UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
Spécialité : Chimie – Biologie

Arrêté ministériel du 7 août 2006

présentée et soutenue publiquement par

Christophe BOUNAIX MORAND du PUCH

le 21 octobre 2010

Analyse des interactions ADN lésé / protéines

Optimisations méthodologiques et applications aux dommages de l'ADN engendrés par les dérivés du platine

Thèse dirigée par Sylvie SAUVAIGO et codirigée par Jean BRETON

JURY

Dr Sophie BOMBARD, chargée de recherche, Université Descartes – Paris V / CNRS	**Rapporteur**
Dr Jean-Christophe FRANÇOIS, chargé de recherche, Muséum National d'Histoire Naturelle / INSERM	**Rapporteur**
Pr Philippe BECUWE, professeur des Universités, Université Henri Poincaré – Nancy I	**Examinateur**
Dr Sylvie SAUVAIGO, ingénieur de recherche, CEA Grenoble	**Examinateur**
Dr Jean BRETON, maître de conférence, Université de Grenoble / CEA Grenoble	**Examinateur**
Pr Michel SÈVE, professeur des Universités, praticien hospitalier, Université de Grenoble / CHU Grenoble	**Président**

Thèse préparée au sein du laboratoire *Lésions des Acides Nucléiques*
SCIB UMR E3 CEA / UJF / CNRS FRE3200
Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, centre de Grenoble

École doctorale Chimie & Sciences du Vivant

SOMMAIRE

CLEF DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES **5**

INDEX DES ILLUSTRATIONS **7**

INTRODUCTION **11**

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE **13**

I. LES AGENTS ANTICANCÉREUX DÉRIVÉS DU PLATINE 13

A) Généralités sur les principaux dérivés du platine *13*

1. Le cisplatine, complexe coordonné du platine historique 13
2. Autres exemples de dérivés du cisplatine 18
   - Carboplatine ou *cis*-1,1-cyclobutane-dicarboxylato-diamine-platine (II) 18
   - Oxaliplatine ou cyclohexane-1,2-diamine-éthanedioate-platine (II) 19
   - Satraplatine ou bis-acétato-amine-dichloro-(cyclohexylamine) platine (IV) ou JM216 20
   - Nedaplatine ou *cis*-diamine-glycolatoplatine (II) 22
3. Stratégies originales faisant appel à des dérivés du platine 23
   - Renforcement de la production de lésions de l'ADN 23
   - Utilisation de prodrogues ciblant les cellules tumorales (théorie du « cheval de Troie ») 23
   - Inhibition d'activités de détoxification 24
   - Ciblage de la mitochondrie 24
   - Utilisation de nanovéhicules 25
   - Potentialisation de la radiothérapie 25
   - Utilisation d'autres métaux de transition 26

B) Données pharmacologiques sur les dérivés du platine *27*

1. Données pharmacocinétiques 27
2. Pénétration à l'intérieur de la cellule 28
3. Activation intra-cytoplasmique 30
4. Formation d'adduits sur l'ADN génomique 31
5. Proportions des différentes lésions de l'ADN 32
6. Répercussions des lésions sur la structure de l'ADN 33
7. Cytotoxicité des différents types de lésions 34

C) Conséquences biologiques de la présence d'adduits du platine sur l'ADN *35*

1. Conséquences directes 35
   - Influence sur la transcription 36
   - Influence sur la réplication 37
2. Réparation des lésions 38
   - Cas de la voie NER 38
   - Cas du MMR 41
3. Induction de l'apoptose 43
   - Voie intrinsèque 44
   - Voie extrinsèque 45
   - Ciblage direct de la mitochondrie 45

D) Bases moléculaires de la résistance aux dérivés du platine *46*

1. Mécanismes empêchant les dérivés du platine d'atteindre l'ADN 47
   - Entrée du dérivé à l'intérieur de la cellule 47
   - Inactivation du dérivé par des agents intracellulaires 48
2. Mécanismes intervenant après la formation des lésions 49
   - Réparation accrue des dérivés du platine 49
   - Évasion apoptotique 50

II. INTERACTION DES ADDUITS PLATINÉS AVEC DES PARTENAIRES PROTÉIQUES 53

A) Interaction avec les protéines de réparation *53*

1. Interactions avec les protéines de la voie NER 53
   - XPC-HR23B 54
   - UV-DDB 55
   - RPA et XPA 58
2. Interactions avec les protéines de la voie MMR 59
3. Interaction avec les protéines de réparation des cassures simple-brin 59
4. Interactions avec les protéines de la réparation des cassures double-brin 60

B) Autres acteurs de la reconnaissance des lésions platinées *61*

1. Le facteur de transcription p53 61
2. Protéines à boîtes HMG 62
   - HMGB1 62

- hUBF ... 65
- SSRP1 ... 66
- LEF-1 ... 66
- SRY ... 67

3. Histone H1 ... 67
4. TBP ... 67
5. YB-1 ... 68

III. MÉTHODES D'ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE ADN LÉSÉ ET PROTÉINES ... 71

A) Caractérisation d'une interaction simple : une protéine/une lésion ... *71*

1. Retard sur gel (EMSA) ... 71
2. Autres techniques faisant appel à de l'ADN en phase homogène ... 73
3. Techniques faisant appel à de l'ADN immobilisé (analyses en phase hétérogène) ... 76
   - Résonance des plasmons de surface (SPR) ... 76

B) Identification d'un interactome ... *82*

1. *Ligand fishing* : principe et exemples ... 82
2. *Ligand fishing* : améliorations récentes ... 84
3. Puces à protéines ... 86

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE ... **89**

DÉTERMINATION DE L'INTERACTOME DES ADDUITS DU PLATINE ... **93**

I. MATÉRIEL & MÉTHODES ... 93

A) Construction et utilisation du système de ligand fishing ... *93*

1. Principe général ... 93
2. Protocoles détaillés ... 96
   - Production du plasmide ... 96
   - Linéarisation du plasmide ... 96
   - Marquage du plasmide à l'aide de dATP biotinylé ... 97
   - Introduction des lésions platinées ... 97
   - Fixation des sondes sur les billes ... 98
   - *Ligand fishing* ... 99

B) Analyse des protéines ... *101*

1. Coloration au nitrate d'argent ... 101
2. Immunodétection (*Western blotting*) ... 101
3. Protéomique ... 103
   - Principe général ... 103
   - Protocole détaillé ... 104

B) Quantification des lésions de l'ADN ... *105*

1. Principe général ... 105
2. Protocole détaillé ... 107
   - Préparation des standards de lésions platinées ... 107
   - Préparation de l'ADN pour le dosage des lésions ... 110
   - Dosage des adduits ... 110

II. RÉSULTATS ... 115

A) Optimisations du système de ligand fishing ... *115*

1. Préparation des sondes plasmidiques ... 115
   - Influence du DMSO ... 115
   - Optimisation de la concentration et de la durée d'exposition aux agents platinés ... 116
   - Agrégation des billes ... 119
2. Tests de capture de protéines choisies ... 120
3. Évaluation de deux méthodes de relargage des protéines piégées ... 121
4. Test préliminaire utilisant le mode de relargage total des protéines ... 124

B) Détermination de l'interactome des lésions platinées ... *124*

III. DISCUSSION ... 131

A) Considérations sur le protocole de piégeage des protéines ... *131*

1. Structure de la sonde et nature des lésions ... 131
2. Exhaustivité de la liste de protéines identifiées ... 132
3. Limitation des protéines non pertinentes ... 134
4. Aspect quantitatif ... 137
5. Bilan ... 137

B) L'interactome des lésions platinées : protéines connues et candidats originaux ... *139*

1. Membres de l'interactome déjà connus ... 139
2. Nouveaux membres de l'interactome ... 140
   - Le complexe PTW/PP ... 140
   - TRF2 et RIF1, protéines télomériques ... 144
   - Facteurs du remodelage de la chromatine ... 147

- MDC1 149
- ARF6 149

VALIDATION DES CAPACITÉS D'INTERACTION DE TOX4 PAR SPRI 151

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES 151
A) Description générale du dispositif *151*
1. La biopuce SPRi 151
2. Dispositif expérimental 153
B) Protocoles détaillés *156*
1. Prismes 156
2. Synthèse des séquences sondes et cibles 157
3. Platination des cibles 158
4. Dépôt des sondes sur le prisme par électropolymérisation 161
5. Analyse SPRi 162
6. Régénération totale de la biopuce 163

II. RÉSULTATS 165
A) Optimisation des paramètres expérimentaux *165*
1. Favoriser l'hybridation des sondes 165
2. Analyse de l'interaction sondes/protéine 167
B) Vérification de l'interaction d'HMGB1 avec les trois types d'adduits *169*
C) Évaluation des capacités de fixation de TOX4 sur les adduits platinés *171*

III. DISCUSSION 175
A) Remarques générales sur la technique *175*
1. Reproductibilité des interactions 176
2. Détermination des paramètres cinétiques de l'interaction 177
3. Utilisation de protéines recombinantes 178
B) Remarques générales sur les interactions observées *179*
1. Affinité d'HMGB1 pour les sondes platinées 179
2. Affinité de TOX4 pour les sondes platinées 181

ÉTUDE DE LA PROTÉINE DDB2 EN TANT QUE MEMBRE DE L'INTERACTOME DES ADDUITS DU CISPLATINE 183

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES 183
A) Principe général et stratégie expérimentale *183*
B) Cultures des lignées et tests de cytotoxicité *184*
1. Lignées cellulaires 184
2. Test de viabilité MTT 185
- Après exposition UVB 185
- Après exposition aux dérivés du platine 186

C) Ligand fishing et protéomique *186*
1. Démarche expérimentale 186
2. Exposition des lignées cellulaires au cisplatine 187
3. Extraction des protéines nucléaires 187
4. Préparation des sondes plasmidiques UV 188
5. Capture et analyse des protéines 188

D) SPRi *189*
E) Mesure des capacités de réparation après un stress génotoxique *189*
1. Principe général 189
2. Exposition des cellules au rayonnement UVB 189
3. Extraction de l'ADN cellulaire 190
4. Quantification des lésions UV 191
5. Traitement au cisplatine 192

F) Mesure de l'expression de gènes *192*
1. Culture des cellules 192
- Stress UVB 192
- Traitement au cisplatine 192

2. Extraction de l'ARN total 192
3. Rétrotranscription 193
4. PCR quantitative 194
- Test des amorces 194
- Validation du gène de ménage 195
- Mesure de l'expression de gènes d'intérêt 196

