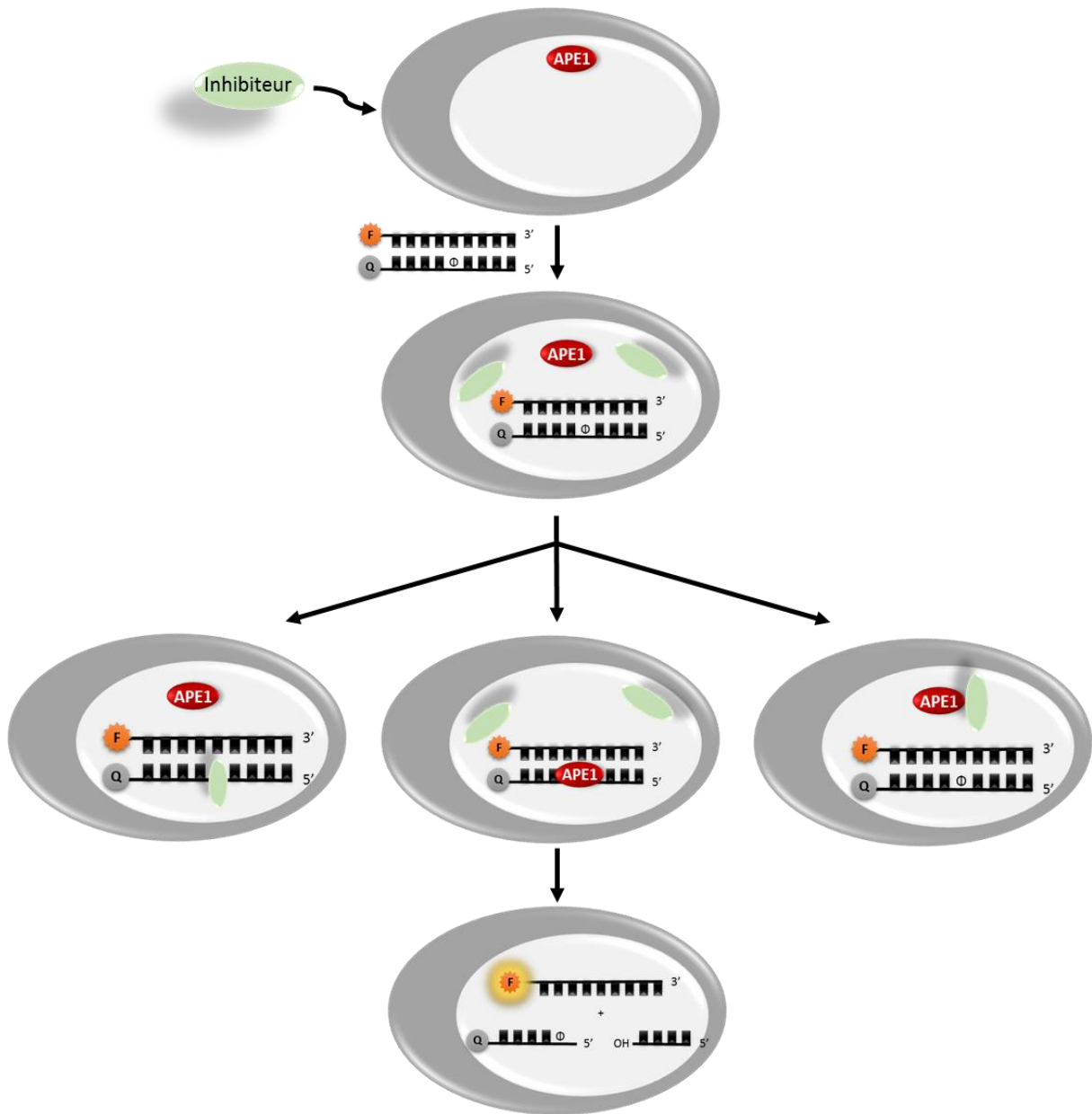
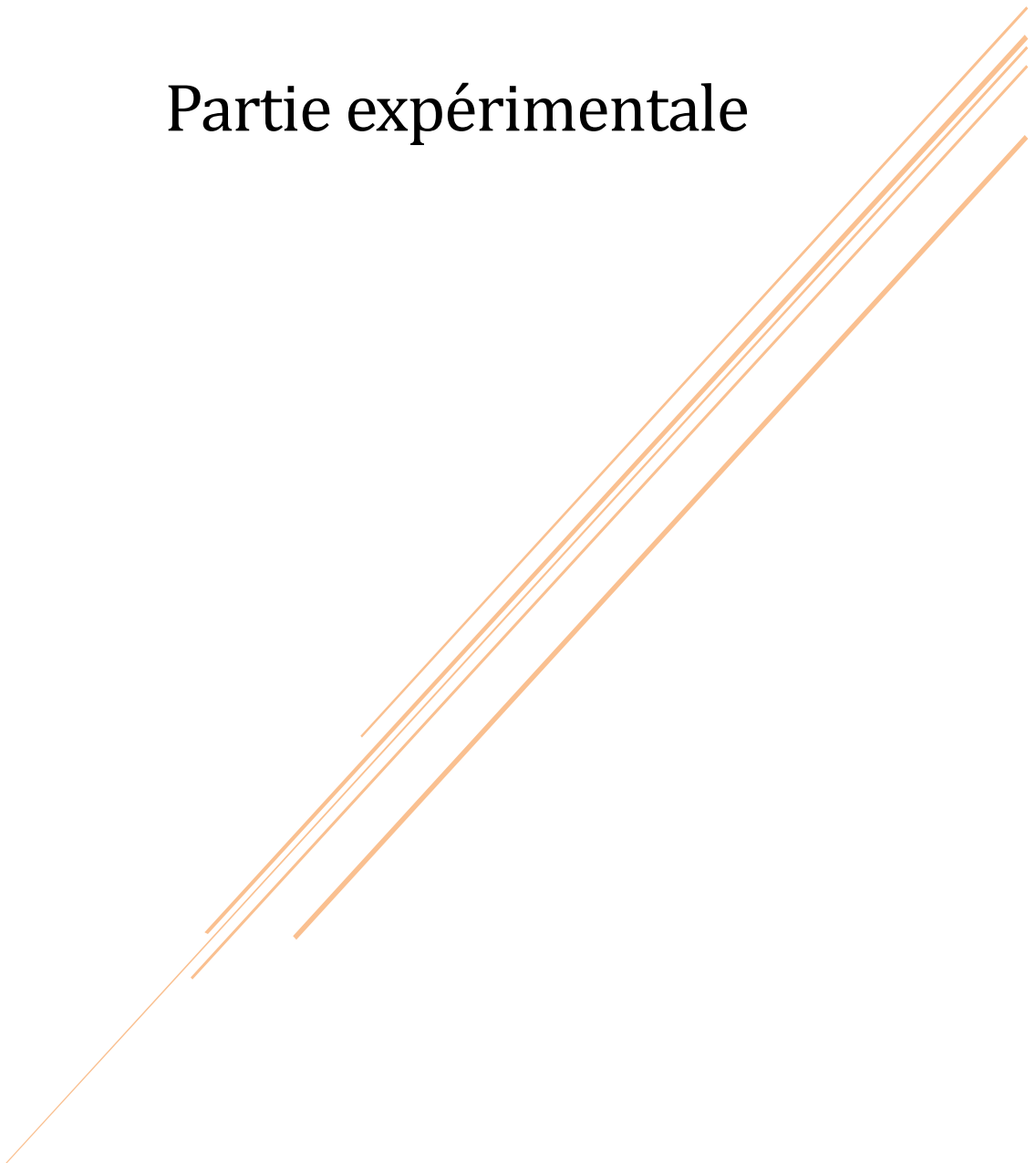


Figure 130- Principe de l'évaluation de l'inhibition de l'activité d'APE1 *in cellulo*.

Partie expérimentale

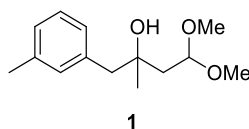


I- Synthesis

General remarks:

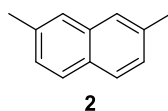
All commercially available chemicals were reagent grade and used without further purification. Potassium phthalimide (^{15}N , 98%+) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. NMR spectra were measured with a Bruker Avance 300 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz) spectrometer at 25 °C ; chemical shifts are given in ppm (δ) values. Multiplicities of ^{13}C NMR signals were determined from DEPT-135 experiments. The melting points were determined in open-end capillaries with a digital melting point instrument (SMP30, Stuart). Elemental microanalysis of all novel compounds was performed by the *Service de Microanalyse*, CNRS–ICSN, Gif-sur-Yvette, France. Mass spectra (ESI in the positive-ion mode) were recorded with a Waters ZQ instrument. The synthesis of naphthalenophanes 1,5-BisNP-O \times 4 HCl²²² and 2,7-TrisNP \times 6 HCl²²⁷ was described elsewhere.

4,4-Dimethoxy-2-methyl-1-(m-tolyl)butan-2-ol (1):²²⁶



Under an argon atmosphere, anhydrous diethyl ether (200 mL) was added to magnesium turnings (8.84 g, 363 mmol) at room temperature. To the suspension, 3-methylbenzyl chloride (48 mL, 51 g, 363 mmol) was added dropwise during 60 min followed by addition dropwise of 4,4-dimethoxy-2-butanone (46.2 mL, 45.7 g, 346 mmol) in anhydrous diethyl ether (70 mL) at 0 °C during 90 min. The resulting mixture was heated under reflux for 3 h. After cooling to room temperature, the suspension was added to a mixture of saturated NH_4Cl solution (235 mL) and ice water (175 mL). The aqueous phase was extracted with diethyl ether (3 x 200 mL) and the combined organic layers were washed with water (100 mL), dried over MgSO_4 , filtered and dried *in vacuo*, to give the product **1** as a yellow oil (67.5 g, 283 mmol, 78%) which was employed in next step without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.19 (s, 3H), 1.80 (dd, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.33 (d, 3H, $J = 5.7$ Hz), 2.75 (d, 2H), 3.34 (d, 6H), 4.68 (t, 1H), 7.04 (m, 3H), 7.17 (m, 1H).

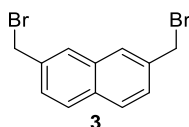
2,7-Dimethylnaphthalene (2):²²⁶



Compound **1** (55.8g, 234.1 mmol) was dissolved in acetic acid (174 mL) and sulfuric acid (17.6 mL, 32.4 g, 330 mmol) was added over 10 min. The resulting mixture was refluxed for 1 h and, after cooling at 40 °C, the solvent was evaporated. The residue was poured into ice water (500 mL) and extracted with diethyl ether (5 x 200 mL). The organic phases were combined, washed with water (200 mL), a saturated NaHCO_3 solution (200 mL), a saturated NaCl solution (200 mL), dried over MgSO_4 , filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was dissolved in a mixture DCM / pentane (50:50, 100 mL), filtered through celite (10 cm) and the filter cake was washed carefully with

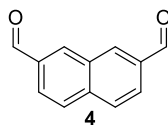
pentane. The filtrate was evaporated and the resulting solid was recrystallized using ethanol (80 mL) to give the product **2** as a white powder (15.8 g, 101.1 mmol, 43%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.49 (s, 3H), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz).

2,7-Bis(bromomethyl)naphthalene (**3**):³¹²



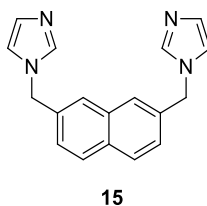
A solution of 2,7-dimethylnaphthalene **2** (15.6 g, 100 mmol) in CCl_4 (312 mL) was heated at 100 °C, and mixture of *N*-bromosuccinimide (39.2 g, 220 mmol) and benzoyl peroxide (312 mg, 1.3 mmol) was added. The resulting mixture was heated at 100 °C for 3 h and after cooling to room temperature, the solution was filtered and the residue was washed with DCM (5 x 30 mL). The filtrate was washed with ice water (3 x 200 mL) and with a saturated NaCl solution (200 mL). The combined organic layers were dried over MgSO_4 , evaporated *in vacuo* and the resulting solid was recrystallized using a mixture of cyclohexane (40 mL) and CHCl_3 (50 mL) to give the product **3** as a light – yellow powder (16.2 g, 52 mmol, 52%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 4.66 (s, 2H), 7.52 (dd, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H).

Naphthalene-2,7-dicarbaldehyde (**4**):



A solution of 2,7-bis(bromomethyl)naphthalene **3** (14.0 g, 44.5 mmol) and NaHCO_3 (37.9 g, 451 mmol) in anhydrous DMSO (125 mL) was heated at 100 °C during 4 h under argon atmosphere. The resulting mixture was cooled to room temperature, and water (200 mL) was added. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 230 mL). The organic phases were combined, washed with water, dried with MgSO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography (SiO_2 ; eluent: using 0 to 20 % AcOEt in cyclohexane), to give the product **4** as a light – yellow powder (4.63 g, 25.1 mmol, 57%), m.p. 142–143 °C (lit.²²² 145–146 °C). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.13 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.52 (s, 2H), 10.22 (s, 2H); MS (ESI^+): m/z (%) 185.1 (100) [$M + \text{H}$] $^+$.

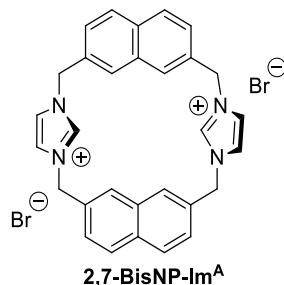
2,7-Bis((imidazol-1-yl)methyl)naphthalene (**15**):



To a solution of 2,7-bis(bromomethyl)naphthalene **3** (1.57 g, 5 mmol) in MeOH (100 mL), imidazole (3.40 g, 50 mmol) was added. The resulting mixture was heated under reflux for 24 h. The solvent was evaporated under reduced pressure and aq. K_2CO_3 (6%, 100 mL) was added. The yellow

precipitate was collected and flash-chromatographed using gradient elution (SiO₂; eluent: 0 to 10% MeOH in CH₂Cl₂), to give the product as a yellow powder (640 mg, 2.20 mmol, 44%), mp 139.1–146.2 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 5.28 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.29 (d, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.83 (d, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 50.9 (CH₂), 125.5 (CH), 126.2 (CH), 128.8 (CH), 130.1 (CH), 132.6 (C_q), 133.2 (C_q), 134.6 (C_q); MS (ESI⁺): *m/z* (%) 289.2 (100) [*M* + H]⁺.

1,5(1,3)Diimidazolia-3,7(2,7)dinaphthalenacyclooctaphane dibromide (2,7-BisNP-Im^A, 2 Br⁻):

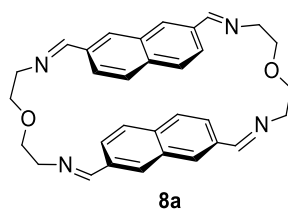


To a solution of compound **15** (157 mg, 0.54 mmol) in acetonitrile (50 mL), 2,7-bis(bromomethyl)naphthalene **3** (171 mg, 0.54 mmol) was added. The resulting mixture was heated under reflux for 24 h and a white precipitate appeared. After cooling to room temperature, the precipitate was collected, washed with acetonitrile and ether, and recrystallized from MeOH–H₂O to give the product as a white solid (87.1 mg, 0.14 mmol, 79%). ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): δ 5.76 (s, 4H), 7.34 (s, 2H), 7.66 (dd, 2H), 7.98 (s, 2H), 8.05 (d, 2H), 9.57 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 51.8 (CH₂), 123.9 (CH), 124.0 (CH), 126.1 (CH), 128.5 (CH), 132.1 (C_q), 133.0 (C_q), 134.6 (C_q), 137.7 (CH); MS (ESI⁺): *m/z* (%): 441.0 (12) [*M* – H]⁺, 221.2 (100) [*M*]²⁺; anal. calcd. for C₃₀H₂₆Br₂N₄ × 1.25 H₂O (624.88): C, 57.66; H, 4.6; N, 8.97; found: C, 57.63; H, 4.39; N, 8.75.

General procedure for the synthesis of macrocyclic tetraimine intermediates (8a–f):

A solution of the corresponding diamine (1.0 mmol) in MeCN (60 mL; in the case of a poorly soluble *N,N*-bis(2-aminoethyl)aminopropan-1-ol (**12**), 4 mL of MeOH were used as a co-solvent) was added at room temperature dropwise, within 3 h, to a vigorously stirred solution of **4** (1.0 mmol) in MeCN (60 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5–7 days. The formed precipitate was collected, washed with MeCN and dried *in vacuo*, to give the corresponding macrocyclic tetraimine **8a–f**.

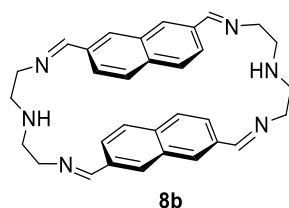
6,16-Dioxa-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8a):²²²



Product **8a** was obtained in a 91% yield through reaction of **4** with 1,5-diamino-3-oxapentane. White powder, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.78–3.88 (m, 4H), 7.01 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.98 (dd,

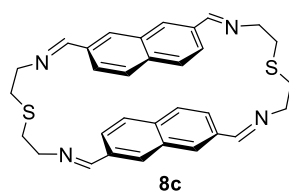
$J = 8.5$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H). ^{13}C NMR could not be obtained because of the poor solubility of the compound.