II. RÉSULTATS 197
A) Vérification de l'expression de DDB2 et sensibilité des lignées aux trois dérivés du platine *197*

B) Détermination de l'interactome des lésions UV et cisplatine à partir des extraits MDA MB 231 MC et DDB2+ *197*
1. Détermination préalable de la sensibilité des lignées au trois dérivés du platine 197
2. Mise au point des sondes plasmidiques UV 202
3. Évaluation préalable par immunodétection de l'interaction de DDB2 avec les sondes plasmidiques 202
4. Interactome des adduits du cisplatine 203
5. Interactome des photoproduits UV 205
C) Vérification par SPRi de l'affinité de DDB2 pour les lésions des dérivés du platine *207*
D) Évaluation des capacités de réparation des adduits de l'ADN selon le statut DDB2 ..... *208*
1. Détermination de la dose d'exposition aux UV par test de cytotoxicité 208
2. Mesure de la cinétique de réparation des adduits 209
3. Réparation des photoproduits UVB 209
4. Réparation des adduits majoritaires du cisplatine 212
5. Suivi de l'expression de *DDB2* au cours du temps 213
III. DISCUSSION 215
A) Tests de ligand fishing effectués à partir des extraits MDA MB 231 ..... *215*
1. Interactome des lésions du cisplatine 216
- Complexe PTW/PP 216
- TFAM 216
- DDB2 217
- TRF2 218
2. Interactome des lésions engendrées par le rayonnement UV 218
B) Cinétique de réparation des lésions *220*
1. Réparation des photoproduits 220
2. Réparation des pontages générés par le cisplatine 222
C) Cinétique d'expression de DDB2 suite aux traitements génotoxiques *224*
D) Réponse de nos modèles cellulaires aux tests de cytotoxicité *225*

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES **227**

ANNEXES **231**

Annexe 1 : Figures supplémentaires *231*
Annexe 2 : Liste des communications et publications *239*

BIBLIOGRAPHIE **279**

CLEF DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

ACN :	acétonitrile
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ADP :	adénosine-diphosphate
AIF :	*apoptosis-inducing factor*
AFSSAPS :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ARF6 :	*ADP-ribosylation factor 6*
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messager
ATM :	*ataxia-telangiectasia-mutated*
ATP :	adénosine-triphosphate
ATR :	*ATM- and RAD3-related protein*
BAF :	*barrier-to-integration factor*
B[a]P :	benzo[a]pyrène
BER :	*base excision repair* (réparation par excision de base)
bp35 :	Boîte de Petri de 35mm de diamètre
bp60 :	Boîte de Petri de 60mm de diamètre
BSA :	*bovine serum albumin* (albumine de sérum bovin)
CoA :	coenzyme A
ChIP :	*chromatin immunoprecipitation* (immunoprécipitation de la chromatine)
CLHP :	chromatographie liquide à haute performance
CMV :	cytomégalovirus
CS :	syndrome de Cockayne
C_t :	cycle seuil
CTR1 :	*copper transporter receptor 1*
DDB2 :	*DNA-damage binding protein 2*
DISC :	*death-inducing signaling complex*
DL_{50} :	dose létale 50
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DNA-PK:	*DNA-dependant protein kinase*
DTT :	dithiothréitol
EDTA :	acide éthylène diamine tetraacétique
emPAI :	*exponentially modified protein abundance index*
EMSA :	*electrophoretic mobility shift assay* (retard sur gel)
ERCC1 :	*excision repair cross-complementing 1*
ERK :	*extracellular-regulated kinase*
EtOH :	éthanol
FACT :	*facilitates chromatin transcription*
FDA :	*Food and Drug Administration*
FLIP :	*fluorescence loss in photobleaching*
FRAP :	*fluorescence recovery after photobleaching*
FRET :	*fluorescence resonance after energy transfer*
GFP :	*green fluorescent protein*
GST:	gluthation-S-transférase
HMGA :	*high mobility group AT-hook*
HMGB :	*high mobility group box*
HMGN :	*high mobility group-nucleosomal binding*
HR :	*homologous recombination* (recombinaison homologue)
HSP :	*heat shock protein* (protéine de choc thermique)
hUBF :	*human upstream biding factor*
ICP-MS :	*inductively coupled plasma mass spectrometry* (spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif)
LCP1 :	*Langerhans cell protein 1*
LEF-1 :	*lymphoid enhancing factor 1*
MAPK :	*mitogen-activated protein kinases*
MC :	*mock control*
MDC1 :	*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*
MMR :	*mismatch repair* (réparation des mésappariements de bases)

MNNG : N-méthyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine
MRP : *multidrug resistance protein*
MTA2 : *metastasis-associated protein*
MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tetrazolium
NER : *nucleotide excision repair* (réparation par excision de nucléotides)
NHEJ : *non-homologous end-joining*
NK : *natural killer*
ODN : oligonucléotide
ORF : *open reading frame*
ORL : oto-rhino-laryngologique
pb : paire de bases
PARP-1 : *poly [ADP-ribose] polymerase 1*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK : pyruvate déshydrogénase kinase
pI : point isoélectrique
PNUTS : *PP1 nuclear targeting subunit 1*
PPy : polypyrrole
PP1 : *serine/threonine-protein phosphatase 1*
qPCR : PCR quantitative
RAGE : *receptor for advanced glycation endproducts*
RE : reticulum endoplasmique
RET *resonance energy transfert* (transfert d'énergie par résonance)
RMN : résonance magnétique nucléaire
RO : récepteurs aux œstrogènes
ROI : région d'intérêt
ROS : *reactive oxigen species* (espèces réactives de l'oxygène)
RPA : *replication protein A*
RuvBL2 : *RuvB-like 2*
SDS-PAGE : *sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis*
SM : spectrométrie de masse
SM/SM : spectrométrie de masse en mode tandem
SMARCA : *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A*
SMC3 : *structural maintenance of chromosome protein 3*
SRY : *sex-determining region of Y chromosome*
SSBR : *single strand break repair* (réparation des cassures simple brin)
SSRP1 : *structure specific recognition protein 1*
TBE : tris-borate-EDTA
TBP : *TATA box binding protein*
TBP(Eu^{3+}) : tris-bipyridine cryptate d'europium
TEAA : acétate de triéthylamine
TFAM : *transcription factor A, mitochondrial*
TLK1 : *Tousled-like kinase 1*
TOX4 : *TOX HMGB family member protein 4*
TRF2: *telomeric repeat-binding factor 2*
UV : ultraviolet
V_{final} : volume final
WDR82 : *WD repeat-containing protein 82*
WLPP : complexe protéique WDR82/TOX4/PNUTS/PP1
XP : *xeroderma pigmentosum*
XPA : *xeroderma pigmentosum group A-complementing protein*
XPC : *xeroderma pigmentosum group C-complementing protein*
XPF : *xeroderma pigmentosum group F-complementing protein*
5-FU : 5-fluorouracile
8-oxo-dG : 7,8-dihydro-8-oxo-2′-désoxyguanine

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figures principales

Figure 1 : La molécule de cisplatine 14
Figure 2 : Étapes de la synthèse du cisplatine 15
Figure 3 : Réponses cellulaires aux dommages du cisplatine 16
Figure 4 : La molécule de carboplatine 18
Figure 5 : La molécule d'oxaliplatine 19
Figure 6 : Les molécules de satraplatine et de JM118 21
Figure 7 : La molécule de picoplatine 22
Figure 8 : Ciblage de cellules tumorales mammaires par le complexe œstradiol-platine (IV) 24
Figure 9 : Nanoparticules d'or pour la délivrance ciblée du cisplatine 26
Figure 10 : Transport actif du cisplatine à travers la membrane plasmique par CTR1 30
Figure 11 : Transformation intracellulaire du cisplatine et formation d'adduits sur l'ADN 32
Figure 12 : Déformations de l'ADN par la présence d'adduits platinés 35
Figure 13 : Mécanismes d'inhibition de la transcription par les adduits platinés 36
Figure 14 : Étapes des deux voies de la réparation par excision de nucléotides 40
Figure 15 : Apoptose induite par la voie de réparation des mésappariements de base 42
Figure 16 : Voies d'enclenchement de l'apoptose en réponse aux adduits platinés 44
Figure 17 : Mécanismes de résistances aux dérivés du platine 52
Figure 18 : La structure du complexe UV-DDB 56
Figure 19 : Liaison des domaines HMG de la protéine HMGB1 aux adduits 1,2-d(GpG)-cisplatine 64
Figure 20 : Les rôles multiples de la protéine HMGB1 65
Figure 21 : Le principe du retard sur gel 72
Figure 22 : Capacités de liaison de la protéine AAG sur les adduits du platine étudiées par retard sur gel d'après Kartalou *et al*., 2000 73
Figure 23 : La détection de l'interaction entre la protéine MutS et une liaison complexe grâce au transfert d'énergie par résonance d'après Lopez-Crapez *et al*., 2008 75
Figure 24 : Définition de l'angle de résonance des plasmons de surface 77
Figure 25 : Principe de la détection spectroscopique par résonance des plasmons de surface 78
Figure 26 : Principe de la mesure de variation de réflectivité 78
Figure 27 : Les capacités d'association de MutS pour différents motifs d'ADN mesurées par SPR par Sedletska *et al*., 2007 81
Figure 28 : Dissociation de MutS de différents motifs d'ADN mesurée par SPR par Sedletska *et al*., 2007 81
Figure 29 : Analogue photoréactif benzophénone du cisplatine (Guggenheim *et al*., 2009) 83
Figure 30 : Piège à protéines comportant un bras photoclivable mis au point par Hégarat et al., 2007 86
Figure 31 : Étapes de construction et d'utilisation du piège à protéines 93
Figure 32 : La préparation du plasmide pour construire le piège à protéines 95
Figure 33 : La fixation de l'ADN plasmidique sur les billes magnétiques 95
Figure 34 : Les étapes de l'analyse protéomique 104
Figure 35 : Les étapes de la procédure de dosage de lésions dans l'ADN 106
Figure 36 : Le quadripôle du spectromètre de masse permet la sélection de molécules 106
Figure 37 : Profils chromatographiques des standards de lésions platinées 1,2-d(GpG) 108
Figure 38 : Profils chromatographiques des standards de lésions platinées 1,2-d(ApG) 109
Figure 39 : Les structures des adduits platinés étudiés 112
Figure 40 : Structure de l'adduit cisplatine-DMSO 116
Figure 41 : Cinétique de formation des adduits du cisplatine sur plasmide 117
Figure 42 : Cinétique de formation des adduits du JM118 sur plasmide 117
Figure 43 : Cinétique de formation des adduits de l'oxaliplatine sur plasmide 118
Figure 44 : Capture spécifiques de protéines contrôle grâce au piège à protéines 120
Figure 45 : Protéines spécifiques et non spécifiques retenues par les différentes conditions du piège 121
Figure 46 : Mesure UV du relargage d'ADN fixé par la nucléase P1 123
Figure 47 : Répartition des populations de protéines identifiées de façon spécifique ou non spécifique lors des analyses protéomiques 125
Figure 48 : Classification fonctionnelle de l'interactome des adduits du platine identifié 126
Figure 49 : Confirmation par immunodétection de la présence de quatre membres de l'interactome sur l'ADN platiné 127

Figure 50 : Interaction entre TOX4 et PNUTS 142
Figure 51 : Modèle proposé pour la reconnaissance des adduits platinés par le complexe PTW/PP 144
Figure 52 : Modèle proposé pour la formation d'une boucle t à l'extrémité du télomère 146
Figure 53 : Schéma de l'assemblage de la séquence [sonde-cible lésée] à la surface du prisme SPRi 152
Figure 54 : Plans de dépôt des prismes SPRi 153
Figure 55 : Représentation schématique du système SPRi mis au point par le laboratoire CREAB 154
Figure 56 : Les différentes étapes d'une expérience de SPRi 155
Figure 57 : Vue d'ensemble de l'expérience de SPRi 156
Figure 58 : Purification chromatographique des oligonucléotides cibles 160
Figure 59 : Spectres de vérification de masse (MALDI-TOF) pour les oligonucléotides cibles 160
Figure 60 : Surface fonctionnalisée du prisme SPRi 161
Figure 61 : Hybridation des constructions [ODN cible-ZipC] sur la biopuce SPRi 166
Figure 62 : Mesure SPRi des interactions entre les séquences cibles et la protéine HMGB1 167
Figure 63 : Conversion en image des signaux d'hybridation des constructions oligonucléotidiques cibles 169
Figure 64 : Interaction d'HMGB1 recombinante (10 puis 25nM) avec les trois lésions platinées 170
Figure 65 : Hybridation séquentielle des cibles/sondes sur la troisième version de la biopuce supportant la fixation d'adduits platinés 171
Figure 66 : Capacités d'association/dissociation comparatives d'HMGB1, TOX4 et la BSA pour les adduits platinés 1,2-d(GpG) 172
Figure 67 : Affinité différentielle de HMGB1 pour l'adduit 1,-2d(GpG) généré par le cisplatine, l'oxaliplatine et le satraplatine mesuré par EMSA d'après les travaux de Vaisman *et al*., 1999 179
Figure 68 : Stratégie expérimentale d'étude de la protéine DDB2 en tant que membre de l'interactome des lésions de l'ADN 183
Figure 69 : La lignée parentale MDA MB 231 à faible et forte confluences 184
Figure 70 : Démarche expérimentale suivie pour l'établissement de l'interactome des lésions UV et cisplatine à partir des cellules MDA MD 231 186
Figure 71 : Les six photoproduits mesurés par CLHP-SM/SM 190
Figure 72 : Expression de DDB2 dans les sources de protéines nucléaires utilisées lors de notre étude 197
Figure 73 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ après exposition à des doses croissantes de cisplatine 199
Figure 74 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ après exposition à des doses croissantes d'oxaliplatine 200
Figure 75 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ après exposition à des doses croissantes de JM118 201
Figure 76 : DDB2 est efficacement retenue par le piège portant les dommages UVC mais pas par les adduits du cisplatine 203
Figure 77 : DDB2 n'interagit pas spécifiquement avec nos sondes platinées sur la biopuce SPRi 208
Figure 78 : Courbes de cytotoxicité des lignées MDA MB 231 MC et DDB2+ après exposition à des doses croissantes de rayonnement UVB 209
Figure 79 : Cinétique de réparation des photoproduits par la lignée MC 210
Figure 80 : Cinétique de réparation des photoproduits par la lignée DDB2+ 210
Figure 81 : Nombre de photoproduits générés par les UVB et restant après un temps de réparation de 48h00 sur les deux lignées MDA MB 231 211
Figure 82 : Cinétique de formation/réparation des adduits majoritaires du cisplatine sur les lignées cellulaires MDA MB 231 212
Figure 83 : Expression de *DDB2* dans la lignée DDB2+ à différents temps après exposition au rayonnement UVB mesurée par qPCR 214
Figure 84 : Expression de *DDB2* dans la lignée DDB2+ à différents temps après exposition au cisplatine mesurée par qPCR 214
Figure 85 : Cinétique de réparation des photoproduits après irradiation UVB de fibroblastes UVB de fibroblastes d'après Mouret *et al*., 2008 221
Figure 86 : Réparation équivalente des adduits du platine par deux lignées cellulaires exprimant ou n'exprimant d'après Barakat *et al*., 2009 223

Figures annexes

Contrôle par gel d'agarose de la fixation de l'ADN lésé sur les billes magnétiques 231
Chromatogrammes et spectres typiques obtenus lors de la quantification des lésions de l'ADN par CLHP-SM/SM 232-237

Tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples de posologies 20
Tableau 2 : Proportions des adduits formés sur l'ADN par le cisplatine, l'oxaliplatine et le carboplatine 33
Tableau 3 : L'interactome des adduits du platine 70
Tableau 4 : Quelques exemples de méthodes utilisées pour déterminer l'interactome de lésions de l'ADN 88
Tableau 5 : Les compositions des tampons évalués pour le protocole de piégeage de protéines 100
Tableau 6 : Les références et dilutions de travail des anticorps utilisés 102
Tableau 7 : Les gradients chromatographiques utilisés afin de purifier les standards de lésions platinées 108
Tableau 8 : Les gradients utilisés pour analyser les adduits platinés par CLHP-SM/SM 111
Tableau 9 : Transitions recherchées lors de l'analyse par CLHP-SM/SM 113
Tableau 10 : Pourcentage de répartition des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) selon les conditions de platination retenues 118
Tableau 11 : Nombres de lésions générées sur les lots de sondes plasmidiques 119
Tableau 12 : Nombres de protéines identifiées dans chaque échantillon lors des analyses protéomiques 124
Tableau 13 : Bilan des analyses protéomiques menées sur les sondes plasmidiques platinées 128-129
Tableau 14 : Avantages et inconvénients du protocole de *ligand fishing* 138
Tableau 15 : Séquences utilisées lors de la construction de la biopuce SPRi 157
Tableau 16 : Gradient utilisé pour la purification des oligonucléotides pyrrolés 158
Tableau 17 : Gradient utilisé pour la purification de l'oligonucléotide cible 158
Tableau 18 : Gradients utilisés pour la purification des oligonucléotides cibles platinés 159
Tableau 19 : Nombre de bp60 nécessaires pour chaque condition lors du test de réparation de lésions UV-induites 189
Tableau 20 : Transitions recherchées lors de l'analyse CLHP-SM/SM des CPD et (6-4)-PP 190
Tableau 21 : Nombre de bp60 nécessaires pour chaque condition lors de la mesure d'expression de gènes par qPCR suite à un stress UV 191
Tableau 22 : Séquence des amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitative 194
Tableau 23 : Nombre de lésions obtenues sur les plasmides irradiés par les UVC 202
Tableau 24 : Interactome des adduits du cisplatine isolé à partir d'extraits de cellules MDA MB 231 MC et DDB2+ préalablement traitées ou non au cisplatine 205
Tableau 25 : Interactome des photoproduits UVC isolé à partir d'extraits de cellules MDA MB 231 MC et DDB2+ préalablement traitées ou non au cisplatine 206
Tableau 26 : Comparaison de nos résultats avec ceux de Mouret *et al.*, 2008 concernant le nombre de lésions observées sur l'ADN génomique après irradiation UVB de fibroblastes 221

INTRODUCTION

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est constamment soumis à l'action d'agents chimiques ou physiques qui endommagent sa structure. Les lésions qui en résultent sont de natures très variées : petites lésions d'oxydation, adduits plus volumineux, sites abasiques, pontages, cassures mono- ou bicaténaires, etc. Lorsqu'elles ne sont pas réparées par les cellules, ces altérations contribuent à l'instabilité génomique et participent à des phénomènes tels que la cancérogénèse ou le vieillissement.

La thématique des recherches menées par le laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques » est axée sur les aspects physico-chimiques de la formation des dommages, leurs méthodes d'analyse, mais aussi leurs répercussions biologiques. Les lésions les plus étudiées par notre équipe sont celles générées par les radiations ionisantes, le stress oxydant, le rayonnement ultraviolet, les contaminants environnementaux et, plus récemment, les agents anticancéreux.

Beaucoup d'approches radio- et chimiothérapeutiques passent en effet par la génération de lésions sur l'ADN, destinées à supprimer les cellules tumorales. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, une nouvelle activité a été initiée au sein de notre laboratoire. Elle vise à analyser les protéines qui interagissent avec les lésions formées par les agents utilisés lors de ces traitements. La connaissance de telles protéines peut en effet s'avérer très utile pour élucider le mécanisme d'action de ces agents, leur toxicité, et les phénomènes de résistance susceptibles de survenir.

Ce travail de thèse s'est plus particulièrement intéressé aux lésions engendrées par les dérivés du platine, ainsi qu'aux méthodes permettant d'étudier les protéines qui leur sont associées. Cette classe thérapeutique, dont le chef de file est le cisplatine, est utilisée depuis plus de trente ans pour le traitement de cancers variés, tels que les tumeurs testiculaires, bronchiques, ovariennes, oto-rhino-laryngologiques (ORL) ou colorectales.

Le présent volume débutera avec une analyse bibliographique découpée selon trois axes. Le premier d'entre eux présentera les dérivés du platine, à travers leur historique, leur spectre d'utilisation et leurs mécanismes d'action, en accordant une place importante à la description des lésions de l'ADN formées. Le deuxième axe détaillera les protéines déjà connues possédant une affinité particulière pour les adduits générés par les dérivés du platine. Le troisième et dernier axe exposera les techniques couramment utilisées pour étudier les interactions entre ADN lésé et protéines. Nous insisterons particulièrement sur les méthodes les plus récentes qui autorisent un haut débit d'acquisition de résultats, et se rapprochent de celles que nous avons mises au point.

Cette analyse bibliographique sera suivie d'un chapitre rappelant la problématique et les objectifs de ce travail de thèse.