3,6,9,13,16,19-Hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8b):²²²



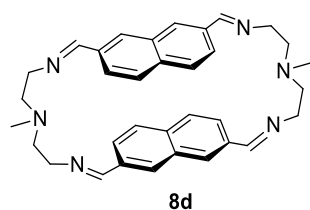
Product **8b** was obtained in a 92% yield through reaction of **4** with diethylenetriamine. White powder, ^1H NMR was difficult to exploit due to the formation of several isomers, in accordance with literature data.^{313,314}

6,16-Dithia-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8c):²²²



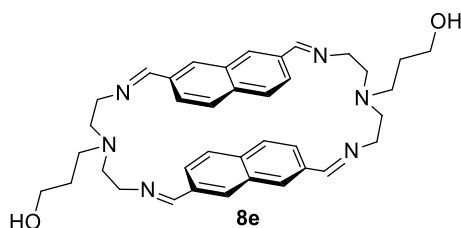
Product **8c** was obtained in 92% yield through reaction of **4** with 2,2'-thiobis(ethan-1-amine). Light-yellow powder. ^1H NMR could not be obtained due to the poor solubility of the compound.

6,16-Dimethyl-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8d):



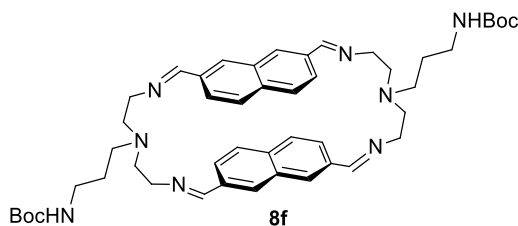
Product **8d** was obtained in a 92% yield through reaction of **4** with 2,2'-diamino-*N*-methyl-diethylamine. White powder, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.34 (s, 3H), 2.82 (t, 4H), 3.71 (t, 4H), 6.82 (s, 2H), 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.09 (s, 2H), 8.16 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2H). ^{13}C RMN could not be obtained because of the poor solubility of the compound.

6,16-Bis(3-hydroxypropyl)-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8e):



Product **8e** was obtained in a 52% yield through reaction of **4** with *N,N*-bis(2-aminoethyl)-aminopropan-1-ol **12**. Light – yellow powder, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.75–1.78 (m, 4H), 2.75–2.78 (m, 4H), 2.89–2.91 (m, 8H), 3.73 (br s, 8H), 3.82–3.83 (m, 4H), 6.76 (s, 4H), 7.77 (d, 4H), 8.01–8.06 (m, 8H). ^{13}C RMN could not be obtained because of the poor solubility of the compound.

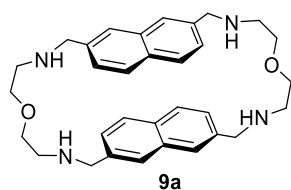
6,16-Bis(3-(tert-butoxycarbonyl)aminopropyl)-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane-2,9,12,19-tetraene (8f):



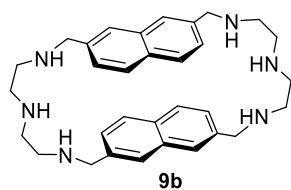
Product **8f** was obtained in a 54% yield through reaction of **4** with *tert*-butyl *N*-{3-[bis(2-aminoethyl)-amino]propyl}carbamate.³¹⁵ White powder, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.35 (s, 18H), 1.55–1.57 (m, 4H), 2.48 (t, 4H), 2.84–2.87 (m, 8H), 3.04–3.06 (m, 4H), 3.67 (br s, 8H), 4.76 (br s, NH), 6.78 (s, 4H), 7.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 8.07 (s, 4H), 8.17 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H). ^{13}C RMN could not be obtained because of the poor solubility of the compound.

General procedure for the synthesis of polyazamacrocycles:

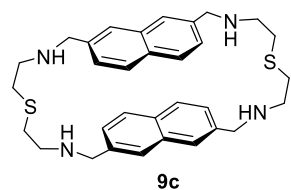
To a suspension of the tetraimine intermediate (0.18 mmol) in a mixture of CH_2Cl_2 (3.5 mL) and MeOH (1.5 mL), NaBH_4 (104 mg, 2.76 mmol) was added in one portion. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and the solvents were removed under reduced pressure. To the residue, aq. NaOH (1 M, 30 mL) was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with saturated K_2CO_3 solution (20 mL), dried with anhyd. K_2CO_3 and evaporated *in vacuo*. The residue was flash-chromatographed using gradient elution with NH_4OH (SiO_2 ; eluent : CH_2Cl_2 / MeOH / aq. NH_4OH , 80:20:2 to 80:20:4), to give the macrocyclic polyamine as a free base. Novel macrocycles were fully characterized as hydrochloride salts.

6,16-Dioxa-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-O).²²²

Product **9a (2,7-BisNP-O)** was obtained from **8a** in a 98% yield. White powder, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.84 (t, 2H), 3.59 (t, 2H), 3.90 (s, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.63–7.65 (s + d, 2H). **2,7-BisNP-O x 4 HCl**: The free-base macrocycle (350 mg, 0.68 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 15 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 3.2 mL) was added, and a precipitate has formed immediately. The volatiles were removed *in vacuo*, and the residue was recrystallized from 0.5 M aq. HCl, to give **2,7-BisNP-O x 4 HCl** (448 mg, 0.68 mmol, quant. yield) as a white amorphous solid. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.46 (t, *J* = 4.5 Hz, 8H), 3.92 (t, *J* = 4.5 Hz, 8H), 4.42 (s, 8H), 7.66 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, 4H), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 8.12 (d, *J* = 1.5 Hz, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 49.2 (CH₂), 52.8 (CH₂), 67.0 (CH₂), 129.1 (CH), 129.8 (CH), 130.8 (C_q), 131.4 (CH), 134.1 (C_q), 134.9 (C_q).

3,6,9,13,16,19-Hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-NH).²²²

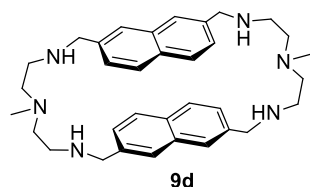
Product **9b (2,7-BisNP-NH)** was obtained from **8b** in a 99% yield. White powder, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.72 (m, 4H), 3.89 (s, 2H), 7.38 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H). **2,7-BisNP-NH x 6 HCl**: The free-base macrocycle (350 mg, 0.68 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 15 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 3.2 mL) was added, and a precipitate has formed immediately. The volatiles were removed *in vacuo*, and the residue was purified by recrystallization from MeOH – 1 M aq. HCl, to give **2,7-BisNP-NH x 6 HCl** (494 mg, 0.68 mmol, quant. yield) as white powder. ¹H NMR (300 MHz, 0.01 M DCl in D₂O): δ 3.44 (t, *J* = 6.0 Hz, 8H), 3.53 (t, *J* = 6.0 Hz, 8H), 4.51 (s, 8H), 7.62 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, 4H), 8.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 4H), 8.09 (s, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, 0.01 M DCl in D₂O): δ 42.6 (CH₂), 44.4 (CH₂), 52.1 (CH₂), 128.5 (CH), 128.7 (C_q), 129.9 (CH), 131.1 (CH), 133.1 (C_q), 134.2 (C_q).

6,16-Dithia-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-S).²²²

Product **9c (2,7-BisNP-S)** was obtained from **8c** in a 98% yield. Colorless oil, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.63 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (s,

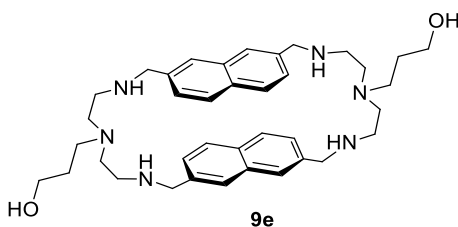
1H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H). **2,7-BisNP-S x 4 HCl**: The free-base macrocycle (281 mg, 0.52 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 11.5 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 2.4 mL) was added, and a precipitate has formed immediately. The volatiles were removed *in vacuo*, and the residue was recrystallized from EtOH – 0.5 M aq. HCl, to give **2,7-BisNP-S x 4 HCl** (286 mg, 0.52 mmol, quant. yield) as fine white needles. ^1H NMR (300 MHz, 0.01 M DCl in D_2O): δ 2.63 (t, $J = 5$ Hz, 8H), 3.10 (t, $J = 5$ Hz, 8H), 4.11 (s, 8H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 8.04 (s, 4H), 8.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H) ; ^{13}C NMR (75MHz, 0.01 M DCl in D_2O): δ 26.7 (CH_2), 45.2 (CH_2), 50.8 (CH_2), 128.6 (C_q), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 130.9 (CH), 133.0 (C_q), 134.0 (C_q).

6,16-Dimethyl-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-NMe):



Product **9d (2,7-BisNP-NMe)** was obtained from **8d** in a 76% yield. White powder, ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.20 (s, 3H), 2.48 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz), 2.73 (t, $J = 5.7$ Hz, 4H), 3.86 (s, 4H), 7.36 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.49 (s, 2H), 7.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H). **2,7-BisNP-NMe x 6 HCl**: The free-base macrocycle (269 mg, 0.5 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 15 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 3.13 mL) was added, and a precipitate has formed immediately. The volatiles were removed *in vacuo*, and the residue was recrystallized from 0.5 M aq. HCl, to give **2,7-BisNP-NMe x 6 HCl** (476 mg, 0.58 mmol, quant. yield) as a colorless crystalline solid. ^1H NMR (300 MHz, 0.01 M DCl in D_2O): δ 2.88 (s, 3H), 3.52 (s, 8H), 4.47 (s, 4H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.06 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.10 (s, 2H) ; ^{13}C NMR (75 MHz, 0.01 M DCl in D_2O): δ 41.4 (CH_3), 41.8 (CH_2), 51.9 (CH_2), 52.5 (CH_2), 128.5 (CH), 128.9 (C_q), 129.9 (CH), 130.9 (CH), 133.1 (C_q), 134.1 (C_q) ; MS (ESI $^+$): m/z (%) 539.5 (100) [$M + \text{H}$] $^+$; anal. calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{Cl}_6 \times 3.5 \text{H}_2\text{O}$ (820.6): C, 49.76 ; H, 7.25 ; N, 10.24 ; found C, 49.60 ; H, 7.03 ; N, 10.24.

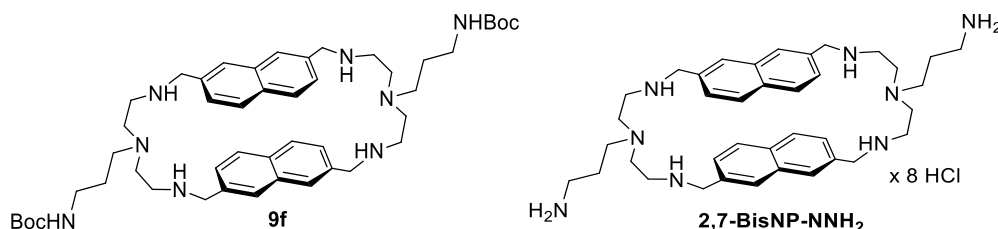
6,16-Bis(3-hydroxypropyl)-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-NOH):



Product **9e (2,7-BisNP-NOH)** was obtained from **8e** in a 28% yield. Yellow oil, ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.76 (br s, 2H), 2.70–2.76 (m, 6H), 2.92–2.96 (m, 4H), 3.62 (t, 2H), 3.90 (s, 4H), 7.30–7.38 (m, 2H), 7.43–7.48 (m, 2H), 7.59–7.70 (m, 2H). **2,7-BisNP-NOH x 6 HCl**: The free-base macrocycle (31.9 mg, 0.05 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 1.2 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 0.25 mL) was added, and the solution was stirred until the hydrochloride salt precipitated. The volatiles were removed under reduced pressure, to give **2,7-BisNP-NOH x 6 HCl**

(30.8 mg, 0.04 mmol, 71%) as a white powder. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 1.63 (quin, 2H), 2.58 (t, 2H), 2.81 (t, 4H), 3.16 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 3.52 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 4.17 (s, 4H), 7.51 (d, 2H), 7.89 (s, 2H), 7.99 (d, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ 26.0 (CH_2), 41.6 (CH_2), 48.5 (CH_2), 50.8 (CH_2), 51.2 (CH_2), 58.8 (CH_2), 127.8 (CH), 128.2 (C_q), 129.1 (CH), 130.2 (CH), 132.3 (C_q), 133.3 (C_q); MS (ESI $^+$): m/z (%) 627.5 (40) [$M + \text{H}$] $^+$; anal. calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{Cl}_6\text{N}_6\text{O}_2 \times 3.8 \text{ H}_2\text{O}$ (914.04): C, 49.93; H, 7.45; N, 9.19; O, 10.15; found: C, 50.06; H, 7.16; N, 8.89; O, 9.88.

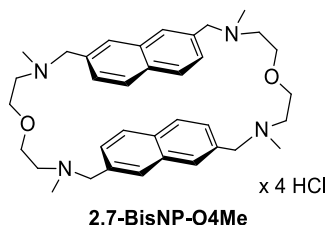
6,16-Bis(3-(tert-butoxycarbonyl)aminopropyl)-3,6,9,13,16,19-hexaaza-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-NNHBoc) and 2,7-BisNP-NNH₂:



Product **9f (2,7-BisNP-NNHBoc)** was obtained from **8f** in a 67% yield. Colorless oil, $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 1.41 (s, 9H), 1.66 (br s, 2H), 2.40 (t, 2H), 2.52 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 2.69 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 3.07–3.08 (m, 2H), 3.86 (s, 4H), 5.85 (br s, NH), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.47 (s, 2H), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H).

2,7-BisNP-NNH₂ × 8 HCl: The free-base macrocycle (149 mg, 0.18 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 4 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 0.8 mL) was added, and the solution was stirred until the hydrochloride salt precipitated. The volatiles were removed under reduced pressure, and the residue was purified by recrystallization from EtOH–H₂O to give **2,7-BisNP-NNH₂ × 8 HCl** as a white solid (87.7 mg, 0.10 mmol, 53%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 1.90–2.01 (m, 2H), 2.90–3.03 (m, 4H), 3.13 (t, 4H), 3.29 (m, 4H), 4.22 (s, 4H), 7.51 (d, 2H), 7.96–7.99 (s + d, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, D_2O): δ 22.0 (CH_2), 37.0 (CH_2), 42.5 (CH_2), 48.2 (CH_2), 50.1 (CH_2), 50.7 (CH_2), 127.9 (CH), 128.4 (C_q), 129.2 (CH), 130.2 (CH), 132.4 (C_q), 133.3 (C_q); MS (ESI $^+$): m/z (%) 625.7 (65) [$M + \text{H}$] $^+$; anal. calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{Cl}_8\text{N}_8 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (988.65): C, 46.17; H, 7.34; N, 11.33; found: C, 46.47; H, 7.15; N, 10.91.

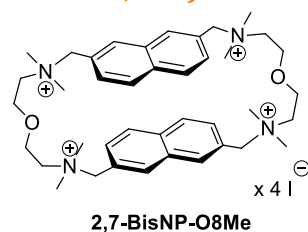
3,9,13,19-Tetramethyl-6,16-dioxa-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)dinaphthalenacycloicosaphane (2,7-BisNP-O4Me):



To a solution of **2,7-BisNP-O** (200 mg, 0.39 mmol) in HCOOH (0.82 mL), aq. HCHO (37%, 0.82 mL, 7.80 mmol) was added. The resulting mixture was heated at 120 °C for 24 h, evaporated under reduced pressure, and aq. NaOH (1 M, 40 mL) was added. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 25 mL), and the combined organic layers were dried with anhyd. K_2CO_3 and evaporated *in vacuo*. The residue was flash-chromatographed using gradient elution with NH_4OH (SiO_2 ; eluent: CH_2Cl_2 / MeOH / aq. NH_4OH , 80:20:0 to 80:20:2), to give the product as a white solid (140 mg, 0.25 mmol, 63%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.28 (s, 3H), 2.59 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.52 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H). **2,7-BisNP-O4Me × 4 HCl:**

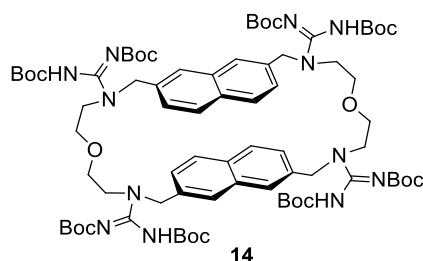
The free-base macrocycle (281 mg, 0.5 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and 1,4-dioxane (2:1, 10 mL). HCl (4 M in 1,4-dioxane, 2 mL) was added and the solution was stirred until the hydrochloride salt precipitated. The volatiles were evaporated under reduced pressure, and the residue was purified by recrystallization from anhydrous isopropanol, to give the product (214 mg, 0.30 mmol, 60%) as a white solid. ^1H NMR (300 MHz, D_2O , 60 °C): δ 3.23 (s, 3H), 3.84 (m, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.51 (m, 2H), 7.65 (d, 1H), 8.18–8.24 (s + d, 2H) ; ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O , 60 °C): δ 41.7 (CH_3), 55.4 (CH_2), 61.1 (CH_2), 65.3 (CH_2), 128.0 (C_q), 129.0 (CH), 129.5 (CH), 131.5 (CH), 132.6 (C_q), 133.8 (C_q) ; MS (ESI $^+$): m/z (%) 569.5 (100) [$M + \text{H}$] $^+$; anal. calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_4 \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$ (741.64): C, 58.30 ; H, 7.47 ; N, 7.55 ; found : C, 58.38 ; H, 7.41 ; N, 7.31.