Ensuite, nous présenterons les trois volets expérimentaux développés lors de la thèse. Tout d'abord, nous décrirons la mise au point d'un système de piégeage de protéines (*ligand fishing*) couplé à une analyse protéomique et destiné à compléter l'interactome des lésions générées par trois dérivés du platine (cisplatine, oxaliplatine, satraplatine). Ensuite, nous montrerons la construction d'une biopuce destinée à la caractérisation individuelle, par *surface plasmon resonance imaging* (SPRi) d'interactions entre protéine et ADN lésé par ces trois dérivés du platine. Cette biopuce a été utilisée pour l'analyse des interactions avec la protéine *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), protéine déjà connue comme interagissant avec ces lésions. Elle a également été exploitée pour valider l'interaction d'une protéine identifiée à l'aide de l'approche de *ligand fishing*. Enfin, nous aborderons l'utilisation des deux microsystèmes précités ainsi que d'autres approches disponibles dans notre laboratoire pour la conduite d'une étude pilote centrée sur le rôle de la protéine *DNA damage-binding protein 2* (DDB2) dans la prise en charge des lésions déformantes de l'ADN (photoproduits et adduits du platine). Chaque partie sera découpée selon le même plan, débutant par la présentation des techniques expérimentales et protocoles, se poursuivant par un exposé des résultats obtenus, et s'achevant par une discussion critique de ces résultats.

Nous conclurons notre travail par un bilan des principaux apports de cette thèse ainsi qu'une évocation des perspectives qui en découlent.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les agents anticancéreux dérivés du platine

Les dérivés du platine forment une classe de médicaments chimiothérapeutiques ciblant l'ADN et formant sur celui-ci des lésions aux conséquences néfastes pour la cellule cancéreuse. Ces molécules figurent aujourd'hui parmi les agents antinéoplasiques les plus utilisés dans le monde contre les tumeurs solides, puisqu'ils sont présents dans 70% des traitements tous cancers confondus (Ang *et al.*, 2005). Ils sont aussi parmi les plus étudiés, avec une littérature disponible considérable s'étalant sur les cinq dernières décennies. Ces molécules incontournables restent pourtant mal connues sur certains aspects, parmi lesquels : les mécanismes exacts expliquant leur cytotoxicité, la sensibilité plus importante de certains types de tumeurs, les résistances intrinsèques ou acquises d'autres tumeurs.

Au cours de cette première partie, nous présenterons le cisplatine, composé historique à l'origine de cette famille d'anticancéreux, puis nous décrirons les principaux analogues synthétisés à sa suite pour palier à ses limites. En second lieu, nous décrirons les aspects pharmacologiques de leur utilisation clinique, en insistant sur les mécanismes cytotoxiques enclenchés par la formation de lésions sur l'ADN et sur les phénomènes de résistance susceptibles d'être observés.

A) Généralités sur les principaux dérivés du platine

1. Le cisplatine, complexe coordonné du platine historique

La découverte fortuite de la cytotoxicité du cisplatine, ou *cis*-diamine-dichloroplatine (II), date de 1965 et a été réalisée lors d'expériences menées par l'équipe de Barnett Rosenberg (1926-2009) portant sur les effets de champs électromagnétiques sur la division de bactéries (Rosenberg *et al.*, 1965). Une diminution de la turbidité du milieu de culture, correspondant à une diminution de la population bactérienne, était alors observée. Après examen microscopique, il fut constaté que la taille des bactéries augmentait considérablement (plus de 300 fois la longueur normale) après application du champ électromagnétique, et qu'elles devenaient incapables de se diviser. L'origine de ce phénomène n'était pas le champ en lui-même, mais les électrodes de platine que l'on avait utilisées pour le générer. En effet, l'électrolyse libérait dans le milieu une molécule au pouvoir oxydant et capable d'attaquer ces électrodes. Ceci a pu être démontré en réalisant l'électrolyse dans un milieu sans bactéries, puis en le transférant dans une chambre contenant des cellules : celles-ci se trouvèrent affectées de la même manière que lors de la première observation. Il ne restait qu'à identifier précisément le ou les responsables, à savoir deux sels de platine solubles dont le cisplatine (Rosenberg *et al.*, 1967).

Cette molécule était pourtant déjà connue depuis 120 ans, puisqu'elle avait été synthétisée par le chimiste italien Michele Peyrone (1813-1883) dans le laboratoire du baron Justus von Liebig à Geissen (Allemagne), et en avait pris le nom : sel de Peyrone (Arnesano & Natile, 2009). Bien avant qu'on lui découvre une activité cytotoxique, sa structure ainsi que celle de son isomère *trans* avaient été déterminées en 1893 par le suisse Alfred Werner (1866-1919), lors de ses travaux sur la configuration géométrique des complexes contenant des métaux de transition qui lui valurent le prix Nobel en 1913 (Lippard, 1982). Elle se compose d'un noyau de platine et de deux types de ligands en configuration *cis* : deux ligands chlore susceptibles d'être remplacés par des groupements aqua, rendant ainsi la molécule réactive vis-à-vis de groupements nucléophiles, et deux ligands amine qui participent au transport et à la stabilité du cisplatine (Figure 1).

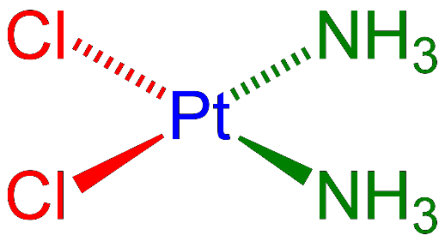


Figure 1 : La molécule de cisplatine, composée d'un noyau métallique de platine (bleu), ainsi que de deux ligands chlore labiles par aquation (rouge) et deux ligands amine transporteurs (vert) en configuration *cis*.

Le pouvoir anticancéreux du cisplatine sur certains types de tumeurs solides fut rapidement identifié, puisque l'équipe de Rosenberg rebondit sur ses observations préliminaires et testa plusieurs dérivés sur des tumeurs murines (lignées de sarcome et leucémique), dont ils observèrent une diminution significative de la masse (Rosenberg *et al.*, 1969). Les premiers tests cliniques suivirent (1971), puis en 1978 la société pharmaceutique Bristol-Myers obtint l'autorisation de la *Food and Drug Administration* (FDA) d'utiliser le cisplatine (vendu sous la dénomination commerciale Platinol®) pour le traitement des cancers testiculaires, ovariens et ORL.

Les méthodes de synthèse aujourd'hui employées pour la production du médicament sont toutes basées sur la méthode de Dhara publiée en 1970 (Alderden *et al.*, 2006), et qui débute avec le tétrachloroplatinate de potassium (II). Les grandes étapes de cette procédure sont illustrées par la Figure 2.

L'hypothèse faisant de l'ADN la cible privilégiée des dérivés du platine suivit de près cette approbation (Roberts & Thomson, 1979) et, depuis, sa présence au sein de traitements chimiothérapeutiques est très fréquente. L'on peut donc parler de réel succès médical et commercial, puisque les anticancéreux à base de platine généraient en 2006 environ 1,5 milliards d'€ de chiffre d'affaire à travers le monde (Alderden *et al.*, 2006), sans compter les sommes investies dans la recherche d'analogues du cisplatine susceptibles de présenter une activité intéressante.

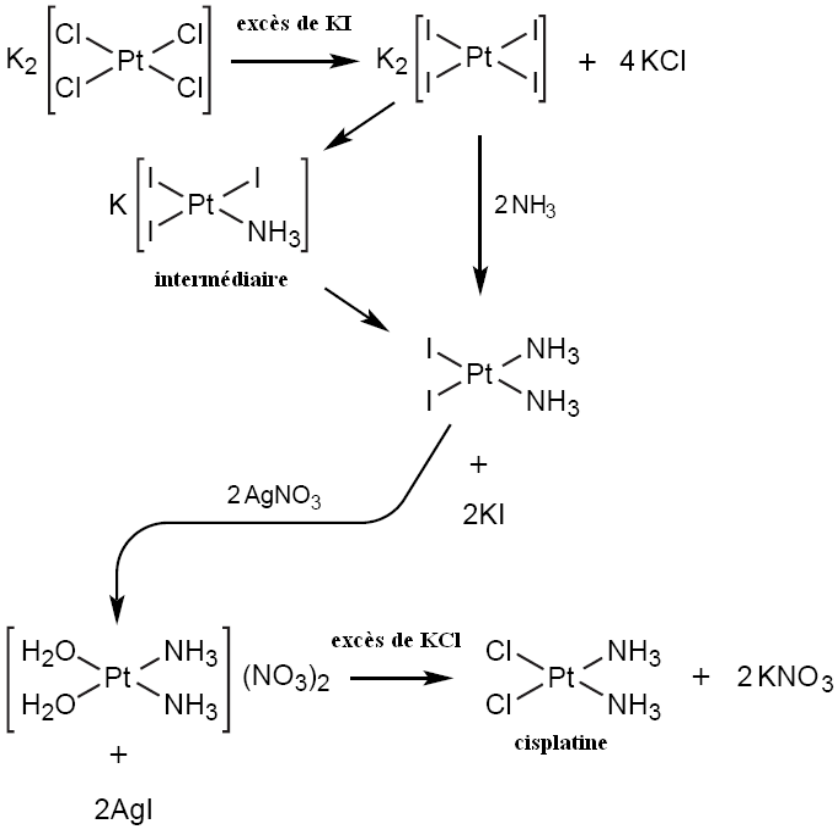


Figure 2 : Les étapes principales de la synthèse du cisplatine selon la méthode de Dhara, utilisant le tétrachloroplatinate de potassium (II) comme précurseur (adapté de Alderden *et al*., 2006).

Les grandes étapes résumant le mode d'action cytotoxique principal du cisplatine sont présentées sur la Figure 3. À l'instar des agents chimiothérapeutiques alkylants dont il est proche, le cisplatine forme des produits d'addition (adduits) entre deux bases proches sur l'ADN génomique après pénétration intracellulaire puis activation de la molécule par perte de ses ligands chlore. Ces lésions modifient la structure hélicoïdale de l'ADN, peuvent induire des dommages secondaires (cassures simple- et double-brin) et perturbent les fonctions biologiques normales de transcription et réplication. Les dommages de l'ADN peuvent être pris en charge par des systèmes de réparation, et dans le cas des adduits du platine, c'est la réparation par excision de nucléotides (NER) qui intervient et permet aux cellules de restaurer l'intégrité de leur génome.

Lorsque les capacités de réparation sont dépassées par l'ampleur des dommages ou limitées à cause d'un défaut dans l'expression d'un ou plusieurs facteurs, les lésions engendrent des effets délétères : limitation de la prolifération cellulaire (activité importante des cellules cancéreuses), enclenchement des voies apoptotiques et/ou nécrose. Soulignons que les dérivés du platine sont aussi capables de cibler d'autres biomolécules (ARN, protéines, espèces contenant un groupement sulfhydrile), mais les conséquences biologiques en sont mal connues. L'ensemble de ces phénomènes sera détaillé dans la suite de ce manuscrit lorsqu'il sera question des aspects pharmacologiques des dérivés du platine.

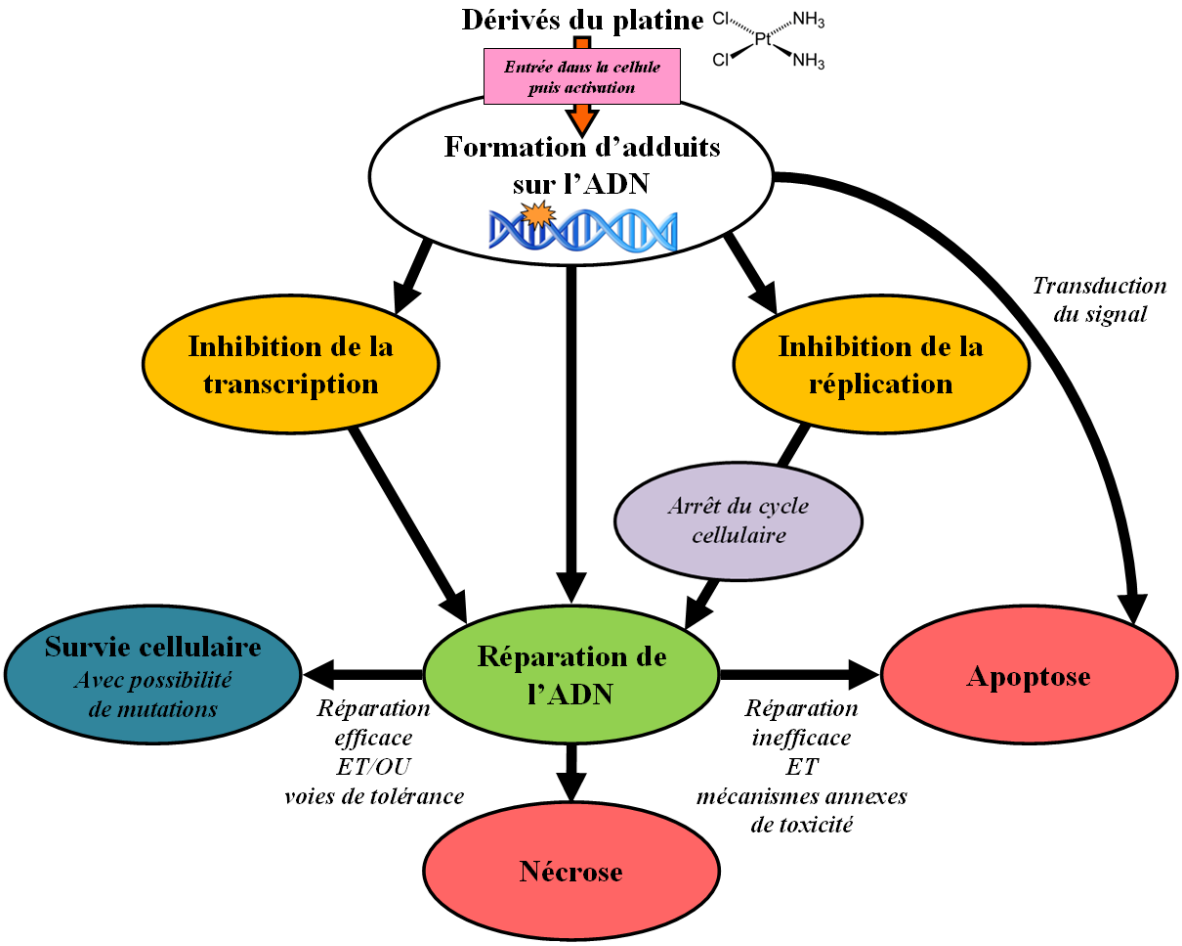


Figure 3 : Réponses de la cellule après avoir subi des dommages à l'ADN par le cisplatine. En cas de saturation des voies de réparation et/ou de leur incapacité à traiter les lésions, ces dernières entraînent la cellule vers la mort, programmée ou non. Lorsque les adduits sont efficacement réparés, la cellule survit tout en conservant son intégrité génomique. Enfin, si les voies d'engagement vers l'apoptose ne sont plus fonctionnelles alors que les capacités de réparation et/ou de synthèse translésionnelle sont actives, la cellule va pouvoir survivre, en ayant potentiellement intégré des mutations.

Le cisplatine est indiqué pour le traitement de plusieurs types de cancers. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus contre les tumeurs testiculaires (2002 nouveaux cas en France en 2005, 82 décès : source Institut de Veille Sanitaire), où il permet d'atteindre chez les patients possédant un bon pronostic des taux de guérison supérieurs à 90%, mais s'avère également efficace pour les formes métastatiques, habituellement résistantes aux drogues pro-apoptotiques (Einhorn, 2002). Il est aussi employé fréquemment (avec un succès moindre) contre les cancers bronchiques à petites cellules, ORL, ovariens, et de la vessie (Kartalou & Essigmann, 2001b; Rabik & Dolan, 2007).

Il faut insister sur le fait que l'utilisation du cisplatine et de ses dérivés se fait généralement en combinaison avec d'autres médicaments ou d'autres approches thérapeutiques (radiothérapie, chirurgie) (Muggia, 2009). Parmi les classes de médicaments actuellement utilisées en combinaisons additives ou synergiques avec le cisplatine, nous pouvons citer les antimétabolites, les taxanes, et les inhibiteurs de topoisomérases (Crul *et al.*,

2002). Ainsi, par exemple, l'étoposide (inhibiteur de la topoisomérase II) complémente le complexe métallique pour le traitement des cancers des testicules. Pour les cancers de la sphère ORL le cisplatine est employé en combinaison avec le 5-fluorouracil (5-FU, antimétabolite analogue de l'uracile qui interfère avec la synthèse d'ADN et d'ARN) dans le cadre de thérapies de type néoadjuvant visant à préserver la fonction des organes touchés tels que le larynx, le pharynx et la langue. Le but est ici de remplacer la chirurgie, dont les taux de survie sont similaires mais qui est plus agressive pour les tissus, par une chimiothérapie ensuite complétée par une radiothérapie (Cullen *et al.*, 2007).

L'efficacité du cisplatine doit être relativisée par l'existence de limitations à deux niveaux : résistances de certains types de cancers, et effets secondaires importants. Tout d'abord, les traitements initiaux employant le cisplatine ont mis en évidence des capacités de résistances, intrinsèques ou acquises. Le cancer colorectal, par exemple, se trouve résistant à toute exposition au cisplatine. Des cas de tumeurs ovariennes primaires, par exemple, montrent aussi une capacité à supporter une chimiothérapie incluant le cisplatine, alors que d'autres sont susceptibles de rechute après un traitement initial *a priori* efficace. Après une réponse initiale au traitement pourtant positive dans près de 70% des cas, la survie à cinq ans n'est en effet que de 15 à 20% du fait de ces phénomènes de résistance. Pour les cancers bronchiques à petites cellules, le taux de rechute peut dépasser les 90% (Siddik, 2003). Les bases moléculaires de ces phénomènes de résistance feront l'objet d'une description qui suivra celle du mode d'action des agents platinants.

L'administration du cisplatine s'accompagne aussi de la manifestation d'effets secondaires qui s'avèrent être des freins majeurs à son emploi : nausées, vomissements, neurotoxicité chronique, ototoxicité (notamment par une atteinte de l'oreille moyenne), et surtout néphrotoxicité sévère et irréversible liée à la forte clairance du médicament par les reins, qui entraîne une accumulation tissulaire responsable du blocage des fonctions des tubules proximaux.

La remarquable efficacité du cisplatine, mais aussi ses limitations, ont conduit à rechercher des analogues de cette molécule qui posséderaient un spectre d'action thérapeutique différent, parviendraient à contourner les phénomènes de résistance, présenteraient des effets secondaires moins sévères, ou dont les propriétés physico-chimiques faciliteraient l'administration clinique. Ceci a mené à des prospections en chimie inorganique visant à la synthèse de tels analogues du platine. De plus, certains composés contenant des métaux voisins du platine au sein de la table périodique des éléments, tels que le palladium, l'or et surtout le ruthénium ont aussi été évalués (Kelland, 2007).

Des tentatives de relation structure/activité ont apporté dès 1973 des règles de base définissant les caractéristiques de tout composé platiné supposé cliniquement efficace : géométrie plan-carrée, présence de deux substituants labiles en conformation *cis*, présence de ligands amine non hydrolysables, neutralité de charge afin de faciliter la diffusion à travers la membrane plasmique (Hambley, 1997). Bien sûr, des exceptions à ces règles ont été observées maintes fois depuis (Todd & Lippard, 2009).

2. Autres exemples de dérivés du cisplatine

Des milliers de composés ont été obtenus en faisant varier le ligand transporteur (afin d'améliorer la stabilité de la molécule pour limiter sa réactivité avec d'autres biomolécules que l'ADN, et donc cibler ce dernier) et/ou le ligand hydrolysable. Quelques dizaines d'entre eux ont montré une activité antitumorale intéressante, et seules deux molécules ont franchi avec succès les tests cliniques pour obtenir une autorisation de mise sur le marché de la part de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) et de plusieurs autorités étrangères : le carboplatine et l'oxaliplatine. Nous allons maintenant en résumer les caractéristiques principales.

- Carboplatine ou *cis*-1,1-cyclobutane-dicarboxylato-diamine-platine (II)

Le carboplatine (Figure 4) est la première molécule dite de deuxième génération, développée à la suite du cisplatine et présentant une activité clinique intéressante. Elle fut approuvée dès 1989 aux États-Unis et en France et vendue par Bristol-Myers-Squibb sous le nom Paraplatine®. Le carboplatine génère les mêmes adduits que le cisplatine, quoique dans des proportions différentes. En effet, son groupement 1,1-cyclobutane-dicarboxylate est moins à même d'être remplacé par des molécules d'eau, ce qui rend la molécule plus stable et donc moins réactive vis-à-vis de l'ADN (Blommaert *et al.*, 1995; Arnesano & Natile, 2009).

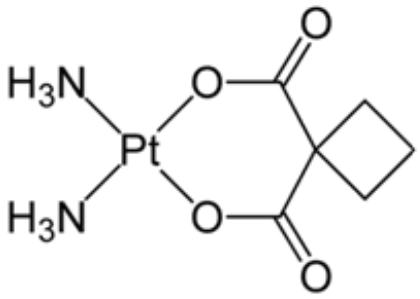


Figure 4 : Structure du carboplatine.