3,3,9,9,13,13,19,19-Octamethyl-6,16-dioxa-3,9,13,19-tetraazonia-1,11 (2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane iodide (2,7-BisNP-O8Me, 4 I $^-$):



In a sealed tube, the macrocycle **2,7-BisNP-O** (205 mg, 0.4 mmol), iodomethane (2.00 mL, 4.54 g, 32 mmol) and DIPEA (0.79 mL, 619 mg, 4.8 mmol) in DMF (12 mL) were stirred at 60 °C for 24 h. After cooling to room temperature, the precipitate was collected, washed with DMF, dried *in vacuo*, and recrystallized from water to give the product as a white solid (378 mg, 0.33 mmol, 83%). ^1H NMR (300 MHz, [D_6]DMSO): δ 3.11 (s, 12H), 3.67 (s, 4H), 4.08 (s, 4H), 4.80 (s, 4H), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.34 (s, 2H) ; ^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]DMSO): δ 50.2 (CH_3), 63.4 (CH_2), 64.1 (CH_2), 67.4 (CH_2), 126.2 (C_q), 128.3 (CH), 131.1 (CH), 131.9 (C_q), 133.6 (CH), 134.1 (C_q) ; MS (ESI $^+$): m/z (%) 967.6 (24) [$M + 3 \text{CF}_3\text{COO}$] $^+$, 427.3 (75) [$M + 2 \text{CF}_3\text{COO}$] $^{2+}$; anal. calcd. for $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_2\text{I}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (1154.58): C, 41.61 ; H, 5.41 ; N, 4.85 ; found: C, 41.77 ; H, 5.72 ; N, 4.48.

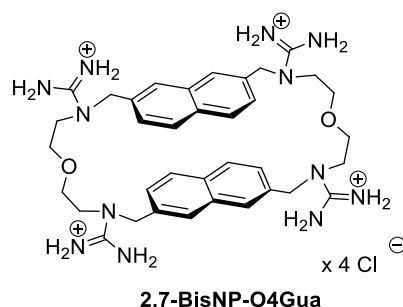
3,9,13,19-Tetra(N,N' -bis(tert-butoxycarbonyl)carbamimidoyl)-6,16-dioxa-3,9,13,19-tetraaza-1,11(2,7)dinaphthalenacycloicosaphane (14):



To a solution of **2,7-BisNP-O** (512 mg, 1.0 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL), 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (1.45 g, 5.0 mmol), NEt_3 (2.78 mL, 20 mmol) and mercury(II) chloride (1.36 g, 5 mmol) were added. The resulting mixture was stirred for 2 days at room temperature and then filtered through a bed of Celite. The filtrate was washed with water (3 \times 50 mL), brine (50 mL), dried with MgSO_4 and evaporated *in vacuo*. The residue was flash-chromatographed using gradient elution (SiO_2 ; eluent : 0 to 10% MeOH in CH_2Cl_2), to give the product as a white powder (1.24 g,

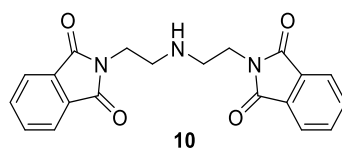
0.84 mmol, 84%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.51 (s, 18H), 3.37 (br s, 4H), 4.78 (s, 2H), 7.37–7.46 (m, 2H), 7.74 (d, 1H), 9.42 (br s, NH) ; MS (ESI $^+$): m/z (%) 741.5 (100) [$M + 2\text{H}$] $^{2+}$.

3,9,13,19-Tetra(carbamimidoyl)-6,16-dioxa-3,9,13,19-tetraaza-5,22-1,11(2,7)-dinaphthalenacycloicosaphane hydrochloride (2,7-BisNP-O4Gua \times 4 HCl):



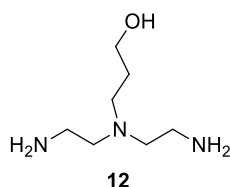
To a solution of compound **14** (1.24 g, 0.839 mmol) in chloroform (4 mL), HCl (4 M in 1,4-dioxane, 4.20 mL, 16.8 mmol) was added, the resulting mixture was stirred at room temperature during 24 h. The volatiles were evaporated *in vacuo* and the product was purified by two recrystallizations, first from EtOH and then from aq. 15% HCl, to give the product as white crystals (270 mg, 0.31 mmol, 37%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O): δ 3.53–3.54 (m, 4H), 3.61–3.62 (m, 4H), 4.66 (s, 4H), 7.35 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.44 (s, 2H), 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ 40.7 (CH_2), 43.7 (CH_2), 59.0 (CH_2), 114.6 (CH), 115.5 (CH), 119.5 (CH), 122.6 (C_q), 123.4 (C_q), 124.1 (C_q), 147.9 (C_q) ; MS (ESI $^+$): m/z (%) 681.5 (100) [$M + \text{H}$] $^+$; anal. calcd. for $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_{12}\text{O}_2\text{Cl}_4 \times 2.5 \text{ H}_2\text{O}$ (869.31): C, 49.60 ; H, 6.59 ; N, 19.28 ; found: C, 49.51 ; H, 6.31 ; N, 19.85.

N,N-bis(2-phthalimidoethyl)amine (**10**):³¹⁶



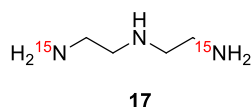
To a solution of 2,2'-dichlorodiethylamine hydrochloride (2.66 g, 14.93 mmol) in DMF (34 mL), potassium phthalimide (10 g, 53.7 mmol) was added. The mixture was heated at 110 °C overnight, then poured slowly into water (40 mL) containing ice (40 mL) and potassium carbonate (3.5g). After 30 min, the precipitate was filtered, washed with NaOH_{aq} (1 M, 3 x 20 mL) and dried *in vacuo* over P_2O_5 to give the product *N,N*-bis(2-phthalimidoethyl)amine **10**, as a white powder (4.58 g, 12.54 mmol, 84%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.95 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.77 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.70 (m, 4H).

N,N-Bis(2-aminoethyl)-3-aminopropan-1-ol (**12**):



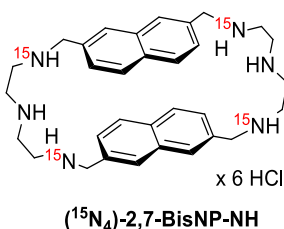
To a mixture of *N,N*-bis(2-phthalimidoethyl)amine **10** (3.86 g, 10.6 mmol), K₂CO₃ (8.81 g, 63.8 mmol), KI (88 mg, 0.53 mmol) in MeCN (150 mL), (3-bromopropoxy)(*tert*-butyl)dimethylsilane (5.54 mL, 8.86 g, 63.8 mmol) was added via syringe. The mixture was heated under reflux overnight. The solvent was removed under reduced pressure and H₂O (100 mL) was added. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 50 mL). The combined organic layers were washed with water, dried with MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. To the residue, aq. HCl (6 M, 6 mL) was added, and the resulting mixture was heated under reflux overnight and then filtered. The filtrate was stirred in presence of powdered charcoal during 30 min and filtered again ; the volatiles were removed under reduced pressure, and MeOH (10 mL) was added. The solution was stirred in presence of ion exchange resin (Amberlite IRA-402, OH⁻ form, 15 mL), filtered, and the solvent was removed under reduce pressure, to give the product **12** as a yellow oil (400 mg, 2.48 mmol, 65%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 1.73 (m, 2H), 2.53–2.62 (m, 6H), 2.73 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 3.62 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H) ; ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 30.6 (CH₂), 39.9 (CH₂), 52.3 (CH₂), 56.9 (CH₂), 61.3 (CH₂) ; MS (ESI⁺): *m/z* (%) 162.2 (100) [*M* + H]⁺.

(1,3-¹⁵N₂)Diethylenetriamine (**17**):

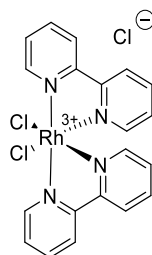


A suspension of ¹⁵N,¹⁵N-bis(2-phthalimidoethyl)amine **16**, prepared as for compound **10** starting from potassium phthalimide (¹⁵N, 98%+), in HCl_{aq} (6 M, 25 mL) was refluxed overnight. After cooling, filtering and washing with HCl_{aq} (1 M, 3 × 20 mL), the filtrate was evaporated. To a suspension of the residue in HCl_{aq} (1 M, 50 mL), powdered charcoal was added and after mixing 30 min the suspension was filtered and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in MeOH (40 mL) and the solution was stirred 30 min in presence of ion exchange resin (Amberlite IRA-402, OH⁻ form, 60 mL), filtered, and the solvent was removed under reduce pressure to give the product **17** as a yellow oil (757 mg, 7.34 mmol, 59%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H).

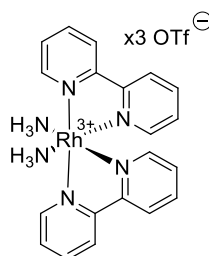
(¹⁵N₄)-2,7-BisNP-NH x 6 HCl:



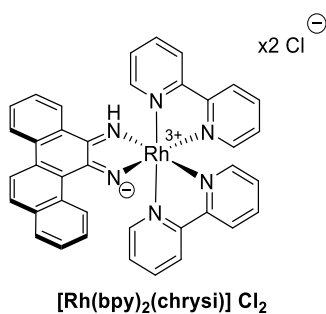
(¹⁵N₄)-2,7-BisNP-NH x 6 HCl was obtained following the same procedure as for the synthesis of **2,7-BisNP-NH x 6 HCl** through reaction of **4** with (1,3-¹⁵N₂)diethylenetriamine. Light – yellow powder (224 mg, 0.30 mmol, 28% over 3 steps). ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 3.12 (m, 4H), 4.12 (s, 2H), 7.23 (d, 1H), 7.65 (m, 2H) ; ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 41.9 (CH₂), 43.8 (CH₂), 51.3 (CH₂), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 129.8 (CH), 130.4 (CH), 132.4 (C_q), 133.5 (C_q) ; MS (ESI⁺): *m/z* (%) 515.3 (100) [*M* + H]⁺ 258.2 (85) [*M* + 2H]²⁺ ; anal. calcd. for C₃₂H₄₈N₆Cl₆ × 4 H₂O (729.49): C, 47.95 ; H, 7.04 ; N, 10.48 ; found : C, 48.18 ; H, 7.13 ; N, 10.22.

[Rh(bpy)₂(Cl)₂Cl (20):²³⁴**20**

Under an argon atmosphere, a solution of 2,2'-bipyridyl (874.5 mg, 5.60 mmol) in ethanol (20 mL) was added to a solution of RhCl₃ (737.2 mg, 2.8 mmol) and hydrazine monohydrochloride (50 mg, 0.73 mmol) in water (12.5 mL). The resulting mixture was heated under reflux for 20 min and filtered through a glass frit. After cooling the filtrate overnight at 4 °C, the crystallized product was isolated *via* filtration to give a yellow powder **20** (577.1 mg, 1.10 mmol, 40%). ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): δ 7.58 (t, 1H), 7.79 (d, 1H), 8.15 (dd, 1H), 8.31 (td, 1H), 8.62 (td, 1H), 8.86 (d, 1H), 8.97 (d, 1H), 9.69 (d, 1H).

[Rh(bpy)₂(NH₃)₂]OTf₃ (22):²³⁴**22**

Under an argon atmosphere, triflic acid (3.0 mL) was added to the product **20** (521.6 mg, 0.95 mmol). The resulting mixture was vigorously stirred overnight at room temperature, then cold diethyl ether (-78 °C, 300 mL) was added dropwise. The unstable solid (**21**) was isolated *via* filtration under a N₂ atmosphere and NH₄OH (50 mL) was added. The mixture was refluxed for 5 min and evaporated *in vacuo* at room temperature to give the product **22** as a stable powder (691.4 mg, 0.77 mmol, 77% over 2 steps). ¹H NMR (300 MHz, acetone): δ 7.67 (m, 1H), 7.96 (d, 1H), 8.20 (m, 1H), 8.39 (td, 1H), 8.72 (td, 1H), 8.88 (d, 1H), 9.04 (d, 1H), 9.48 (d, 1H).

[Rh(bpy)₂(chrysi)]Cl₂²³⁴

To a mixture of product **22** (400 mg, 0.44 mmol) and 5,6-chryseno quinone (120 mg, 0.46 mmol) in MeCN (100 mL), NaOH_{aq} (0.4 M, 8 mL) was added. The resulting mixture was stirred for 3 h at 40 °C. After cooling to room temperature the solution was neutralized by addition of HCl_{aq} and solvents were removed by evaporation *in vacuo* at room temperature. The residue was dissolved in MeOH (4 mL) and water (20 mL) was added. The precipitate was isolated *via* filtration, washed with water and dried *in vacuo*. The brown solid (**23**) was purified by preparative HPLC using gradient elution (C₁₈; eluent : 0.1% aq. formic acid – MeCN) then the purified solid was stirred 30 min in presence of ion exchange resin (Cl⁻ form, 8 mL), filtered, and the solvent was removed under reduce pressure to give the product **[Rh(bpy)₂(chrysi)]Cl₂** as a purple solid (147 mg, 0.19 mmol, 44%). ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 7.34 (m, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.73 – 7.94 (m, 7H), 8.07 – 8.12 (m, 3H), 8.31 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.35 – 8.48 (m, 7H), 8.68 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.84 – 8.90 (m, 4H), 9.61 (d, 1H). anal. calcd. for C₃₈H₂₈N₆Cl₃Rh × 2.6 H₂O (777.95): C, 55.34 ; H, 4.06 ; N, 10.19 ; found : C, 55.52 ; H, 4.19 ; N, 10.00.

II- Single-crystal X-ray crystallography³

X-ray diffraction data for **2,7-BisNP-O4Gua** × 4 HCl were collected with a Bruker VENTURE / PHOTON 100 CMOS diffractometer with Micro-focus μS source Mo $K\alpha$ radiation. X-ray diffraction data for **2,7-BisNP-Im** (2 Br⁻) were collected with a Bruker X8 APEX II CCD diffractometer with graphite-monochromated Mo- $K\alpha$ radiation. Crystals were mounted on a CryoLoop (Hampton Research) with Paratone-N (Hampton Research) as cryoprotectant and then flash-frozen in a nitrogen-gas stream at 100 K. For both compounds, the temperature of the crystal was maintained at the selected value by means of a 700 series Cryostream cooling device to within an accuracy of ± 1 K. The data were corrected for Lorentz polarization, and absorption effects. The structures were solved by direct methods using SHELXS-97³¹⁷ and refined against F^2 by full-matrix least-squares techniques using SHELXL-2017³¹⁸ with anisotropic displacement parameters for all non-hydrogen atoms. Hydrogen atoms were located on a difference Fourier map and introduced into the calculations as a riding model with isotropic thermal parameters. All calculations were performed by using the Crystal Structure crystallographic software package WINGX.³¹⁹ The crystal data collection and refinement parameters are given in *Table 1*.

³ Data from Dr. R. Guillot - CNRS UMR8182- Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO)- Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay (France).

Table 1- Crystallographic data and structure refinement details.