L'avantage principal du carboplatine est une toxicité réduite. Il ne présente aucune néphrotoxicité et est moins néfaste pour le tractus intestinal. L'ototoxicité est également diminuée, notamment du fait de l'entrée réduite de la molécule dans les cellules de l'organe de Corti (Muggia, 2009), ce qui souligne le rôle de certains transporteurs dans la pénétration intracellulaire de la drogue. Cependant, le carboplatine possède son propre effet secondaire, une myélosuppression (thrombocytopénie principalement) dose-dépendante et qui peut donc amener à adapter la posologie (Boisdron-Celle *et al.*, 2001; Guminski *et al.*, 2002).

La conséquence clinique de sa réactivité réduite par rapport au cisplatine est la nécessité d'administrer des doses 20 à 40 fois plus élevées que pour ce dernier (Blommaert *et al.*, 1995), la cinétique de formation des lésions étant inférieure à celle du cisplatine d'un

facteur 10. Le carboplatine est utilisé pour le traitement de tumeurs similaires à celles ciblées par le cisplatine : cancers de l'ovaire, de la sphère ORL, cancers bronchiques à petites cellules. Le traitement de cancers ovariens est aussi concerné (Kelland, 2007), en combinaison avec le paclitaxel (taxane poison du fuseau).

- Oxaliplatine ou cyclohexane-1,2-diamine-éthanedioate-platine (II)

L'oxaliplatine (Figure 5) possède un groupement 1,2-diaminocyclohéxane (DACH), présent sur l'adduit, et un groupement oxalate qui est libéré lorsque la molécule réagit avec l'eau, à l'instar des chlores du cisplatine, afin de former le métabolite actif DACH-dichloro-platine. Les premiers essais de synthèse de molécules comprenant un groupement DACH et possédant une activité antitumorale datent de 1972. Cependant, leur faible solubilité dans l'eau conduisit à des améliorations concernant ce point particulier, ce qui permit d'aboutir à l'oxaliplatine (Stordal *et al.*, 2007).

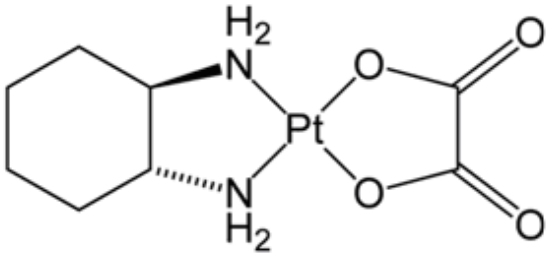


Figure 5 : Structure de l'oxaliplatine.

La molécule a reçu l'approbation de l'AFSSAPS en 1996 puis de la FDA en 2002 (Eloxatin® par Sanofi-Aventis). L'oxaliplatine est efficace pour le traitement des cancers colorectaux, particulièrement susceptibles aux résistances intrinsèques au cisplatine à cause de la perte de fonctionnalité du système de réparation des mésappariements de base (MMR). La sensibilité de certains types cellulaires serait aussi due en partie à la surexpression de transporteurs de cations organiques dont l'expression augmente sélectivement la pénétration de l'oxaliplatine et sa cytotoxicité, effets qui ne sont pas visibles pour le cisplatine et le carboplatine (Zhang *et al.*, 2006). À concentrations égales, l'oxaliplatine forme moins d'adduits que le cisplatine mais apparaît équipotent, notamment car il génère plus de lésions secondaires de type cassures simple- et double-brin (Faivre *et al.*, 2003). Il est surtout utilisé en combinaison avec le 5-FU et le folinate de calcium. Un des effets secondaires caractéristiques de l'utilisation de l'oxaliplatine est une neuropathie périphérique sensorielle, amplifiée par une exposition au froid (Kelland, 2007).

Le Tableau 1 présente des exemples de posologies utilisées couramment en clinique pour les dérivés majeurs (cisplatine, carboplatine et oxaliplatine) et pour le traitement de tumeurs variées. D'autres médicaments anticancéreux y sont bien sûr adjoints.

TYPE DE CANCER	POSOLOGIE
Tumeurs germinales testiculaires	*Protocole BEP* bléomycine 30mg à J1, J8 et J15 etoposide 100mg/m²/J de J1 à J5 cisplatine 20mg/m²/J de J1 à J5 reprise à J22, 2-3 cures au total
Cancer du poumon non à petites cellules **Cancer ovarien**	*Protocole CARBO/TAXOL* carboplatine AUC 4 ou 5 en 02h00 à J1 paclitaxel 175mg/m² en 03h00 à J1 reprise à J22, 4-6 cures au total
Cancer du côlon	*Protocole FOLFOX4* oxaliplatine 85mg/m² en 02h00 à J1 acide folinique 200mg/m² en 02h00 à J1 et J2 puis 5-FU bolus 400mg/m² à J1 et J2 puis 5-FU 600mg/m² en perfusion continue de 22h00 à J1 et J2 reprise à J15, 12 cures au total

J = jour ; AUC = *area under the curve* (aire sous la courbe, représentant la concentration plasmatique d'un médicament en fonction du temps)

Tableau 1 : Quelques exemples de posologies mettant en œuvre chacun des dérivés du platine utilisés en clinique en combinaison avec d'autres médicaments anticancéreux (source : Réseau régional de cancérologie de Lorraine ONCOLOR ; Association française d'urologie).

En marge des trois dérivés déjà approuvés pour une utilisation clinique, d'autres dérivés ont fait ou font toujours l'objet d'études et de tests cliniques particulièrement approfondis. Nous en avons sélectionné cinq parmi les plus marquants.

- Satraplatine ou bis-acétato-amine-dichloro-(cyclohexylamine) platine (IV) ou JM216

L'objectif principal du développement de cette classe de nouveaux dérivés était d'augmenter la biodisponibilité orale du platine, améliorant le confort du patient tout en réduisant les coûts associés au traitement chimiothérapeutique (administration par voie intra-veineuse dans un cadre hospitalier). Le satraplatine (Figure 6) est un complexe de platine (IV), donc relativement peu réactif quant à la substitution de ses ligands par rapport aux composés platine (II). Ceci a pour effet de le rendre plus stable, notamment dans un environnement tel que les voies gastro-intestinales, à l'inverse du milieu intracellulaire où il

peut être plus facilement réduit. Pour les mêmes raisons, la molécule est peu réactive avec les protéines plasmatique, ce qui contribue à augmenter sa biodisponibilité (Bell *et al.*, 2008).

En outre, la présence de deux groupements acétate axiaux rend le composé plus lipophile, facilitant ainsi son passage à travers les membranes cellulaires, et l'un des deux groupements amine a été remplacé par un cyclohéxylamine, formant une molécule asymétrique.

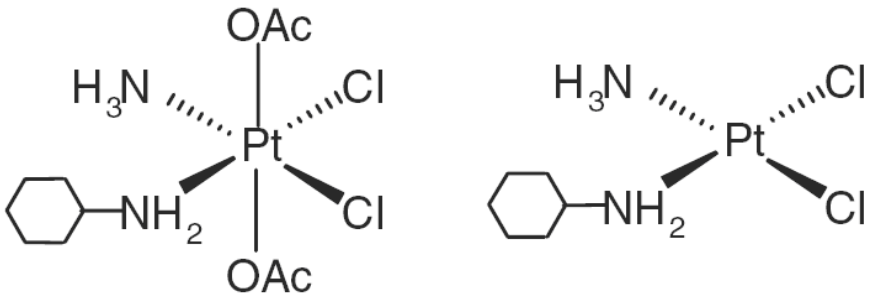


Figure 6 : Le satraplatine (à gauche) et son métabolite actif JM118 (à droite), produit après réduction intrasystémique.

Le satraplatine est donc une prodrogue dont l'activation se fait en deux étapes. Après son passage dans la circulation sanguine et sa réduction par la perte de ses deux groupements acétate, on obtient plusieurs métabolites, le majoritaire étant le JM118 ou *cis*-ammine-dichloro-(cyclohexylamine)-platine (II), qui pénètre à l'intérieur des cellules puis des noyaux pour venir se lier à l'ADN d'une manière très similaire à celle du cisplatine. Les conséquences de l'isomérie d'orientation des adduits de la molécule (Hartwig & Lippard, 1992) sur la toxicité et le pouvoir mutagène du satraplatine ainsi que sur la réparation de ses adduits ne paraissent pas avoir été étudiées. Elles ne peuvent toutefois être exclues puisque, par exemple, dans le cas des adduits du benzo[a]pyrène (B[a]P) la protéine de reconnaissance de lésions XPC (*xeroderma pigmentosum group C-complementing protein*) présente une affinité variable selon l'isomère généré (Mocquet *et al.*, 2007).

Le satraplatine est en cours de tests sur l'homme depuis 1993 (McKeage *et al.*, 1995; Lovejoy & Lippard, 2009) et a atteint la phase III d'essais cliniques pour les cancers de la prostate réfractaires aux traitements hormonaux (Ang *et al.*, 2005; Todd & Lippard, 2009). Ce médicament montre également des effets sur des cas de tumeurs ovariennes, mammaires et bronchiques à petites cellules. À l'inverse, aucune réponse n'est observée pour les cancers bronchiques non à petites cellules, fortement chimiorésistants. Son administration *per os* est dépendante des capacités d'assimilation au niveau du tractus digestif, qui est variable selon les patients et entraîne une pharmacocinétique non linéaire (Lansiaux & Bailly, 2000). Les effets secondaires significatifs de type nephrotoxicité ou neurotoxicité paraissent également réduits, mais des phénomènes de myélosuppression (thrombocytopénie, neutropénie) réversibles restent limitants, à l'instar du carboplatine. Le pouvoir émétisant est aussi limité par rapport aux autres dérivés.

- Picoplatine ou *cis*-amine-dichloro-2-méthylpyridine platine (II)

Le picoplatine (Figure 7) diffère du cisplatine par le remplacement de l'un des groupements amine par un groupement 2-picoline. Le rôle de cette modification est d'empêcher l'inactivation de la molécule par les composés contenant des groupements thiol, augmentant la durée de vie et donc la disponibilité de la molécule (Eckardt *et al.*, 2009). Son utilisation est envisagée pour les cas de cancers résistants au cisplatine et au carboplatine. En 2009, cette molécule se trouve en essais cliniques de phase III pour le traitement de cancers pulmonaires à petites cellules, montrant un potentiel intéressant y compris en cas de rechute après traitement chimiothérapeutique initial (Arnesano & Natile, 2009), en phase I pour le cancer colorectal, et en phase II pour le cancer de la prostate (Lovejoy & Lippard, 2009). Elle est administrée par voie intraveineuse ou orale, et ses effets secondaires sont similaires à ceux du satraplatine.