Compound	2,7-BisNP-Im ^A (2 Br ⁻)	2,7-BisNP-O4Gua × 4 HCl
CCDC Nr.	CCDC-1834477	CCDC-1834478
Empirical Formula	C ₃₀ H ₂₆ N ₄ , 2(Br)	C ₃₆ H ₅₂ N ₁₂ O ₂ , 4(Cl), 5(H ₂ O)
<i>M_r</i>	602.37	916.77
Crystal size, mm ³	0.16 × 0.07 × 0.02	0.105 × 0.070 × 0.045
Crystal system	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
<i>a</i> , Å	9.5029(6)	12.0329(8)
<i>b</i> , Å	10.8823(6)	12.9280(7)
<i>c</i> , Å	12.6659(8)	14.5300(8)
α , °	90	90
β , °	104.478(2)	95.758(2)
γ , °	90	90
Cell volume, Å ³	1268.23(13)	2248.9(2)
<i>Z</i> ; <i>Z'</i>	2 ; 1/2	2 ; 1/2
<i>T</i> , K	100(1)	100(1)
Radiation type ; wavelength Å	Mo K α ; 0.71073	Mo K α ; 0.71073
<i>F</i> ₀₀₀	608	972
μ , mm ⁻¹	3.223	0.323
θ range, deg	2.213–30.564	2.315–30.564
Reflection collected	20 804	104 192
Reflections unique	3 831	6 896
<i>R</i> _{int}	0.1045	0.0573
GOF	1.023	1.031
Refl. obs. (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	2 377	5 441
Parameters	163	320
<i>wR</i> ₂ (all data)	0.1118	0.2116
<i>R</i> value (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	0.0499	0.0716
Largest diff. peak and hole (e ⁻ Å ⁻³)	1.210 ; -1.040	1.546 ; -1.274

III- Biochemical and biophysical experiments

Compounds:

Stock solution of ligands, spermine and KWKK were prepared in water and compounds purchased from commercial suppliers (AR03, APE1 inh III, MX, CRT0044876, ATA, 9-aminoacridine, ethidium bromide) in DMSO at a concentration of 2 mM and stored at 4°C. Alkylating agents (MMS, TMZ, BCNU) were prepared in DMSO at 150 mM and stored at 4°C.

Nucleic acids:

Oligonucleotides (lyophilized, RP-HPLC purity grade) were purchased from Eurogentec, reconstituted in water at a concentration of 100 μM , and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The equimolar amounts of complementary strands were mixed in the adequate buffer and the solutions were annealed for 5 min at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, slowly cooled to ambient temperature to give the duplex. Calf thymus DNA solution (10 mg mL^{-1} , Invitrogen) was diluted in a 10 mM KAsO_2Me_2 , 10 mM KCl buffer (pH 7.2) to a nucleotide concentration of $\sim 5\text{ mM}$ (~ 50 -fold), and the actual concentration was determined by spectrophotometry, using the extinction coefficient value of $12,824\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ (base pairs, bp) at 260 nm. Solutions were stored at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fluorescence-melting experiments:

The experiments were performed with 17-mer oligonucleotides 17-N Φ (5'-(6-FAM)-CCAGTTCGNAGT-AACCC-3' / 5'-GGGTTACT Φ CGAACTGG-TAMRA-3', where N = A, T, G or C, Φ = THF / dSpacer), hybridized in a 10 mM KAsO_2Me_2 , 10 mM KCl buffer (pH 7.2) at a concentration of 25 μM . The samples (total volume: 25 μL) were prepared by mixing duplex oligonucleotides (final concentration: 0.5 μM) and ligands (final concentration: 1 μM), in the absence or in the presence of ct DNA competitor (final concentration: 60 or 200 μM bp) in a 10 mM KAsO_2Me_2 , 10 mM KCl buffer (pH 7.2). Thermal denaturation profiles were recorded in 96-well plates with a 7900HT Fast Real-Time PCR apparatus (Applied Biosystems), using fluorescence detection in the FAM channel. After an initial incubation at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, the temperature was increased to $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ increments every minute. The temperatures of DNA melting transitions were determined from the first-derivative plots of fluorescence intensity versus temperature. Each experimental condition was tested in triplicate.

Fluorimetric APE1 inhibition assay:

Recombinant, His₆-tagged APE1 was purchased from Life Technologies, reconstituted in a buffer containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,05 mM Na₂EDTA, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BSA, and 50 % glycerol (pH 8.0) at a concentration of 100 nM, aliquoted and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The substrate 17-T Φ (5'-F-CCAGTTCGTAGTAACCC-3' / 5'-GGGTTACT Φ CGAACTGG-Q-3') was hybridized in a 250 mM KAsO_2Me_2 , 250 mM KCl (pH 7.2) buffer at a concentration of 20 μM , with F = ATTO390 or FAM and Q = DABCYL or TAMRA, respectively. For kinetic studies, samples of 17-T Φ (final concentration: 0.2 μM , total volume: 1.00 mL) in the absence or in the presence of varied concentrations of ligands and ct DNA (26 μM) were diluted in the APE1 reaction buffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, pH 8.0), thermostated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in disposable acrylic semi-micro cuvettes (Evergreen

Scientific) for at least 5 min, and an aliquot of APE1 was added. The amount of APE1 was adjusted in order to maintain the same APE1 activity in the absence of inhibitors ($v_0 \approx 0.02 \text{ s}^{-1}$). The real-time fluorescence readings were performed every 12 s with an Agilent Cary Eclipse spectrofluorimeter using the following experimental parameters: $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$ (F = ATTO390, Q = DABCYL) or $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$ (F = FAM, Q = TAMRA) ; slit widths = 10 nm ; PMT voltage = 700 V, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; run duration = 90 s. In order to account for the partial quenching effect induced by some ligands, all fluorescence intensity plots were normalized with respect to the initial intensity (F_0 , before addition of the enzyme), and initial reaction velocities (v_0) were determined by manual fitting of linear regions of the curves $F/F_0 = f(t)$ ($r^2 > 0.9$). Each experimental condition was tested in triplicate. The enzymatic activity was calculated as a ratio of v_0 in the presence (v_0^{inh}) and in the absence of inhibitor (% activity = v_0^{inh} / v_0) and plotted as a function of the logarithm of concentration of inhibitor. IC_{50} values were determined by fitting these plots with a dose-response function.

Real-time fluorimetric assay for AP-DNA cleavage:

The double-labelled uracil-containing precursor 17-TU (5'-ATTO390-CCAGTTCGTAGTAACCC-3' / 5'-GGGTACTUCGAACTGG-DABCYL-3') was hybridized in a 250 mM KAsO_2Me_2 , 250 mM KCl buffer (pH 7.2) at a concentration of 40 μM . The batches of the abasic substrate 17-TX were prepared, on a daily basis, by incubation of 17-TU (final concentration: 20 μM) with UDG (NEB, 5000 U mL^{-1} , 1 μL) in 1X UDG Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8, total reaction volume: 120 μL) for 45 min at 37 $^\circ\text{C}$. To determine the rates of ligand-induced substrate cleavage, samples of 17-TX (final concentration: 0.2 μM in 1.00 mL of a 10 mM KAsO_2Me_2 , 150 mM KCl buffer, pH 7.2) were thermostatted at 37 $^\circ\text{C}$ in disposable acrylic semi-micro cuvettes (Evergreen Scientific) and, after 5 min, aliquots of ligands were added to a final concentration of 5 μM . The real-time fluorescence readings were performed every 12 s with an Agilent Cary Eclipse spectrofluorimeter running the following experimental parameters: $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$; slit widths = 5 nm; PMT voltage = 700 V ; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$; run duration = 180 min. The initial slopes (v_0) of the fluorescence intensity vs. time plots were determined by manual fitting of the linear regions of the curves ($r^2 > 0.9$). Each experimental condition was tested in triplicate.

To account for the extent of ligand-induced fluorescence quenching, the above-described experiments were performed with a non-cleavable THF analogue 17-T Φ (5'-ATTO390-CCAGTTCGTAGTAACCC-3' / 5'-GGGTACT Φ CGAACTGG-DABCYL-3'), and quenching factors were calculated as a ratio of time-averaged fluorescence before and after addition of ligands ($QF = F_{\text{with ligand}} / F_{\text{no ligand}}$).

Gel electrophoresis experiments:

The uracil-containing strand (5'-GGGTACTUCGAACTGG-3') was 5'- ^{32}P -labelled according to standard protocols and purified on a Sephadex column. The radiolabelled precursor 17-TU was prepared by annealing two complementary non-labelled strands (40 μM) in the presence of a small amount of the 5'- ^{32}P -labelled strand ($\sim 2 \times 10^6 \text{ cpm}$), and the abasic substrate 17TX was subsequently obtained by UDG treatment as described above. The radiolabelled substrate (final concentration: 0.2 μM) was incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 hour (unless stated otherwise) in the absence or in the presence of ligands (final concentration: 5 μM) in 10 mM KAsO_2Me_2 , 150 mM KCl buffer, pH 7.2 (total volume: 20 μL). Gel

loading buffer (formamide / 1 M EDTA / bromophenol blue / xylene cyanol, 12 μ L) was added, and samples (aliquots of 8 μ L) were loaded onto a denaturing (7 M urea), 20% polyacrylamide gel and separated at ambient temperature during 2.5 h (\sim 1500 V, 20 W). After exposure to a phosphorimager screen overnight, the bands were visualized with a Typhoon Trio imager (GE Healthcare) and quantified with ImageQuant TL software (GE Healthcare). Each experimental condition was tested in triplicate. The yields of strand cleavage products were calculated relative to total radioactivity in each lane.

LC-MS analysis of covalent adduct:

The uracil-containing precursor 17-TU (5'-CCAGTTCGTAGTAACCC-3' / 5'-GGGTTACTUCGAACTGG-3') was annealed in a 250 mM KAsO₂Me₂, 250 mM KCl buffer (pH 7.2) at a concentration of 40 μ M. The batches of the abasic substrate 17-TX were prepared by incubation of 17-TU (final concentration: 20 μ M) with UDG (NEB, 5000 U mL⁻¹, 1 μ L) in 1X UDG Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8, total reaction volume: 120 μ L) for 45 min at 37 °C. Samples of 17-TX (final concentration: 0.2 μ M) and **2,7-BisNP-NH** (final concentration: 50 μ M) were incubated in 150 mM KCl, 10 mM KAsO₂Me₂ buffer, pH 7.2 (total volume: 1000 μ L) overnight at 37 °C. Then, the mixtures were concentrated to \sim 150 μ L, cold EtOH (900 μ L) was added and samples were stored overnight at -20 °C. After centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was dried, then resuspended in 0.1 M TEAA (10 μ L). Excess of salt was removed using ZipTip-C₁₈ (Millipore) following the manufacturer's protocol. LC/MS analysis was performed on a Waters BEH C18 column (130 Å, 1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm), installed on a Waters ACQUITY H-Class UPLC system with a SQ Detector 2 mass detector. Eluent A: 15 mM tri-*n*-butylamine + 50 mM HFIP, eluent B: MeOH, flow: 0.2 mL min⁻¹, gradient: 0 to 1 min, 0–15% B (linear) ; 1 to 3.5 min, 15–60% B (linear) ; 3.5 to 4.5 min, 0.1% formic acid ; 4.5 to 6.0 min, 100% A (re-equilibration step). Data were analyzed using Waters MassLynx software.

Differential scanning fluorimetry (DSF):

Samples were prepared by dissolving recombinant, polyHis-tagged APE1 (Life Technologies) to a final concentration of 0.4 μ M in a buffer (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 8.0), adding SYPRO Orange dye (Life Technologies, final concentration: 1X) in the absence or in the presence of varied concentrations of inhibitors and APE1 substrate (0.44 μ M). The APE1 substrate (5'-CCAGTTCGTAGTAACCC-3' / 5'-GGGTTACX* Φ CGAACTGG-3', with X = 2' OMe rC and * = phosphorothioate linkage) was hybridized in 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 8.0 buffer at a concentration of 4.8 μ M. Thermal denaturation profiles were recorded in 96-well plates with a 7900HT Fast Real-Time PCR apparatus (Applied Biosystems) and the fluorescence intensity was monitored (λ_{ex} = 492 nm, λ_{em} = 610 nm). After an initial incubation at 10 °C for 10 min, the temperature was increased to 70 °C at a rate of 0.5 deg min⁻¹. The temperatures of protein denaturation were determined from the first-derivative plots of absorbance versus temperature. In the absence of inhibitors, the protein denatured at $T_m^{\text{APE1}} = 47.7 \pm 0.2$ °C.

DNA-Drug binding spectrophotometric titrations:

To a solution of 50 μM of compound ($V = 1 \text{ mL}$) in buffer (KAsO_2Me_2 10 mM, KCl 100 mM, pH 7.2), aliquots containing ct DNA (10 μM bp, 0.2 eq) and ligand (50 μM) were added and UV-visible absorption spectra from 270 to 500 nm were recorded with a Agilent Technologies Cary Series UV-Vis Spectrophotometer. Titration steps were repeated until a final concentration of ct DNA of 500 μM bp (10 eq). Absorbances at the maximum wavelength for each compound were plotted versus the concentration of ct DNA equivalents corrected for the dilution effect. Curves were fitted with the following equation (9):²⁷⁰

$$y = 0.5R (A + B + x - \sqrt{(A + B + x)^2 - 4Bx}) \quad (9)$$

with A, B et R being fitting parameters, $K_a = B / (A[L])$ (binding constant) and $n = B / [L]$ (binding site size), with $[L]$ = fixed concentration of compound (50 μM). Experiences were done in duplicate.

Microscale Thermophoresis (MST):

The DNA substrates were formed by annealing of a fluorophore-labelled 11-mer oligonucleotide, 5'-(TAMRA)-CGTCGTAGTGC-3', with unlabeled 5'-GCACTTCGACG-3' (TT-DNA) or 5'-GCACTACGACG-3' (TA-DNA control), in 20 mM KPi, 90 mM KCl, 40 mM NaCl buffer, pH 7.2, to give the duplex at a concentration of 100 μM . The experiments were performed in 20 mM KPi, 90 mM KCl, 40 mM NaCl buffer, pH 7.2. The concentration of labelled DNA was kept constant at 0.5 μM , and the ligands were diluted 16 times starting from 200 μM (1:1 serial dilutions). The samples were loaded into premium-treated MST glass capillaries, and thermophoresis measurements were performed with an NT.115 apparatus (NanoTemper). The intensities of the green LED and the laser were set as 80% and 75%, respectively. The binding isotherms were constructed by plotting the thermophoresis of the fluorescently labeled DNA substrates in the presence of increasing concentrations of the ligands, and fitted by a 1:1 binding model using NT.Affinity Analysis software (NanoTemper).

IV- Biological experiments

Cell line and cell culture conditions:

T98G human glioblastoma cell line and U87MG human glioblastoma cell line were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). HCT 116 human colon cell line was purchased from Europe Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Adherent T98G cells were grown in Minimum Essential Medium (MEM (1X) + GlutaMAX™, Life Technologies) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies), 10% fetal bovine serum (Biowest) and 1% MEM Non Essential Amino Acids (MEM NEAA (100X), Life Technologies). Adherent U-87MG cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium with sodium pyruvate (DMEM, Life Technologies) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) and 10% fetal bovine serum (Biowest). Adherent HCT116 cells were grown in McCoy's 5a + GlutaMAX™ medium (Life Technologies) supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) and 10% fetal bovine serum (Biowest). Cells were kept in humidified atmosphere under 5% CO₂ in air at 37 °C and were subcultured twice a week by dispersal with TrypLE™ Express Enzyme (Life Technologies).

Determination of GI₅₀:

T98G cells were plated in 24-well tissue culture plate at 0.25×10^5 cells / mL in 1 mL medium, treated 4 h later with varied concentrations of each compound ($V_{\text{added}} = 50 \mu\text{L}$) and incubated for 4 days at 37 °C and 5% CO₂. After washing PBS, 100 μL of TrypLE™ Express Enzyme (Life Technologies) was added to the cells for 5-10 minutes at 37 °C followed by 900 μL of medium. Cells were counted using a MaxiZ™ counter (Orflo®, Ketchum, ID, United States of America). Cells proliferation (%) were evaluated by ratio between the concentration of cells treated with compound and cells untreated and plotted versus compound concentration. Curves were fitted with dose-response model to determine GI₅₀. Each condition was tested three times at least.

Evaluation of combined effect of two drugs:

Cells were plated in 96-well white tissue culture plate in 200 μL medium at 0.12×10^5 cells / mL (T98G and U87MG) or 0.03×10^5 cells / mL (HCT116), treated 4 h later with varied concentration of compound alone and /or in combination with alkylating agent ($V_{\text{added}} = 10 \mu\text{L}$), and incubated for 96 h at 37 °C and 5% CO₂. For cytotoxic evaluation after 24 h only, T98G cells were plated at 0.4×10^5 cells / mL and kept at 37 °C and 5% CO₂ during 24 h before adding compounds. Controls received the same volume of H₂O. After incubation time, half of medium was removed per well ($V = 100 \mu\text{L}$) and concentrations of viable cells were determined using CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit following the kit instructions. Cells viability (%) was evaluated by ratio between the concentration of cells treated with compound and untreated cells. Each condition was tested three times at least. Combination effects were evaluated using CompunSyn software as per the software instructions.³²⁰

NanoSIMS:

T98G cells (5×10^5 cells/mL, 60 μL) were plated on thermanox plastic coverslips placed in 8-wells culture plate, allowed to attach during 4 h and then medium (1 mL) was added. After 24 h, cells were

treated with ($^{15}\text{N}_4$)-2,7-BisNP-NH (2 mM, 25 μL , $c_f = 50 \mu\text{M}$) and incubated for another 24 h. Samples for nanoSIMS imaging were prepared by J.-L. Guerquin-Kern (Institut Curie). Images were obtained with a Camera NanoSIMS-50 ion microprobe instrument, using a tightly focused Cs^+ primary ion beam. Three secondary ion species ($^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$, $^{12}\text{C}^{15}\text{N}^-$, $^{31}\text{P}^-$) were monitored in parallel. The data presented were an average for N cells (from 16 to 49) with standard errors. The p values were determined using the Student's t test where ^{15}N relative excess was compared with ^{15}N relative excess in resin (n.s., $p > 0.05$; ***, $p \leq 0.0001$).