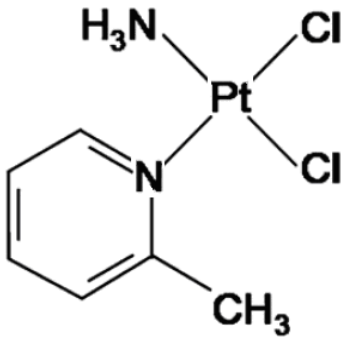


Figure 7 : Structure du picoplatine.

- Nedaplatine ou *cis*-diamine-glycolatoplatine (II)

Ce dérivé a été approuvé depuis une quinzaine d'années, exclusivement au Japon, pour le traitement de cancers de la sphère ORL, ovariens et bronchiques. Synthétisé avec l'objectif d'obtenir une molécule moins néphrotoxique (il est 10 fois plus soluble dans l'eau que le cisplatine), son utilisation est limitée par l'induction de myélosuppression (Kuwahara *et al.*, 2009).

Enfin, deux autres dérivés d'intérêt clinique peuvent être cités ici. Le premier, nommé heptaplatine, a été approuvé en Corée du Sud pour soigner les cancers gastriques, et montre également une certaine efficacité contre les carcinomes cutanés spinocellulaires (Lee *et al.*, 2006). Le lobaplatine, quant à lui, a été approuvé en Chine pour le traitement de leucémies myéloïdes chroniques et pour les cas non opérables de cancers bronchiques à petites cellules et cancers du sein métastatiques (Perabo & Muller, 2007).

Précisons également que des recherches sont actuellement menées sur les activités antitumorales de complexes de platine multinucléaires (possédant plusieurs atomes de platine)

tel que le BBR3464 (triplatine). Des investigations visant à tester les propriétés d'autres ligands et d'autres configurations (composés *trans*) sont également en cours, montrant que les ressources en synthèse chimique sont loin d'être épuisées (Coley *et al.*, 2008).

3. Stratégies originales faisant appel à des dérivés du platine

Devant la difficulté croissante d'identifier de nouveaux dérivés du platine efficaces, d'autres stratégies ont été expérimentées, faisant appel au couplage de l'un des dérivés ayant déjà fait ses preuves à d'autres molécules susceptibles d'en améliorer l'efficacité, ou à leur utilisation concomitante. De nombreuses molécules et méthodes ont déjà être décrites, et aucune d'entre elle n'a à l'heure actuelle franchi le stade des essais cliniques. Seuls quelques exemples significatifs de ces approches à fort potentiel vont être successivement présentés ici. Les avantages qu'ils possèdent sont de plusieurs natures : augmentation du taux de lésions de l'ADN ; utilisation de prodrogues ciblant certains tissus ; inhibition d'activités de détoxification ; ciblage de la mitochondrie ; potentialisation de la radiothérapie ; utilisation d'autres métaux de transition.

- Renforcement de la production de lésions de l'ADN

Des analogues fonctionnels Cu(3-Clip-Phen) de la bléomycine (glycopeptide induisant des cassures simple- et double-brin) possèdent la capacité de générer des cassures simple-brin mais pas de cassures double-brin, hautement cytotoxiques. Le couplage d'une espèce proche du cisplatine aux dérivés Cu(3-Clip-Phen) rend la molécule résultante capable de former des adduits semblables à ceux du cisplatine, ainsi que de linéariser des plasmides en conditions réductrices. Plusieurs versions de la molécule hybride ont été évaluées sur des lignées cellulaires cancéreuses, dont certaines présentaient des activités cytotoxiques et anti-migratoires intéressantes (inhibant le processus de colonisation qui se manifeste lors de l'installation de métastases) (Ozalp-Yaman *et al.*, 2008).

- Utilisation de prodrogues ciblant les cellules tumorales (théorie du « cheval de Troie »)

Cette stratégie a pour objectif de concevoir des molécules de platine (IV) qui serviront de prodrogues, converties en molécules platine (II) actives uniquement après avoir atteint leur cible. Plusieurs exemples peuvent être cités. Ainsi, une équipe du laboratoire de Stephen Lippard a généré à partir d'un même précurseur plusieurs complexes platinés conjugués à l'œstradiol (Barnes *et al.*, 2004). Ce concept découle d'une corrélation établie entre la sensibilité au cisplatine de cellules possédant des récepteurs à œstrogènes, et la surexpression par ces cellules de la protéine HMGB1 (He *et al.*, 2000a). Celle-ci, on le verra dans la deuxième partie de cette analyse bibliographique, joue un rôle non négligeable dans la

médiation de la toxicité du cisplatine. De ce fait, le triple but d'une telle molécule platinée hybride est de cibler certains types cellulaires (présence des récepteurs), puis délivrer lors de son hydrolyse à la fois une dose de cisplatine générant les adduits cytotoxiques et une dose de stéroïdes afin d'obtenir un effet physiologique recherché, ici la surexpression de la protéine HMGB1 (Figure 8).

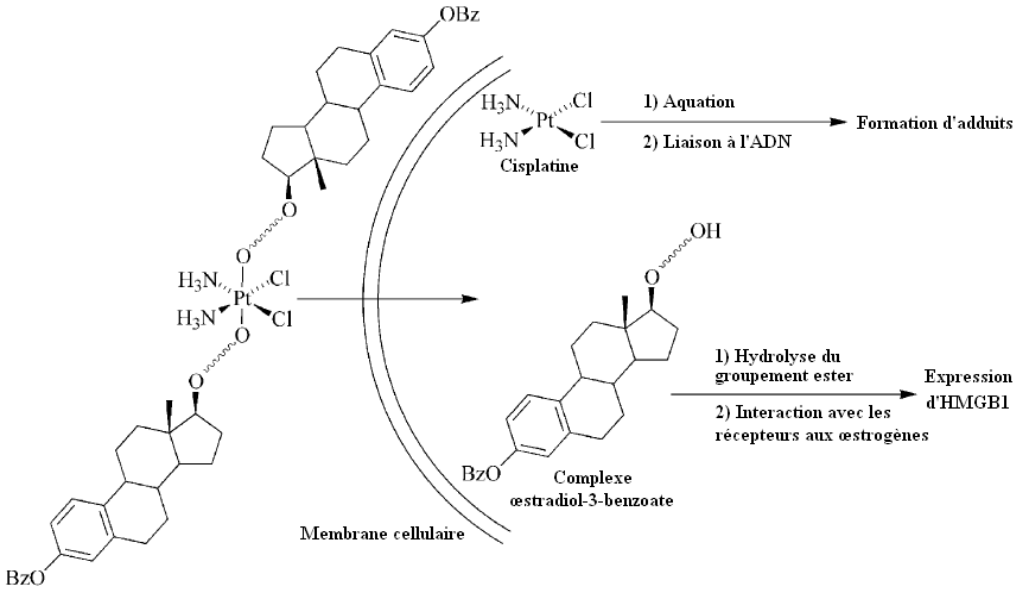


Figure 8 : L'utilisation d'un complexe œstradiol-platine (IV) permet de cibler préférentiellement des cellules tumorales mammaires surexprimant des récepteurs aux œstrogènes (adapté de Barnes *et al*., 2004).

- Inhibition d'activités de détoxification

Ce type d'approche peut par exemple mettre en œuvre un couplage [dérivé du platine-acide éthacrynique] (Ang *et al.*, 2005). La molécule résultante libère lors de sa réduction *in cellulo* deux équivalents d'acide éthacrynique, un diurétique qui est aussi un inhibiteur d'enzymes de la famille de la gluthation-S-transférase (GST). Ces enzymes sont notamment impliquées dans la détoxification de xénobiotiques dans le cytoplasme par transfert sur ceux-ci d'une molécule de glutathion réduite, facilitant leur élimination. Les GST sont souvent surexprimées dans des lignées résistantes au cisplatine comme cela sera décrit plus loin. L'activité de plusieurs isozymes de la GST se trouve efficacement inhibée après exposition de cellules tumorales pulmonaires à l'éthacraplatine, confirmant l'intérêt d'une telle molécule. Des analyses par spectrométrie de masse montrent la formation de complexes GST-éthacraplatine ou GST-acide éthacrynique, qui inhibent ces enzymes.

- Ciblage de la mitochondrie

Plusieurs stratégies ont été imaginées pour cibler cette organelle, et nous n'en aborderons qu'une. La plupart des cellules composant les tumeurs solides, se trouvant dans un

environnement hypoxique, se tournent vers la glycolyse en remplacement du cycle de Krebs afin de produire l'énergie nécessaire : c'est l'effet Warburg. L'utilisation de la glycolyse est associée à une diminution de la capacité apoptotique des cellules, notamment en empêchant la translocation du cytochrome C et du facteur pro-apoptotique (AIF) de la mitochondrie vers le cytoplasme. En conséquence, le métabolisme particulier qu'acquièrent les cellules tumorales contribue au processus de cancérisation. Le mitaplatine est une espèce hybride cisplatine-dichloroacétate (Dhar & Lippard, 2009) qui permet d'induire des dommages sur l'ADN mais aussi cibler spécifiquement les cellules cancéreuses en s'attaquant à leur activité métabolique particulière. Le dichloroacétate inhibe l'enzyme pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). Le rôle de cette dernière est de désactiver la pyruvate déshydrogénase (PDH), qui en temps normal convertit pyruvate en acétyl-CoA et fait donc le lien entre glycolyse et cycle de Krebs. L'augmentation du potentiel membranaire de la mitochondrie résultant de l'afflux d'acétyl-CoA à l'intérieur de la mitochondrie cause l'ouverture des pores de transition, générant par là un efflux de cytochrome C et d'AIF. Le cytochrome C devient alors membre du complexe Apaf, activant grâce à sa sous-unité caspase-9 d'autres caspases et induisant la mort cellulaire (Cullen *et al.*, 2007).