AP Site Determination:

T98G cells were plated in Tissue Culture Flasks (75 cm^2) at 0.5×10^5 cells/mL and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 . After incubation, cells were treated with compound alone or in combination and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO_2 . Then, cells were washed with PBS, collected using TrypLE™ Express Enzyme (Life Technologies) and counted. Pellets (1.2×10^6 cells) were formed by centrifugation at 4 °C and 1500 rpm. Pellets were washed three times with cold PBS and stored at -20 °C. The genomic DNA was isolated using the DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen) following the kit instructions. DNA concentrations were determined using a Nanodrop® spectrophotometer and the DNA concentration was adjusted to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by addition of TE buffer. The number of AP sites was determined using the DNA Damage Quantification – AP Site Counting kit (Dojindo Molecular Technologies) as per kit instructions, directly following the genomic extraction in order to avoid DNA degradation. Samples were kept on ice during all the process. The data presented were an average of three individual experiments with standard errors. The p values were determined using the Student's t test where each condition was compared with the number of AP sites in untreated cells (n.s., $p > 0.05$; *, $p \leq 0.05$).

Immunostaining:

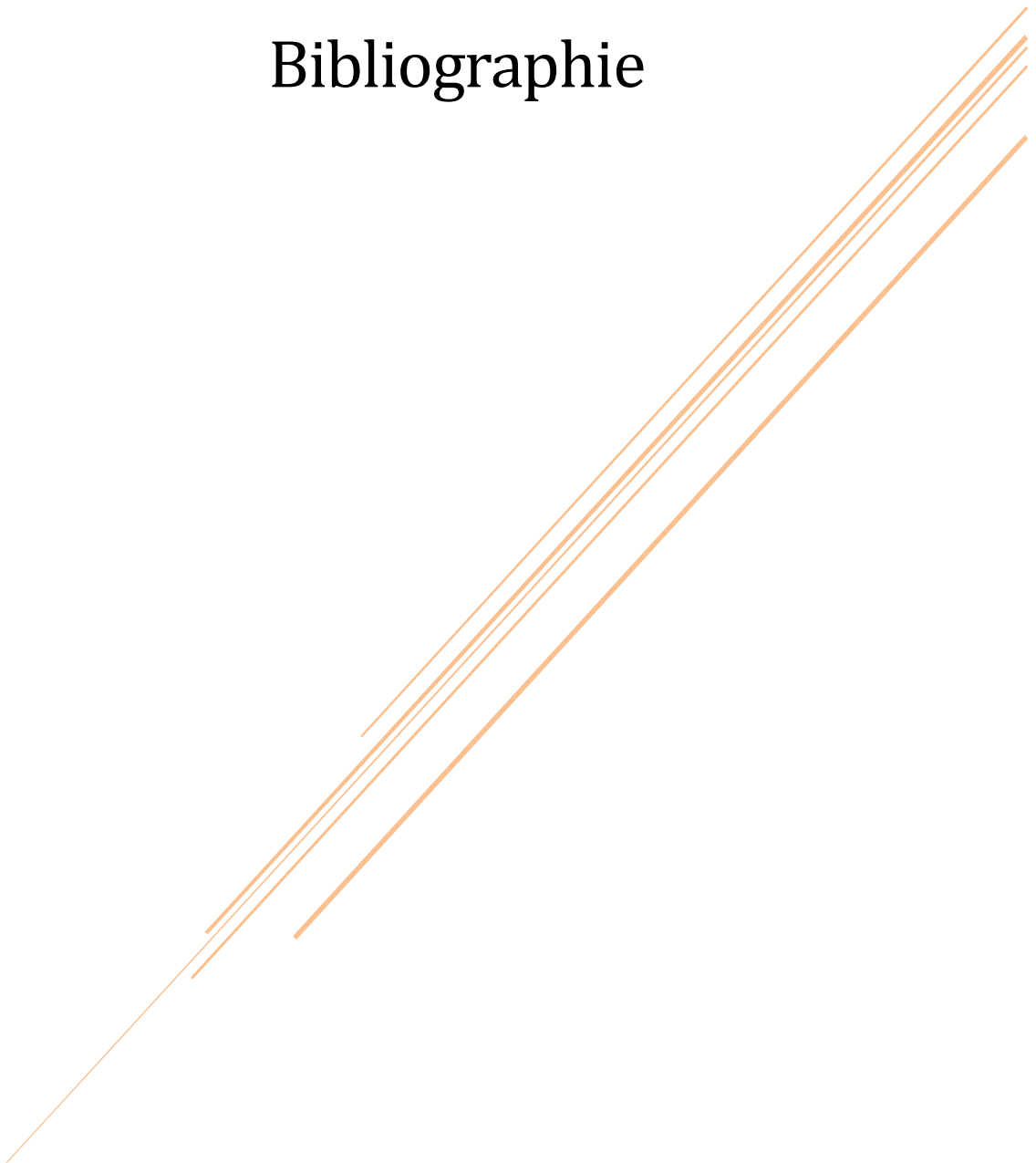
T98G cells were plated in 8-well LabTek® chamber slides in 200 μL medium, at 0.6×10^5 cells/mL for cells treated with compound alone and 1×10^5 cells/mL for cells treated in combination, treated 4 h later with compound ($V_{\text{added}} = 10 \mu\text{L}$) and incubated four days at 37 °C and 5% CO_2 . Cells were washed with PBS and fixed with PBS containing 4% of paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. After washing with PBS, cells were permeabilized by adding 200 μL per well of PBS containing 0.5% of Triton 100X and kept at 37 °C for 15 minutes. Then cells were blocked with PBS containing 5% of BSA and incubated for 90 minutes at room temperature. Each well was washed for 15 minutes with PBS three times and cells were incubated with primary antibody (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, Merck Millipore) diluted (1/800) in PBS containing 5% of BSA for 2 h. Each well was washed three times with PBS leaving 15 minutes intervals between washing and cells were incubated with secondary antibody (Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L), Life Technologies) diluted (1/500) in PBS containing 5% of BSA for 45 minutes in the dark. Cells were washed three times with PBS leaving 15 minutes intervals between washing and slides were mounted with Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories) and coverglass (n° 1.5 thickness). Slides were stored at 4 °C. Images were acquired on an Upright widefield Leica microscope coupled with a sCMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 Camera and were visualized and processed using the Image J software. The data presented were an average of three individual experimentations per condition with evaluation of ≈ 300 cells for each condition. The p

values were determined using the Mann Whitney test where each condition was compared with untreated cells (n.s., $p > 0.05$; * , $p \leq 0.05$; ** , $p \leq 0.01$; *** , $p \leq 0.001$; **** , $p \leq 0.0001$).

Comet assay:

T98G cells were plated in 6-well tissue culture plates in 5 mL medium, at 0.6×10^5 cells/mL for cells treated with compound alone and 1×10^5 cells / mL for cells treated by drugs combinations, and treated 4 h later with compounds ($V_{\text{added}} = 250 \mu\text{L}$). After 96 h, cells were collected, counted and suspended in medium to 1.5×10^5 cells/mL. To perform the comet assay, microscope slides were precoated with 0.5% type IA agarose (200 μL) and cells (100 μL , 1.5×10^5 cells/mL) mixed with 1% low gelling temperature, type VII-A agarose (100 μL) were spread over it followed by 5 minutes of incubation at 4°C. Slides were placed in lysis solution (100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 1% *N*-sarcosinate, pH 10) containing 1% Triton 100X and 10% DMSO at 4°C and incubated for 1 h in the dark. Slides were then transferred to an electrophoresis tank containing alkaline solution (0.3 M NaOH, 0.001 M disodium EDTA) and incubated for 40 min at room temperature in the dark. Electrophoresis was carried out for 25 min at 23 V ($0.66 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$) and 300 mA at room temperature. Slides were removed and washed (3 times, 5 min each) with neutralizing solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5). Each slide was dried, stained with ethidium bromide (75 μL , 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and cover slide was added. Comets were analyzed using a fluorescent microscope (ZEISS Imager 72, N2.1 filter) at 20X magnification. Around hundred cells were analyzed per slide (software: Metafer 4, MetaSystems).

Bibliographie



1. Lindahl, T. & Nyberg, B. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **11**, 3610–3618 (1972).
2. Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G. Inverse radiation dose-rate effects on somatic and germline mutations and DNA damage rates. *PNAS* **97**, 5381–5386 (2000).
3. Frosina, G. *et al.* Repair of abasic sites by mammalian cell extracts. *Biochem. J.* **304**, 699–705 (1994).
4. Nakamura, J. & Swenberg, J. A. Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res.* **59**, 2522–2526 (1999).
5. Chargaff, E. Chemical Specificity of Nucleic Acids and Mechanism of their Enzymatic Degradation. *Experientia* **6**, 201–209 (1950).
6. Johnson, S. J. & Beese, L. S. Structures of Mismatch Replication Errors Observed in DNA Polymerase. *Cell* **116**, 803–816 (2004).
7. Kelner, A. Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-Violet Irradiation Injury. *Bacteriology* **35**, 73–79 (1949).
8. Dulbecco, R. Reactivation of Ultra-Violet-Inactivated Bacteriophage by Visible Light. *Nature* **163**, 949–950 (1949).
9. Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. & van der Giessen, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revascularization Med.* **7**, 165–172 (2006).
10. Pourquier, P. & Robert, J. General overview on DNA repair. *Bull. Cancer* **98**, 229–237 (2011).
11. Yang, W. Structure and mechanism for DNA lesion recognition. *Cell Res.* **18**, 184–197 (2008).
12. Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* **193**, 3–34 (2003).
13. Rositsa Dueva, G. I. & Institute. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res* **2**, 163–177 (2013).
14. Lindahl, T. The Intrinsic Fragility of DNA (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 8528–8534 (2016).
15. Modrich, P. Mechanisms in *E. coli* and Human Mismatch Repair (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 8490–8501 (2016).
16. Sancar, A. Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 8502–8527 (2016).
17. Fortini, P. *et al.* The base excision repair: Mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* **85**, 1053–1071 (2003).
18. Hegde, M. L., Hazra, T. K. & Mitra, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* **18**, 27–47 (2008).
19. Barnes, D. E. & Lindahl, T. Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 445–476 (2004).

20. Lebedeva, N. A., Rechkunova, N. I. & Lavrik, O. I. AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *FEBS Lett.* **585**, 683–686 (2011).
21. Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J. & González Barón, M. Classification of anticancer drugs - A new system based on therapeutic targets. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 515–523 (2003).
22. Hurley, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 188–200 (2002).
23. Beranek, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* **231**, 11–30 (1990).
24. Fu, D., Calvo, J. A. & Samson, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 104–120 (2012).
25. Drabløs, F. *et al.* Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*. **3**, 1389–1407 (2004).
26. Gates, K. S., Nooner, T. & Dutta, S. Biologically Relevant Chemical Reactions of N7-Alkylguanine Residues in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 839–856 (2004).
27. Margison, G. P. & Santibáñez-Koref, M. F. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: Role in carcinogenesis and chemotherapy. *BioEssays* **24**, 255–266 (2002).
28. Gate, L. & Kenneth, D. T. Alkylating Agents. in *Cancer Management in Man : Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures* **13**, 61–85 (2011).
29. Newell, D., Gescher, A., Harland, S., Ross, D. & Ruttly, C. N-Methyl antitumour agents. *Cancer Chemother Pharmacol* **19**, 91–102 (1987).
30. Zhang, J., Stevens, M. F. G. & Bradshaw, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 102–114 (2012).
31. Bedford, P. & Fox, B. W. DNA-DNA interstrand crosslinking by dimethanesulphonic acid esters. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 2297–2301 (2002).
32. Pacheco, D. Y., Stratton, N. K. & Gibson, N. W. Comparison of the Mechanism of Action of Busulfan with Hepsulfam, a New Antileukemic Agent, in the L1210 Cell Line. *Cancer Res.* **49**, 5108–5110 (1989).
33. Tong, W. P., Kirk, M. C. & Ludlum, D. B. Formation of the Cross-Link 1-[N3-Deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]-ethane in DNA Treated with N,N'-Bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res.* **42**, 3102–3105 (1982).
34. Eisenbrand, G., Müller, N., Denkel, E. & Sterzel, W. DNA adducts and DNA damage by antineoplastic and carcinogenic N-nitrosocompounds. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **112**, 196–204 (1986).
35. Ludlum, D. B. The chloroethylnitrosoureas: Sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest.* **15**, 588–598 (1997).
36. Fine, H. A. *et al.* Phase II trial of thalidomide and carmustine for patients with recurrent high-grade gliomas. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2299–2304 (2003).
37. Olivi, A. *et al.* Dose escalation of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: A New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium Trial.

- J. Clin. Oncol.* **21**, 1845–1849 (2003).
38. Stuart, M. J. *et al.* Efficacy and toxicity of a CCNU-containing high-dose chemotherapy regimen followed by autologous hematopoietic cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, 552–560 (2001).
 39. Cedermark, B. J., Gunven, P. & Hammarberg, C. Adriamycin, CCNU, and 5-Fluorouracil in Patients With Advanced Gastrointestinal Cancer. *J. Surg. Oncol.* **22**, 125–128 (1983).
 40. ANDRIEVSKY, G. V *et al.* Direct Observation of the Alkylation Products of Deoxyguanosine and Dna By Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.* **20**, 665–668 (1991).
 41. Maanen, M. J. Van, Smeets, C. J. M. & Beijnen, J. H. Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (ThioTEPA). *Cancer Treat. Rev.* **26**, 257–268 (2000).
 42. Borowy-Borowski, H., Lipman, R. & Tomasz, M. Recognition between Mitomycin C and Specific DNA Sequences for Cross-Link Formation. *Biochemistry* **29**, 2999–3006 (1990).
 43. Borowy-Borowski, H., Lipman, R., Chowdary, D. & Tomasz, M. Duplex Oligodeoxyribonucleotides Cross-Linked by Mitomycin C at a Single Site: Synthesis, Properties, and Cross-Link Reversibility. *Biochemistry* **29**, 2992–2999 (1990).
 44. Langer, C. J. *et al.* Phase II trial of thio-TEPA in relapsed and refractory ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **43**, 242–246 (1991).
 45. Bradner, W. T. Mitomycin C : a clinical update. *Cancer Treat. Rev.* **27**, 35–50 (2001).
 46. Tan, C., Hancock, C., Mondora, A. & Hoffman, N. Phase I study of aziridinybenzoquinone (AZQ, NSC 182986) in children with cancer. *Cancer Res.* **1**, 831–835 (1984).
 47. Kleibl, K. Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O6-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. *Mutat. Res.* **512**, 67–84 (2002).
 48. Mishina, Y., Duguid, E. M. & He, C. Direct Reversal of DNA Alkylation Damage. *Chem. Rev.* **106**, 215–232 (2006).
 49. Fu, D., Calvo, J. A. & Samson, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 104–120 (2012).
 50. Pegg, A. E. Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* **462**, 83–100 (2000).
 51. Lindahl, T. & Sedgwick, B. Regulation and Expression of The Adaptive Response to Alkylating Agents. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 133–157 (1988).
 52. Robichaud, N. Mechanisms Underlying Resistance to Streptozotocin in Mer+ and Mer- Human Tumor Lines. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 959–964 (1990).
 53. Bobola, M. S. *et al.* O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2747–2755 (2005).
 54. Hongeng, S. *et al.* O6-Methylguanine-DNA Méthyltransferase Protein Levels in Pediatric Brain Tumors. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2459–2463 (1997).

55. Bobola, M. S., Berger, M. S. & Silber, J. R. Contribution of O6-methylguanine-DNA methyltransferase to resistance to 1,3-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in human brain tumor-derived cell lines. *Mol. Carcinog.* **13**, 70–80 (1995).
56. Bobola, M. S., Hong Tseng, S., Blank, A., Berger, M. S. & Silber, J. R. Role of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Resistance of Human Brain Tumor Cell Lines to the Clinically Relevant Methylating Agents Temozolomide and Streptozotocin. *Clin. Cancer Res.* **2**, 735–741 (1996).
57. Kokkinakis, D. M., Bocangel, D. B., Schold, S. C., Moschel, R. C. & Pegg, A. E. Thresholds of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase which Confer Significant Resistance of Human Glial Tumor Xenografts to Treatment with 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea or Temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **7**, 421–428 (2001).
58. Bacolod, M. D. *et al.* Mechanisms of Resistance to 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in Human Medulloblastoma and Rhabdomyosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 727–736 (2002).
59. Gerson, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 2388–2399 (2002).
60. Huang, H., Lin, H., Zhang, X. & Li, J. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway. *Oncol. Rep.* **27**, 2050–2056 (2012).
61. Kondo, Y., Bedwell, J., Germano, I. M., Kanzawa, T. & Kondo, S. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J. Neurosurg.* **99**, 1047–1052 (2009).
62. Marsoner, T., Schmidt, O. P., Triemer, T. & Luedtke, N. W. DNA-Targeted Inhibition of MGMT. *ChemBioChem* **18**, 894–898 (2017).
63. Sedgwick, B., Bates, P. A., Paik, J., Jacobs, S. C. & Lindahl, T. Repair of alkylated DNA: Recent advances. *DNA Repair (Amst)*. **6**, 429–442 (2007).
64. Sczepanski, J. T., Bowman, G. D., McKnight, J. N., Greenberg, M. M. & Wong, R. S. Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 22475–22480 (2010).
65. Pruss, D., Gavin, I. M., Melnik, S. & Bavykin, S. G. DNA-Protein Cross-Linking Applications for Chromatin Studies in Vitro and in Vivo. *Biochemistry* **304**, 516–533 (1999).
66. Prasad, R. *et al.* Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6337–6351 (2014).
67. Johnson, K. M. *et al.* On the Formation and Properties of Interstrand DNA–DNA Cross-Links Forged by Reaction of an Abasic Site with the Opposing Guanine Residue of 5'-CAP Sequences in Duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1015–1025 (2013).
68. Zhiyu, Y., Price, N. E., Johnson, K. M., Yinsheng, W. & Gates, K. S. Interstrand cross-links arising from strand breaks at true abasic sites in duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6275–6283 (2017).
69. Fishel, M. L., He, Y., Smith, M. L. & Kelley, M. R. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. *Clin. Cancer Res.* **13**, 260–267 (2007).

70. Engelward, B. P. *et al.* Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. *EMBO J.* **15**, 945–952 (1996).
71. De Murcia, J. M. *et al.* Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7303–7307 (1997).
72. Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H. & Kaina, B. Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage. *Cancer Res.* **59**, 1544–1551 (1999).
73. Gavande, N. S. *et al.* DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol. Ther.* **160**, 65–83 (2016).
74. Kelley, M. R., Logsdon, D. & Fishel, M. L. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: What's new? *Futur. Oncol.* **10**, 1215–1237 (2014).
75. Plummer, E. R. & Calvert, H. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase: A two-armed strategy for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6252–6256 (2007).
76. Brown, J. S., O’Carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. Targeting DNA repair in cancer: Beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* **7**, 20–37 (2017).
77. Erasmus, H., Gobin, M., Niclou, S. & Van Dyck, E. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat. Res.* **769**, 19–35 (2016).
78. Tentori, L. & Graziani, G. Chemopotential by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Res.* **52**, 25–33 (2005).
79. Tentori, L. *et al.* Systemic Administration of GPI 15427, a Novel Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitor, Increases the Antitumor Activity of Temozolomide against Intracranial Melanoma, Glioma, Lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5370–5379 (2003).
80. Boulton, S. *et al.* Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: A comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Br. J. Cancer* **72**, 849–856 (1995).
81. Delaney, C. A. *et al.* Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2860–2867 (2000).
82. Calabrese, C. R. *et al.* Identification of potent nontoxic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors: Chemopotential and pharmacological studies. *Clin. Cancer Res.* **9**, 2711–2718 (2003).
83. Miknyoczki, S. J. *et al.* Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 371–82 (2003).
84. Plummer, R. *et al.* Phase I study of the poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **14**, 7917–7923 (2008).
85. Paul, R., Banerjee, S. & Greenberg, M. M. Synergistic Effects of an Irreversible DNA Polymerase Inhibitor and DNA Damaging Agents on HeLa Cells. *ACS Chem. Biol.* **12**, 1576–1583 (2017).

86. Barakat, K. H., Gajewski, M. M. & Tuszynski, J. A. DNA polymerase beta (pol β) inhibitors: A comprehensive overview. *Drug Discov. Today* **17**, 913–920 (2012).
87. M. Goellner, E., Svilar, D., H. Almeida, K. & W. Sobol, R. Targeting DNA Polymerase β for Therapeutic Intervention. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 68–87 (2012).
88. Gowda, A. S. P., Suo, Z. & Spratt, T. E. Honokiol Inhibits DNA Polymerases β and λ and Increases Bleomycin Sensitivity of Human Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 715–725 (2017).
89. Puglisi, F. *et al.* Prognostic significance of Ape1/ref-1 subcellular localization in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* **21**, 4041–4050 (2001).
90. Robertson, K. A. *et al.* Altered expression of Ape1/ref-1 in germ cell tumors and overexpression in NT2 cells confers resistance to bleomycin and radiation. *Cancer Res.* **61**, 2220–2225 (2001).
91. Puglisi, F. *et al.* Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage I-III breast carcinomas. *Oncol. Rep.* **9**, 11–17 (2002).
92. Bobola, M. S., Blank, A., Berger, M. S., Stevens, B. A. & Silber, J. R. Apurinic/aprimidinic endonuclease activity is elevated in human adult gliomas. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3510–3518 (2001).
93. Wilson, D. M. & Barsky, D. The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res. - DNA Repair* **485**, 283–307 (2001).
94. Demple, B., Herman, T. & Chen, D. S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: Definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 11450–11454 (1991).
95. Mol, C. D., Izumi, T., Mitra, S. & Tainer, J. A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature* **403**, 451–456 (2000).
96. Abbotts, R. & Madhusudan, S. Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 425–435 (2010).
97. Evans, A. R., Limp-Foster, M. & Kelley, M. R. Going APE over ref-1. *Mutat. Res. - DNA Repair* **461**, 83–108 (2000).
98. Kaur, G., Cholia, R. P., Mantha, A. K. & Kumar, R. DNA repair and redox activities and inhibitors of apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor 1 (APE1/Ref-1): A comparative analysis and their scope and limitations toward anticancer drug development. *J. Med. Chem.* **57**, 10241–10256 (2014).
99. Walker, L. J., Craig, R. B., Harris, A. L. & Hickson, D. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4884–4889 (1994).
100. Ono, Y., Furuta, T., Ohmoto, T., Akiyama, K. & Seki, S. Stable expression in rat glioma cells of sense and antisense nucleic acids to a human multifunctional DNA repair enzyme, APEX nuclease. *Mutat. Res. Repair* **315**, 55–63 (1994).
101. Silber, J. R. *et al.* The Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity of Ape1/Ref-1 Contributes to Human Glioma Cell Resistance to Alkylating Agents and Is Elevated by Oxidative Stress. *Clin.*

- Cancer Res.* **8**, 3008–3018 (2002).
102. Wang, D., Luo, M. & Kelley, M. R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: Enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther* **3**, 679–686 (2004).
 103. Wang, D. *et al.* APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer* **66**, 298–304 (2009).
 104. Montaldi, A. P., Godoy, P. R. D. V. & Sakamoto-Hojo, E. T. APE1/REF-1 down-regulation enhances the cytotoxic effects of temozolomide in a resistant glioblastoma cell line. *Mutat. Res.* **793**, 19–29 (2015).
 105. McNeill, D. R. & Wilson III, D. M. A Dominant-Negative Form of the Major Human Abasic Endonuclease Enhances Cellular Sensitivity to Laboratory and Clinical DNA-Damaging Agents. *Mol. Cancer Res.* **5**, 61–70 (2007).
 106. Luo, M. & Kelley, M. R. Inhibition of the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) repair activity and sensitization of breast cancer cells to DNA alkylating agents with lucanthone. *Anticancer Res.* **24**, 2127–2134 (2004).
 107. Del Rowe, J. D. *et al.* Accelerated regression of brain metastases in patients receiving whole brain radiation and the topoisomerase II inhibitor, lucanthone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**, 89–93 (1999).
 108. Bases, R. E. & Mendez, F. Topoisomerase Inhibition by Lucanthone, an Adjuvant in Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **37**, 1133–1137 (1997).
 109. Fishel, M. L. & Kelley, M. R. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol. Aspects Med.* **28**, 375–395 (2007).
 110. Madhusudan, S. *et al.* Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4711–4724 (2005).
 111. Guikema, J. E. J. *et al.* APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **204**, 3295–3295 (2008).
 112. Bapat, A., Fishel, M. L. & Kelley, M. R. Going Ape as an Approach to Cancer Therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 651–667 (2008).
 113. Seiple, L. A., Cardellina, J. H., Akee, R. & Stivers, J. T. Potent Inhibition of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 by Arylstibonic Acids. *Mol. Pharmacol.* **73**, 669–677 (2007).
 114. Simeonov, A. *et al.* Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1. *PLoS One* **4**, e5740 (2009).
 115. Lightfoot, H. L., Miska, E. A. & Balasubramanian, S. Identification of small molecule inhibitors of the Lin28-mediated blockage of pre-let-7g processing. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 10208–10216 (2016).
 116. Chandramouly, G. *et al.* Small-Molecule Disruption of RAD52 Rings as a Mechanism for Precision Medicine in BRCA-Deficient Cancers. *Chem. Biol.* **22**, 1491–1504 (2015).

117. González, R. G., Haxo, R. S. & Schleich, T. Action of Polymeric Aurintricarboxylic Acid, a Potent Inhibitor. *Biochemistry* **19**, 4299–4303 (1980).
118. Shadrack, W. R., Mukherjee, S., Hanson, A. M., Sweeney, N. L. & Frick, D. N. Aurintricarboxylic acid modulates the affinity of hepatitis C virus NS3 helicase for both nucleic acid and ATP. *Biochemistry* **52**, 6151–6159 (2013).
119. Cushman, M., Wang, P., Stowell, J. G., Schols, D. & De Clercq, E. Structure Investigation and Anti-HIV Activities of High-Molecular Weight ATA Polymers. *J. Org. Chem.* **57**, 7241–7248 (1992).
120. Dorjsuren, D. *et al.* Diverse Small Molecule Inhibitors of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 Identified from a Screen of a Large Public Collection. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
121. Rai, G. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of a novel class of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 3101–3112 (2012).
122. Zawahir, Z., Dayam, R., Deng, J., Pereira, C. & Neamati, N. Pharmacophore guided discovery of small-molecule human apurinic/ apyrimidinic endonuclease 1 inhibitors. *J. Med. Chem.* **52**, 20–32 (2009).
123. Aiello, F. *et al.* Design and Synthesis of 3-Carbamoylbenzoic Acid Derivatives as Inhibitors of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 (APE1). *ChemMedChem* **7**, 1825–1839 (2012).
124. Srinivasan, A. *et al.* Identification and Characterization of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease - 1 Inhibitors. *Biochemistry* **51**, 6246–6259 (2012).
125. Feng, Z. *et al.* Design and activity of AP endonuclease-1 inhibitors. *J. Chem. Biol.* **8**, 79–93 (2015).
126. Ruiz, F. M. *et al.* Receptor-Based Virtual Screening and Biological Characterization of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (Ape1) Inhibitors. *ChemMedChem* **7**, 2168–2178 (2012).
127. Guerreiro, P. S. *et al.* Structure-based virtual screening toward the discovery of novel inhibitors of the DNA repair activity of the human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Chem. Biol. Drug Des.* **88**, 915–925 (2016).
128. Trilles, R. *et al.* Discovery of Macrocyclic Inhibitors of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. *J. Med. Chem.* **62**, 1971–1988 (2019).
129. Mohammed, M. *et al.* Development and evaluation of human AP endonuclease inhibitors in melanoma and glioma cell lines. *Br. J. Cancer* **104**, 653–663 (2011).
130. Naidu, M. D. *et al.* Lucanthone and its derivative hycanthone inhibit apurinic endonuclease-1 (APE1) by direct protein binding. *PLoS One* **6**, (2011).
131. Bapat, A. *et al.* Novel Small-Molecule Inhibitor of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Blocks Proliferation and Reduces Viability of Glioblastoma Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **334**, 988–998 (2010).
132. Peltonen, K. *et al.* Identification of Novel p53 Pathway Activating Small- Molecule Compounds Reveals Unexpected Similarities with Known Therapeutic Agents. *PLoS One* **5**, e12996 (2010).
133. Peltonen, K. *et al.* Small Molecule BMH-Compounds That Inhibit RNA Polymerase I and Cause

- Nucleolar Stress. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 2537–2547 (2014).
134. Nyland, R. L., Luo, M., Kelley, M. R. & Borch, R. F. Design and synthesis of novel quinone inhibitors targeted to the redox function of apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox enhancing factor-1 (Ape1/Ref-1). *J. Med. Chem.* **53**, 1200–1210 (2010).
135. Luo, M. *et al.* Role of the Multifunctional DNA Repair and Redox Signaling Protein Ape1/Ref-1 in Cancer and Endothelial Cells: Small-Molecule Inhibition of the Redox Function of Ape1. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1853–1867 (2008).
136. Strekowski, L. & Wilson, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **623**, 3–13 (2007).
137. Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D. & Williams, D. M. Reversible Small Molecule-Nucleic Acid Interactions. in *Nucleic acids in Chemistry and Biology* 342–382 (2015).
138. Lerman, L. S. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. *J. Mol. Biol.* **3**, 18–30 (1961).
139. Gao, Q. *et al.* Drug-induced DNA repair: X-ray structure of a DNA-ditercalinium complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2422–2426 (1991).
140. Boyle, K. M. & Barton, J. K. Targeting DNA mismatches with rhodium metalloinsertors. *Inorganica Chim. Acta* **452**, 3–11 (2016).
141. Granzhan, A., Kotera, N. & Teulade-Fichou, M. P. Finding needles in a basestack: Recognition of mismatched base pairs in DNA by small molecules. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3630–3665 (2014).
142. Manoharan, M., Ransom, S. C., Mazumder, A. & Gerlt, J. A. The Characterization of Abasic Sites in DNA Heteroduplexes by Site Specific Labeling with ¹³C. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1620–1622 (1988).
143. Bailly, V. & Verly, W. G. Possible roles of β -elimination and δ -elimination reactions in the repair of DNA containing AP (apurinic/aprimidinic) sites in mammalian cells. *Biochem. J.* **253**, 553–559 (1988).
144. Bailly, V., Derydt, M. & Verly, W. G. δ -elimination in the repair of AP (apurinic/aprimidinic) sites in DNA. *Biochem. J.* **261**, 707–713 (1989).
145. Kurtz, A. J., Dodson, M. L. & Lloyd, R. S. Evidence for Multiple Imino Intermediates and Identification of Reactive Nucleophiles in Peptide-Catalyzed-Elimination at Abasic Sites †. *Biochemistry* **41**, 7054–7064 (2002).
146. Jones, A. S., Mian, A. M. & Walker, R. T. The Alkaline Degradation of Deoxyribonucleic Acid Derivatives. *J. Chem. Soc.* 2042–2044 (1968).
147. Bailly, V. & Verly, W. G. Escherichia coli endonuclease III is not an endonuclease but a β -elimination catalyst. *Biochem. J.* **242**, 565–572 (1987).
148. Mazumder, A. & Gerlt, J. A. UV Endonuclease V from Bacteriophage T4 Catalyzes DNA strand Cleavage at Aldehydic Abasic Sites by a Syn B-Elimination Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8029–8030 (1989).
149. McCullough, A. K. *et al.* The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites. *Biochemistry* **40**, 561–568 (2001).

150. Rabow, L. E. & Kow, Y. W. Mechanism of action of base release by Escherichia coli Fpg protein: Role of lysine 155 in catalysis. *Biochemistry* **36**, 5084–5096 (1997).
151. Mazumder, A. *et al.* Stereochemical Studies of the β -Elimination Reactions at Aldehydic Abasic Sites in DNA: Endonuclease III from Escherichia coli, Sodium Hydroxide, and Lys-Trp-Lys. *Biochemistry* **30**, 1119–1126 (1991).
152. Behmoaras, T., Toulmé, J. J. & Hélène, C. A tryptophan-containing peptide recognizes and cleaves DNA at apurinic sites. *Nature* **292**, 858–859 (1981).
153. Pierre, J. & Laval, J. Specific nicking of DNA at apurinic sites by peptides containing aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **256**, 10217–10220 (1981).
154. Bertrand, J. R. *et al.* Mechanism of cleavage of apurinic sites by 9-aminoellipticine. *J. Biol. Chem.* **264**, 14172–14178 (1989).
155. Bertrand, J.-R. *et al.* Synthesis, thermal stability and reactivity towards 9-aminoellipticine of double-stranded oligonucleotides containing a true abasic site. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10307–10319 (1989).
156. Male, R., Fosse, V. M. & Kleppe, K. Polyamine-induced hydrolysis of apurinic sites in DNA and nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* **10**, 6305–6318 (1982).
157. Mchugh, P. J. & Knowland, J. Novel reagents for chemical cleavage at abasic sites and UV photoproducts in DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1664–1670 (1995).
158. Steullet, V., Edwards-Bennett, S. & Dixon, D. W. Cleavage of abasic sites in DNA by intercalator-amines. *Bioorganic Med. Chem.* **7**, 2531–2540 (1999).
159. Fkyerat, A., Demeunynck, M., Constant, J. F., Michon, P. & Lhomme, J. A New Class of Artificial Nucleases That Recognize and Cleave Apurinic Sites in DNA with Great Selectivity and Efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9952–9959 (1993).
160. Fkyerat, A., Demeunynck, M., Constant, J. F. & Lhomme, J. Synthesis of purine-acridine hybrid molecules related to artificial endonucleases. *Tetrahedron* **49**, 11237–11252 (1993).
161. Berthet, N. *et al.* Design of molecules that specifically recognize and cleave apurinic sites in DNA. *J. Mol. Recognit.* **7**, 99–107 (1994).
162. Berthet, N. *et al.* Recognition of abasic sites in DNA by a cyclobisacridine molecule. *Chem. - A Eur. J.* **5**, 3625–3630 (1999).
163. Abe, Y., Nakagawa, O., Yamaguchi, R. & Sasaki, S. Synthesis and binding properties of new selective ligands for the nucleobase opposite the AP site. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 3470–3479 (2012).
164. Abe, Y. S. & Sasaki, S. DNA cleavage at the AP site via β -elimination mediated by the AP site-binding ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **24**, 910–914 (2016).
165. Gruppi, F. *et al.* Catalysts of DNA Strand Cleavage at Apurinic/Apyrimidinic Sites. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
166. Perigolo De Oliveira, M., Constant, J. F., Peuchmaur, M., Pitta, I. & Décout, J. L. Antibiotic drugs aminoglycosides cleave DNA at abasic sites: Shedding new light on their toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 1710–1719 (2013).

167. Bertrand, J. R., Malvy, C. & Paoletti, C. Quantification by Fluorescence of Apurinic Sites in DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 768–774 (1987).
168. Boturn, D., Boudali, A., Constant, J.-F., Defrancq, E. & Lhomme, J. Synthesis of Fluorescent Probes for the Detection of Abasic Sites in DNA. *Tetrahedron* **53**, 85–5492 (1997).
169. Boturn, D. *et al.* A Simple and Sensitive Method for in Vitro Quantitation of Abasic Sites in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 476–482 (1999).
170. Adamczyk, M., Mattingly, P. G. & Moore, J. A. O-(Fluoresceinylmethyl)hydroxyamine (OFMHA): A Fluorescent Reagent For Detection Of Damaged Nucleic Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3599–3602 (1998).
171. Adamczyk, M., Mattingly, P. G., Moore, J. A. & Pan, Y. Synthesis of a Chemiluminescent Acridinium Hydroxylamine (AHA) for the Direct Detection of Abasic Sites in DNA. *Org. Lett.* **1**, 779–781 (1999).
172. Nakamura, J. *et al.* Highly Sensitive Apurinic/ Apyrimidinic Site Assay Can Detect Spontaneous and Chemically Induced Depurination under Physiological Conditions. *Cancer Res.* **58**, 222–225 (1998).
173. Chen, B. X. *et al.* Properties of a monoclonal antibody for the detection of abasic sites, a common DNA lesion. *Mutat. Res.* **273**, 253–261 (1992).
174. Sun, H. B., Qian, L. & Yokota, H. Detection of abasic sites on individual DNA molecules using atomic force microscopy. *Anal. Chem.* **73**, 2229–2232 (2001).
175. Buzzeo, M. C. & Barton, J. K. Redmond red as a redox probe for the DNA-mediated detection of abasic sites. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2110–2112 (2008).
176. An, N., Fleming, A. M., White, H. S. & Burrows, C. J. Crown ether-electrolyte interactions permit nanopore detection of individual DNA abasic sites in single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 11504–11509 (2012).
177. Chowdhury, G. & Guengerich, F. P. Tandem mass spectrometry-based detection of C4'-oxidized abasic sites at specific positions in DNA fragments. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1310–1319 (2009).
178. Bowler, F. R., Diaz-Mochon, J. J., Swift, M. D. & Bradley, M. DNA analysis by dynamic chemistry. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 1809–1812 (2010).
179. Wei, S., Shalhout, S., Ahn, Y. H. & Bhagwat, A. S. A versatile new tool to quantify abasic sites in DNA and inhibit base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. **27**, 9–18 (2015).
180. Müller, M. *et al.* 5-Formyl- and 5-Carboxydeoxycytidines Do Not Cause Accumulation of Harmful Repair Intermediates in Stem Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 10359–10364 (2017).
181. Condie, A. G., Yan, Y., Gerson, S. L. & Wang, Y. A fluorescent probe to measure DNA damage and repair. *PLoS One* **10**, 1–21 (2015).
182. Liuzzi, M. & Talpaert-Borlé, M. A New Approach to the Study of the Base-excision Repair Pathway Using Methoxyamine. *J. Biol. Chem.* **260**, 5252–5258 (1985).
183. Rosa, S., Fortini, P., Karran, P., Bignami, M. & Dogliotti, E. Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: A new assay for the detection of abasic sites formed in vivo.

- Nucleic Acids Res.* **19**, 5569–5574 (1991).
184. Taverna, P. *et al.* Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. *Mutat. Res. - DNA Repair* **485**, 269–281 (2001).
185. Liu, L., Taverna, P., Whitacre, C. M., Chatterjee, S. & Gerson, S. L. Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2908–2917 (1999).
186. Montaldi, A. P. & Sakamoto-Hojo, E. T. Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. *Clin. Exp. Med.* **13**, 279–288 (2013).
187. Liu, L., Yan, L., Donze, J. R. & Gerson, S. L. Blockage of abasic site repair enhances antitumor efficacy of 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in colon tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 1061–1066 (2003).
188. Yan, L. *et al.* Combined Treatment with Temozolomide and Methoxyamine: Blocking Apurinic/Pyrimidinic Site Repair Coupled with Targeting Topoisomerase II α . *Clin. Cancer Res.* **13**, 1532–1539 (2007).
189. Liu, L., Nakatsuru, Y. & Gerson, S. L. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2985–2991 (2002).
190. Montaldi, A. P., Pezuk, J. A., Sakamoto-Hojo, E. T., Gonzaga Tone, L. & Brassesco, M. S. Base Excision Repair Inhibition by Methoxyamine Impairs Growth and Sensitizes Osteosarcoma Cells to Conventional Treatments. *J. Cancer Ther.* **5**, 307–314 (2014).
191. Gordon, M. S. *et al.* A phase 1 study of TRC102, an inhibitor of base excision repair, and pemetrexed in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **31**, 714–723 (2013).
192. Meehan, R. S. *et al.* A phase I trial of TRC102 (methoxyamine HCl) with temozolomide (TMZ) in patients with solid tumors and lymphomas. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2556 (2016).
193. Caimi, P. F. *et al.* Phase I clinical trial of the base excision repair inhibitor methoxyamine in combination with fludarabine for patients with advanced hematologic malignancies. *Oncotarget* **8**, 79864–79875 (2017).
194. Weiss, G. J. *et al.* Final results from a phase I study of oral TRC102 (methoxyamine HCl), an inhibitor of base-excision repair, to potentiate the activity of pemetrexed in patients with refractory cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2576 (2010).
195. Eads, J. R. *et al.* Phase I clinical trial of temozolomide and methoxyamine (TRC-102) in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **33**, 2558 (2015).
196. Malvy, C., Safraoui, H., Bloch, E. & Bertrand, J. R. Involvement of apurinic sites in the synergistic action of alkylating and intercalating drugs in *Escherichia coli*. *Anticancer. Drug Des.* **2**, 361–70 (1988).
197. Lefrançois, M., Bertrand, J. R. & Malvy, C. 9-Amino-ellipticine inhibits the apurinic site-dependent base excision-repair pathway. *Mutat. Res.* **236**, 9–17 (1990).
198. Melton, D., Lewis, C. D., Price, N. E. & Gates, K. S. Covalent Adduct Formation between the Antihypertensive Drug Hydralazine and Abasic Sites in Double- and Single-Stranded DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 2113–2118 (2014).

199. Barret, J.-M., Etiévant, C., Fahy, J., Lhomme, J. & Hill, B. T. Novel artificial endonucleases inhibit base excision repair and potentiate the cytotoxicity of DNA-damaging agents on L1210 cells. *Anticancer. Drugs* **10**, 55–65 (1999).
200. Belmont, P., Demeunynck, M., Constant, J. F. & Lhomme, J. Synthesis and study of a new adenine-acridine tandem, inhibitor of exonuclease III. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **10**, 293–295 (2000).
201. Belmont, P. *et al.* Abasic site recognition in DNA as a new strategy to potentiate the action of anticancer alkylating drugs. *J. Med. Chem.* **42**, 5153–5159 (1999).
202. Lhomme, J., Constant, J. F. & Demeunynck, M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopolymers* **52**, 65–83 (1999).
203. Alarcon, K., Demeunynck, M., Lhomme, J., Carrez, D. & Croisy, A. Potentiation of BCNU cytotoxicity by molecules targeting abasic lesions in DNA. *Bioorganic Med. Chem.* **9**, 1901–1910 (2001).
204. Malina, J., Scott, P. & Brabec, V. Shape-selective recognition of DNA abasic sites by metallohelices: inhibition of human AP endonuclease 1. *Nucleic Acids Res.* **43**, 5297–5306 (2015).
205. Benner, K., Ihmels, H., Kölsch, S. & Pithan, P. M. Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolizinium derivatives: The influence of size, shape and substituents. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 1725–1734 (2014).
206. Benner, K., Granzhan, A., Ihmels, H. & Viola, G. Targeting abasic sites in DNA by aminoalkyl-substituted carboxamidoacridizinium derivatives and acridizinium-adenine conjugates. *European J. Org. Chem.* 4721–4730 (2007).
207. Wu, F. *et al.* Simultaneous fluorescence light-up and selective multicolor nucleobase recognition based on sequence-dependent strong binding of berberine to DNA abasic site. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 3300–3307 (2012).
208. Sato, Y., Kageyama, T., Nishizawa, S. & Teramae, N. Competitive Binding of Abasic Site-Binding Ligands and Masking Ligands to DNA Duplexes for the Analysis of Single-Base Mutation. *Anal. Sci.* **29**, 15–19 (2013).
209. Martelli, A., Jourdan, M., Constant, J. F., Demeunynck, M. & Dumy, P. Photoreactive threading agent that specifically binds to abasic sites in DNA. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **16**, 154–157 (2006).
210. Slama-Schwok, A., Taillandier, E., Teulade-Fichou, M. P., Vigneron, J. P. & Lehn, J. M. Selective Binding of a Macrocyclic Bisacridine to DNA Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6822–6830 (1995).
211. Slama-Schwok, A. *et al.* A macrocyclic bis-acridine shifts the equilibrium from duplexes towards DNA hairpins. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2574–2581 (1997).
212. Zeglis, B. M., Boland, J. A. & Barton, J. K. Targeting abasic sites and single base bulges in DNA with metalloinsertors. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7530–7531 (2008).
213. Zeglis, B. M., Boland, J. A. & Barton, J. K. Recognition of abasic sites and single base bulges in DNA by a metalloinsertor. *Biochemistry* **48**, 839–849 (2009).

214. Boyle, K. M. & Barton, J. K. A Family of Rhodium Complexes with Selective Toxicity toward Mismatch Repair-Deficient Cancers. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 5612–5624 (2018).
215. Komor, A. C. & Barton, J. K. An unusual ligand coordination gives rise to a new family of rhodium metalloinsertors with improved selectivity and potency. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14160–14172 (2014).
216. Ernst, R. J., Komor, A. C. & Barton, J. K. Selective cytotoxicity of rhodium metalloinsertors in mismatch repair-deficient cells. *Biochemistry* **50**, 10919–10928 (2011).
217. Benner, K., Bergen, A., Ihmels, H. & Pithan, P. M. Selective stabilization of abasic site-containing DNA by insertion of sterically demanding biaryl ligands. *Chem. - A Eur. J.* **20**, 9883–9887 (2014).
218. David, A. *et al.* DNA Mismatch-Specific Base Flipping by a Bisacridine Macrocycle. *ChemBioChem* **4**, 1326–1331 (2003).
219. Jourdan, M. *et al.* Threading bis-intercalation of a macrocyclic bisacridine at abasic sites in DNA: Nuclear magnetic resonance and molecular modeling study. *Biochemistry* **38**, 14205–14213 (1999).
220. Bahr, M., Gabelica, V., Granzhan, A., Teulade-Fichou, M. P. & Weinhold, E. Selective recognition of pyrimidine-pyrimidine DNA mismatches by distance-constrained macrocyclic bis-intercalators. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5000–5012 (2008).
221. Granzhan, A. & Teulade-Fichou, M. P. A fluorescent bisanthracene macrocycle discriminates between matched and mismatch-containing DNA. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 1314–1318 (2009).
222. Granzhan, A., Largy, E., Saettel, N. & Teulade-Fichou, M. P. Macrocyclic DNA-mismatch-binding ligands: Structural determinants of selectivity. *Chem. - A Eur. J.* **16**, 878–889 (2010).
223. Jourdan, M., Granzhan, A., Guillot, R., Dumy, P. & Teulade-Fichou, M. P. Double threading through DNA: NMR structural study of a bis-naphthalene macrocycle bound to a thymine-thymine mismatch. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5115–5128 (2012).
224. Kotera, N., Granzhan, A. & Teulade-Fichou, M. P. Comparative study of affinity and selectivity of ligands targeting abasic and mismatch sites in DNA using a fluorescence-melting assay. *Biochimie* **128–129**, 133–137 (2016).
225. Kotera, N., Poyer, F., Granzhan, A. & Teulade-Fichou, M. P. Efficient inhibition of human AP endonuclease 1 (APE1) via substrate masking by abasic site-binding macrocyclic ligands. *Chem. Commun.* **51**, 15948–15951 (2015).
226. Butterfield, A. M., Gilomen, B. & Siegel, J. S. Kilogram-scale production of corannulene. *Org. Process Res. Dev.* **16**, 664–676 (2012).
227. Novotna, J. *et al.* Cationic azacryptands as selective three-way DNA junction binding agents. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 215–222 (2015).
228. Baker, M. V. *et al.* Azolium-linked cyclophanes: A comprehensive examination of conformations by ¹H NMR spectroscopy and structural studies. *J. Org. Chem.* **69**, 7640–7652 (2004).
229. Adams, H., Bailey, N. A., Fenton, D. E., Hempstead, P. D. & Westwood, G. P. Ring Contraction in Schiff Base Macrocycles: The X-Ray Crystal Structure of an Imidazolidine-Containing

- Macrocyclic. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **11**, 63–69 (1991).
230. Menif, R., Martell, E., Squattrito, P. J. & Clearfield, A. New Hexaaza Macrocyclic Binucleating Ligands. Oxygen Insertion with a Dicopper (I) Schiff Base Macrocyclic Complex. *Inorg. Chem.* **29**, 4723–4729 (1990).
231. Zapata, F. *et al.* Fluorescent charge-assisted halogen-bonding macrocyclic halo-imidazolium receptors for anion recognition and sensing in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11533–11541 (2012).
232. Caballero, A., White, N. G. & Beer, P. D. A bidentate halogen-bonding bromoimidazoliophane receptor for bromide ion recognition in aqueous media. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 1845–1848 (2011).
233. Alcalde, E. *et al.* Hydrogen bonded driven anion binding by dicationic [14] imidazoliophanes. *Chem. Commun.* 295–296 (1999).
234. Zeglis, B. M. & Barton, J. K. DNA base mismatch detection with bulky rhodium intercalators: Synthesis and applications. *Nat. Protoc.* **2**, 357–371 (2007).
235. Schermerhorn, K. M. & Delaney, S. Transient-state kinetics of apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 acting on an authentic AP site and commonly used substrate analogs: The effect of diverse metal ions and base mismatches. *Biochemistry* **52**, 7669–7677 (2013).
236. Kirsch, I. R., Glebov, O., Ernst, R. J., Hart, J. R. & Barton, J. K. DNA mismatch-specific targeting and hypersensitivity of mismatch-repair-deficient cells to bulky rhodium(III) intercalators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15359–15363 (2006).
237. Drummond, D. S., Simpson-Gildemeister, V. F. W. & Peacocke, A. R. Interaction of Aminoacridines with Deoxyribonucleic Acid : Effects of Ionic Strength, Denaturation, and Structure. *Biopolymers* **3**, 135–153 (1965).
238. Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. & Wolf, D. E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **85**, 8790–8794 (1988).
239. Clegg, R. M., Murchie, A. I., Zechel, A. & Lilley, D. M. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Biophysics (Oxf)*. **90**, 2994–2998 (1993).
240. Bernacchi, S. & Mély, Y. Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res.* **29**, e62 (2001).
241. Marras, S. A. E., Kramer, F. R. & Tyagi, S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **30**, e122 (2002).
242. Fairclough, R. H. & Cantor, C. R. The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods Enzymol.* **48**, 347–379 (1978).
243. Matayoshi, E. D., Wang, G. T., Krafft, G. A. & Erickson, J. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science* **247**, 954–958 (1990).
244. Ng, M. & Auld, D. S. A fluorescent oligopeptide energy transfer assay with broad applications for neutral proteases. *Anal. Biochem.* **183**, 50–56 (1989).

245. Stöcker, W., Ng, M. & Auld, D. S. Fluorescent Oligopeptide Substrates for Kinetic Characterization of the Specificity of *Astacus* Protease. *Biochemistry* **29**, 10418–10425 (1990).
246. Murchie, A. I. H. *et al.* Fluorescence energy transfer shows that the four-way DNA junction is a right-handed cross of antiparallel molecules. *Nature* **341**, 763–766 (1989).
247. Yang, M., Ghosh, S. S. & Millar, D. P. Direct Measurement of Thermodynamic and Kinetic Parameters of DNA Triple Helix Formation by Fluorescence Spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 15329–15337 (1994).
248. Mergny, J. L. & Maurizot, J. C. Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *ChemBioChem* **2**, 124–132 (2001).
249. Simonsson, T. & Sjöback, R. DNA tetraplex formation studied with fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **274**, 17379–17383 (1999).
250. Darby, R. A. J. *et al.* High throughput measurement of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and a LightCycler. *Nucleic Acids Res.* **30**, e39 (2002).
251. De Cian, A. *et al.* Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* **42**, 183–195 (2007).
252. Guédin, A., Lacroix, L. & Mergny, J. Drug-DNA Interaction Protocols. *Methods Mol. Biol.* **613**, 25–35 (2010).
253. Renčiuk, D. *et al.* A FRET-based screening assay for nucleic acid ligands. *Methods* **57**, 122–128 (2012).
254. Liu, B. & Peng, L. Real-time monitoring AP site incision caused by APE1 using a modified hybridization probe. *Anal. Methods* **8**, 862–868 (2016).
255. Keizer, J. Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1494–1498 (1983).
256. Boaz, H. & Rollefson, G. K. The Quenching of Fluorescence. Deviations from the Stern-Volmer Law. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 3435–3443 (1950).
257. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
258. Rideout, M. C., Liet, B., Gasparutto, D. & Berthet, N. A high-throughput screen for detection of compound-dependent phosphodiester bond cleavage at abasic sites. *Anal. Biochem.* **513**, 93–97 (2016).
259. Bailly, V. & Verly, W. G. Importance of thiols in the repair mechanisms of DNA containing AP (apurinic or apyrimidinic) sites. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9489–9496 (1988).
260. Vasseur, J.-J. *et al.* Structure of the Adduct Formed between 3-Aminocarbazole and the Apurinic Site Oligonucleotide Model d[Tp(Ap)pT]. *J. Org. Chem* **52**, 4994–4998 (1987).
261. Vasseur, J.-J., Rayner, B. & Imbach, J.-L. Apurinic DNA Reactivity: Modelisation of Apurinic DNA breakage with Phenylhydrazine and Formation of a Pyrazole Adduct. *J. Heterocycl. Chem.* **25**, 389–392 (1988).
262. Schellman, J. A. Macromolecular binding. *Biopolymers* **14**, 999–1018 (1975).

263. Pace, C. N. & Mcgrath, T. Substrate Stabilization of Lysozyme to Thermal and Guanidine Hydrochloride Denaturation. *J. Biol. Chem.* **255**, 3862–3865 (1980).
264. Brandts, J. F. & Lin, L. N. Study of Strong to Ultratight Protein Interactions Using Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **29**, 6927–6940 (1990).
265. Straume, M. & Freire, E. Two-dimensional differential scanning calorimetry: Simultaneous resolution of intrinsic protein structural energetics and ligand binding interactions by global linkage analysis. *Anal. Biochem.* **203**, 259–268 (1992).
266. Vedadi, M. *et al.* Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 15835–15840 (2006).
267. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221 (2007).
268. Stetsenko, D. A. *et al.* New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1. *Mol. Biosyst.* **12**, 67–75 (2015).
269. Jenkins, T. C. Optical Absorbance and Fluorescence Techniques for Measuring DNA–Drug Interactions. *Drug-DNA Interact. Protoc.* **90**, 195–218 (2003).
270. Stootman, F. H., Fisher, D. M., Rodger, A. & Aldrich-Wright, J. R. Improved curve fitting procedures to determine equilibrium binding constants. *Analyst* **131**, 1145–1151 (2006).
271. Fornasiero, D. & Kurucsev, T. The Binding of 9-aminoacridine to calf thymus DNA in aqueous solution electronic spectral studies. *Biophys. Chem.* **23**, 31–37 (1985).
272. Caron, C., Duong, X. N. T., Guillot, R., Bombard, S. & Granzhan, A. Interaction of Functionalized Naphthalenophanes with Abasic Sites in DNA: DNA Cleavage, DNA Cleavage Inhibition, and Formation of Ligand–DNA Adducts. *Chem. – A Eur. J.* **25**, 1949–1962 (2018).
273. Fouquier, J. & Guedj, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol. Res. Perspect.* **3**, (2015).
274. Roell, K. R., Reif, D. M. & Motsinger-Reif, A. A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Front. Pharmacol.* **8**, 1–11 (2017).
275. Chou, T.-C. & Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* **22**, 27–55 (1984).
276. Chou, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* **70**, 440–446 (2010).
277. Lee, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* **3**, 198–210 (2016).
278. Alonso, M. M., Gomez-Manzano, C., Bekele, B. N., Yung, W. K. A. & Fueyo, J. Adenovirus-based strategies overcome temozolomide resistance by silencing the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Cancer Res.* **67**, 11499–11504 (2007).
279. Liu, L., Nakatsuru, Y. & Gerson, S. L. Base Excision Repair as a Therapeutic Target in Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2985–2991 (2002).

280. Taverna, P. *et al.* Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. *Mutat. Res.* **485**, 269–281 (2001).
281. Brenner, D. J. The Linear-Quadratic Model Is an Appropriate Methodology for Determining Isoeffective Doses at Large Doses Per Fraction. *Semin. Radiat. Oncol.* **18**, 234–239 (2008).
282. Kanzawa, T. *et al.* Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *Br. J. Cancer* **89**, 922–929 (2003).
283. Zeng, Y. *et al.* The Tumorigenicity of Glioblastoma Cell Line U87MG Decreased During Serial In Vitro Passage. *Cell. Mol. Neurobiol.* **38**, 1245–1252 (2018).
284. Allen, M., Bjerke, M., Edlund, H., Nelander, S. & Westermark, B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci. Transl. Med.* **8**, (2016).
285. Hoppe, P., Cohen, S. & Meibom, A. NanoSIMS: Technical Aspects and Applications in Cosmochemistry and Biological Geochemistry. *Geostand. Geoanalytical Res.* **37**, 111–154 (2013).
286. Dzatko, S. *et al.* Evaluation of the Stability of DNA i-Motifs in the Nuclei of Living Mammalian Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 2165–2169 (2018).
287. Krafcikova, M. *et al.* Monitoring DNA – Ligand Interactions in Living Human Cells Using NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 13281–13285 (2019).
288. Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* **146**, 905–915 (1999).
289. Fernandez-Capetillo, O. *et al.* DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* **4**, 993–997 (2002).
290. Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G. & Bonner, W. M. Quantitative Detection of 125IdU-Induced DNA Double-Strand Breaks with γ -H2AX Antibody. *Radiat. Res.* **158**, 486–92 (2002).
291. Rothkamm, K. & Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* **100**, 5057–5062 (2003).
292. Dickey, J. S. *et al.* γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 957–967 (2008).
293. Rothkamm, K. & Lobrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS* **100**, 5057–5062 (2003).
294. Muller, C., Salles, B. & Bouquet, F. The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell cycle* **5**, 1116–1122 (2006).
295. Revet, I. *et al.* Functional relevance of the histone H2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 8663–8667 (2011).
296. Clingen, P. H. *et al.* Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 19–27 (2008).
297. Watters, G. P., Smart, D. J., Harvey, J. S. & Austin, C. A. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **679**, 50–58 (2009).
298. Natale, F. *et al.* Identification of the elementary structural units of the DNA damage response.

- Nat. Commun.* **8**, 15760 (2017).
299. Ostling, O. & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291–298 (1984).
300. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184–191 (1988).
301. Olive, P. L. & Banáth, J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* **1**, 23–29 (2006).
302. Yu, Y. *et al.* A comparative study of using comet assay and γ H2AX foci formation in the detection of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA damage. *Toxicol. Vitro.* **20**, 959–965 (2006).
303. Pruss, D., Gavin, I. M., Melnik, S. & Bavykin, S. G. DNA-Protein Cross-Linking Applications for Chromatin Studies in Vitro and in Vivo. *Biochemistry* **304**, 516–533 (1999).
304. Hartley, J. M. *et al.* Measurement of DNA Cross-linking in Patients on Ifosfamide Therapy Using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. *Clin. Cancer Res.* **5**, 507–512 (1999).
305. Lam, F. C. *et al.* Enhanced efficacy of combined temozolomide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
306. Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **99**, 2467–2498 (1999).
307. Booth, M. J. *et al.* Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biol.* **13**, R69 (2012).
308. Hardisty, R. E., Kawasaki, F., Sahakyan, A. B. & Balasubramanian, S. Selective Chemical Labeling of Natural T Modifications in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 9270–9272 (2015).
309. Liu, Z. J., Martínez Cuesta, S., van Delft, P. & Balasubramanian, S. Sequencing abasic sites in DNA at single-nucleotide resolution. *Nat. Chem.* **11**, (2019).
310. Cheong, A., Low, J. J. A., Lim, A., Yen, P. M. & Woon, E. C. Y. A fluorescent methylation-switchable probe for highly sensitive analysis of FTO N6-methyladenosine demethylase activity in cells. *Chem. Sci.* **9**, 7174–7185 (2018).
311. Zhang, Y. *et al.* Probing and regulating the activity of cellular enzymes by using DNA tetrahedron nanostructures. *Chem. Sci.* **10**, 5959–5966 (2019).
312. Bogdanov, J. & Maslak, P. Synthesis of 2,7-Bis(fluoromethyl)naphthalene. *Molbank* **2008**, M567 (2008).
313. Adams, H., Hempstead, P. D., Westwood, G. P., Fenton, D. E. & Bailey, N. A. Ring contraction in schiff base macrocycles: The X-Ray crystal structure of an imidazolidine-containing macrocycle. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **11**, 63–69 (2005).
314. Menif, R., Martell, A. E., Squattrito, P. J. & Clearfield, A. New Hexaaza Macrocylic Binucleating Ligands. Oxygen Insertion with a Dicopper(I) Schiff Base Macrocylic Complex. *Inorg. Chem.* **29**, 4723–4729 (1990).
315. Granzhan, A. & Teulade-Fichou, M.-P. Synthesis of mono- and bibrachial naphthalene-based

- macrocycles with pyrene or ferrocene units for anion detection. *Tetrahedron* **65**, 1349–1360 (2009).
316. Davies, J. S. & Al-Jamri, L. Synthesis of N α -Boc-N-tetrabenzyl-DTPA-L-lysine and N α -Fmoc-N-tetra-t-butyl-DTPA-L-lysine, building blocks for solid phase synthesis of DTPA-containing peptides. *J. Pept. Sci.* **8**, 663–670 (2002).
317. Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, program for X-ray crystal structure solution. SHELXS-97, program for X-ray crystal structure solution* (University of Gottingen, Germany, 1997).
318. Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **71**, 3–8 (2015).
319. Farrugia, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **32**, 837–838 (1999).
320. Chou, T.-C. & Martin, N. CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. *ComboSyn Inc, Paramus, (NJ)* (2005).

Titre : Ligands macrocycliques de sites abasiques en tant qu'inhibiteurs de la réparation de l'ADN : Synthèse, études biochimiques et biologiques.

Mots clés : Composés macrocycliques – Sites abasiques – Réparation de l'ADN – Ligands de l'ADN.

Résumé : Dans le contexte de la chimiothérapie, la réparation de l'ADN réduit les dommages induits par les agents alkylants de l'ADN dont le témozolomide (TMZ), conduisant à la chimiorésistance. Une des voies principales de réparation de l'ADN est la voie par excision de base (BER) au sein de laquelle une enzyme clé, APE1 (endonucléase AP 1), clive les sites abasiques générés suite aux traitements par les agents alkylants et initie la réparation de la coupure simple-brin. Ce mécanisme représente une source majeure de chimiorésistance dans certains cancers. Plusieurs études ont ainsi validé la voie BER et plus particulièrement APE1 comme une cible importante dans le but d'améliorer l'efficacité des agents anticancéreux; pour ces raisons, de nombreux inhibiteurs d'APE1 ont été développés. Cependant, à la place d'une inhibition directe de l'enzyme, une stratégie alternative consiste à cibler le substrat de cette dernière : les sites abasiques. Les composés macrocycliques de type naphthalénophane ont montré la capacité à se lier fortement et sélectivement aux sites abasiques. Ce processus interfère avec la reconnaissance de ces derniers par APE1 et conduit *in vitro* à deux effets : l'inhibition du clivage enzymatique d'APE1 et le clivage du site AP par les macrocycles par un mécanisme différent de celui d'APE1, de type β -élimination. Ainsi, une nouvelle série de naphthalénophanes fonctionnalisés, composée de neuf nouveaux

dérivés, a été synthétisée et étudiée. La plupart des macrocycles démontre la capacité à se lier fortement et sélectivement aux sites abasiques de l'ADN ainsi qu'à inhiber l'activité d'APE1 *in vitro*, avec des constantes d'inhibition s'étalant de 39 nM à 25 μ M. De plus, l'activité d'inhibition d'APE1 par les ligands, caractérisée par les valeurs de K_i , a pu être corrélée avec leur affinité et leur sélectivité pour les sites abasiques. La structure moléculaire des macrocycles montre une forte influence sur l'activité de clivage de ces derniers pouvant conduire à une abolition totale ou à une très haute activité de clivage des sites abasiques. De façon intéressante, la formation d'un adduit covalent ADN – ligand avec un des macrocycles a été caractérisée. Enfin, l'activité biologique des naphthalénophanes sur la lignée cellulaire de glioblastome T98G résistante au TMZ a été étudiée. La plupart des ligands affiche une cytotoxicité élevée, avec des GI_{50} de l'ordre du micromolaire. De plus, un remarquable effet synergique lors du traitement des cellules avec le TMZ ou le MMS en combinaison avec un ligand (2,7-BisNP-O4Me) a été démontré. Ce macrocycle augmente également le nombre de sites abasiques et le nombre de coupures double-brins après un co-traitement cellulaire avec les agents alkylants suggérant ainsi l'inhibition d'APE1 attendue. Ces résultats mettent ainsi en évidence le fort intérêt thérapeutique de ce composé.

Title : Macrocyclic ligands for DNA abasic sites as inhibitors of DNA repair : Synthesis, biochemical and biological studies.

Keywords : Macrocyclic compounds – Abasic sites – DNA repair – DNA ligands.

Abstract : In the context of chemotherapy, DNA repair reduces the DNA damage induced by DNA-alkylating drugs such as temozolomide, leading to chemoresistance. One of the most important pathways of DNA repair is Base Excision Repair (BER), where a key enzyme, APE1 (AP endonuclease 1), cleaves abasic sites generated following treatment with DNA-alkylating drugs and initiates the repair of the single-strand break. The DNA repair activity of APE1 was identified as the major source of chemoresistance in certain cancers. Several studies validated the BER pathway and, particularly, the APE1 enzyme as important drug targets for improvement the efficacy of anti-cancer drugs; for this reason, several APE1 inhibitors have been developed. However, instead of direct inhibition of the enzyme, an alternative strategy can rely on targeting its substrate: the AP sites in DNA. Macrocyclic compounds, namely naphthalenophanes, show a strong and selective binding to abasic sites in the DNA. This process interferes with the recognition of the latter by APE1 and leads *in vitro* to two effects: inhibition of the APE1-induced DNA cleavage and macrocycle-induced DNA cleavage by a mechanism different from that of APE1, namely β -elimination. Herein, a new series of functionalized naphthalenophanes, composed of

nine novel derivatives, has been synthesized and studied. Most ligands demonstrate a strong and selective binding to AP-sites in DNA and an inhibition of APE1 activity *in vitro*, with inhibitory constants from 39 nM to 25 μ M. Moreover, the inhibitory activity of ligands, as characterized by K_i values, could be directly related to their affinity and selectivity to AP-sites. The molecular design of macrocycles has a crucial influence on their intrinsic AP-site cleavage activity leading either to total abolition, or to an exceptionally high AP-site cleavage activity. Interestingly, an unprecedented formation of a covalent DNA-ligand adduct with one of the ligands has been characterized. Finally, the biological activity of naphthalenophanes was assessed in the TMZ-resistant glioblastoma cell line T98G. Most compounds are highly active, with GI_{50} values in sub-micromolar or low-micromolar range. In addition, a remarkable synergic effect upon co-treatment of TMZ or MMS with one ligand (2,7-BisNP-O4Me) was demonstrated. This ligand was found to increase the number of AP-sites and the number of double-strands break in DNA upon co-treatment with TMZ and MMS suggesting APE1 inhibition as expected. These observations highlight the high therapeutic interest of this compound.