- Utilisation de nanovéhicules

Il s'agit de stratégies prometteuses, utilisant un vecteur pour améliorer la pénétration cellulaire, et si possible cibler les tumeurs. Pour illustration l'association du cisplatine avec des « nanocornes » de carbone (*single-wall carbon nanohorns*) fonctionnalisées permet une amélioration de la pénétration cellulaire, une administration localisée et prolongée du médicament et un pouvoir antinéoplasique accru sur des cellules humaines de cancer bronchique non à petites cellules implantées à des souris immunodéficientes (*nude*) (Ajima *et al.*, 2008). Un véhicule plus spécialisé a été conçu en fonctionnalisant des nanoparticules poreuses Fe_3O_4 à l'aide du trastuzumab, un anticorps monoclonal IgG1 humanisé. Après stockage à l'intérieur de la particule (Figure 9), le cisplatine peut être spécifiquement délivré au sein de cellules exprimant le récepteur pour les facteurs de croissance épidermaux humains 2 (HER2) reconnu par l'anticorps, et initier une cytotoxicité supérieure à celle du cisplatine (Cheng *et al.*, 2009).

- Potentialisation de la radiothérapie

L'efficacité de la radiothérapie pour traiter certains types de tumeurs passe par la formation de lésions sur l'ADN (cassures) grâce à un dépôt d'énergie localisé ainsi que par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxigen species*, ROS) qui vont à leur tour endommager l'ADN. Il est établi depuis plusieurs années que la présence d'adduits du platine augmente les effets de la radiothérapie par une inhibition de la réparation des lésions qu'elle génère ainsi que par la production de lésions secondaires par conversion des cassures

simple-brin en cassures double-brin (Amorino *et al.*, 1999). Afin d'ajouter à cet effet, des nanoparticules d'or peuvent également être employées en combinaison avec le cisplatine et la radiothérapie. La cause de ce phénomène serait l'émission d'électrons secondaires de basse énergie, favorisée par le platine et l'or, qui induit un dépôt de dose local très important. À doses cliniquement pertinentes, et sur des films secs d'ADN plasmidique, la présence de nanoparticules d'or près du site de platination augmente le nombre de cassures double-brin par un facteur de plus de sept par rapport à l'ADN seul, et de plus de trois par rapport à l'ADN platiné (Zheng & Sanche, 2009).

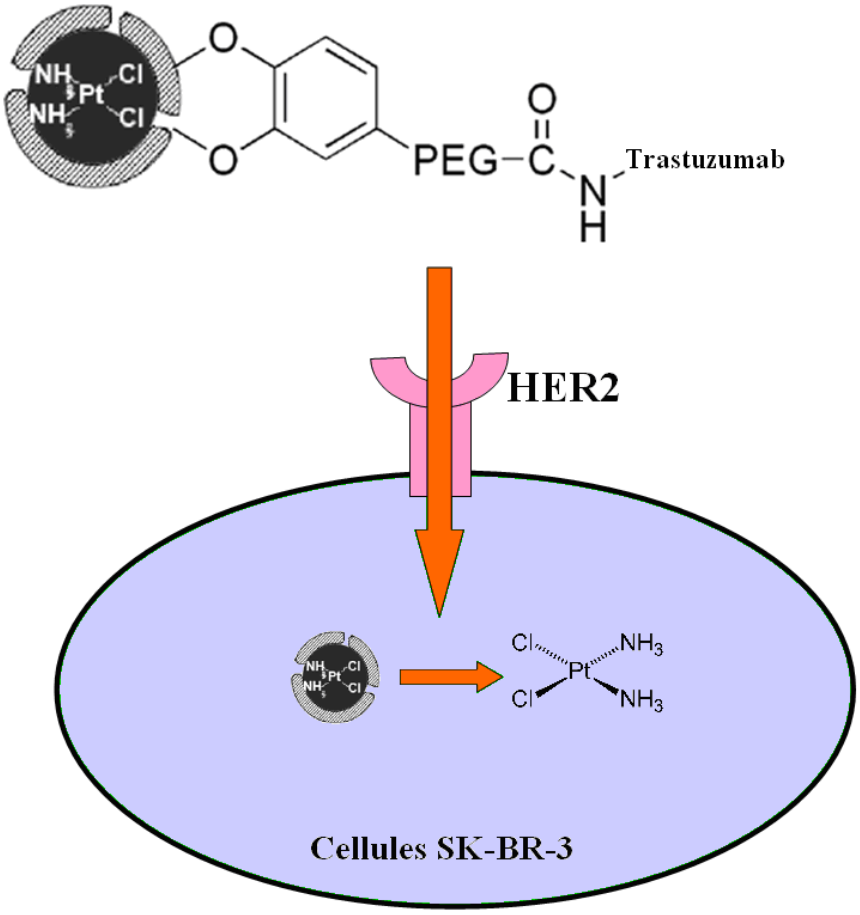


Figure 9 : Véhicule constitué de nanoparticules d'or poreuses qui permettent de délivrer le cisplatine de façon ciblée à des cellules tumorales mammaires exprimant le récepteur HER2 (adapté de Cheng *et al.*, 2009).

- Utilisation d'autres métaux de transition

Le succès des dérivés du platine a aussi amené la communauté scientifique à s'intéresser au potentiel d'autres métaux pour la production de molécules thérapeutiques. C'est surtout le cas du ruthénium, qui forme des complexes stables et permet dans certains cas d'atteindre préférentiellement les tumeurs. Ainsi, elles peuvent être ciblées par des complexes de ruthénium (III) qui seront réduits et activés par les conditions réductrices de ce type de

tissu. De plus, ces complexes peuvent être aussi captés par le transporteur du fer transferrine, dont le récepteur se trouve surexprimé chez les cellules possédant une forte activité de division et nécessitant donc un plus grand apport en fer (Sanchez-Cano & Hannon, 2009; Antonarakis & Emadi, 2010). Deux dérivés se trouvent actuellement en phase d'essais cliniques. Le premier, KP1019, s'associe à la transferrine pour atteindre les cellules cancéreuses puis interférer avec la chaîne de transport des électrons au sein de la mitochondrie, mais aussi cibler l'ADN. Il possède une activité intéressante contre le cancer colorectal. Le second, NAMI-A, agit d'une toute autre manière puisqu'il démontre des effets anti-angiogéniques et anti-invasifs, tout en étant peu efficace sur la tumeur primaire. Des complexes de titane (Oberschmidt *et al.*, 2007) et de gallium (Rudnev *et al.*, 2006) sont aussi, à l'heure actuelle, en cours d'essais cliniques.

Les dérivés du platine représentent donc une classe majeure d'anticancéreux utilisée pour le traitement de tumeurs très variées. Les efforts de recherche liés à cette classe ont connu un essoufflement suite au peu de succès rencontré dans la mise sur le marché de nouvelles molécules. Malgré tout, un regain d'intérêt se manifeste aujourd'hui, notamment grâce aux progrès réalisés dans la compréhension des paramètres cytotoxiques des dérivés platinés et des résistances tumorales. Preuve de cette attention constante de la communauté scientifique, un symposium international sur les composés coordonnés du platine pour les chimiothérapies anticancéreuses (*International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*) se tient périodiquement afin de faire un point complet sur les différents aspects de la synthèse et de l'utilisation de ces médicaments (Muggia, 2009). Nous allons maintenant voir plus en détail les aspects pharmacologiques de l'utilisation des dérivés du platine (cytotoxicité, résistances), en décrivant les mécanismes chimiques et biologiques sous-jacents.

B) Données pharmacologiques sur les dérivés du platine

Il est possible de décomposer le mode d'action des dérivés du platine en cinq grandes étapes : administration systémique ; accumulation active et passive à l'intérieur de la cellule ; activation du complexe platiné ; entrée dans le noyau et réaction avec certaines bases de l'ADN pour former des adduits ; élicitation d'une réponse cellulaire à ces dommages. Les paramètres et acteurs de chacun de ces mécanismes vont être abordés dans les paragraphes qui suivent.

1. Données pharmacocinétiques

Le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine sont administrés par voies intraveineuse ou intrapéritonéale. Suite à l'injection dans le système circulatoire, ils ont accès à l'ensemble des tissus. La demi-vie du cisplatine plasmatique (total) est longue, de deux à huit jours

(données AFSSAPS), et la clairance rénale importante. Cependant, la demi-vie du cisplatine ultrafiltrable (non associé à des macromolécules) dans l'organisme est courte, de l'ordre de 30min, en raison de sa forte réactivité avec les protéines : il se fixe tout d'abord (lors des deux premières heures après injection) à des protéines de bas poids moléculaire (< 25kDa) contenants des groupements sulfhydryle, telles que complexes du glutathion et surtout protéines riches en L-méthionine. Par la suite, ce sont les protéines de plus haut poids moléculaire, albumine, globulines et transferrine, qui sont atteintes, alors que la fixation aux protéines à groupement sulfhydryle n'est plus détectable. Lors de cycles de chimiothérapies, il s'accumule rapidement dans les tissus et n'atteint un équilibre plasmatique qu'au bout de plusieurs injections. La demi-vie du carboplatine total est équivalente (cinq jours). Peu réactif avec les protéines plasmatiques (il se lie uniquement à de petites protéines possédant des groupements thiol), le carboplatine est rapidement éliminé (95% avant la 25ème heure post-injection). L'oxaliplatine, enfin, présente une demi-vie dans l'organisme égale à celle du carboplatine et possède un spectre de liaison aux protéines plasmatiques très similaire à celui du cisplatine. Il voit sa concentration d'équilibre atteinte dès le premier cycle du traitement. Très peu de temps (02h00) après le début de l'injection, l'ensemble de la forme ultrafiltrable a disparu et 85% du platine se retrouve déjà distribué dans les tissus. L'oxaliplatine ne paraît pas s'accumuler d'un cycle à l'autre lors d'un programme de traitement chimiothérapeutique (Boisdron-Celle *et al.*, 2001).

Une méthode très sensible telle que la spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) permet de déceler la présence de platine dans le plasma jusqu'à trois semaines après injection de cisplatine ou d'oxaliplatine. Le cisplatine et surtout l'oxaliplatine, mais pas le carboplatine, s'avèrent capables de s'accumuler dans les érythrocytes, par fixation covalente sur l'hémoglobine (Boisdron-Celle *et al.*, 2001). Les dérivés du platine ne sont pas métabolisés par le foie et leur élimination passe principalement par la voie rénale, ce qui explique en partie leur toxicité pour ce tissu.

2. Pénétration à l'intérieur de la cellule

La propriété majeure autorisant la molécule à toucher une cible difficile d'accès telle que l'ADN est sa haute stabilité, due à une capacité d'échange de ligands réduite, à l'inverse d'autres complexes de coordination (Bloemink & Reedijk, 1996). Le cisplatine a donc le temps de subir les processus de transport successifs qui le mèneront jusqu'au noyau. Son passage à travers la membrane cellulaire est encore aujourd'hui l'objet d'un débat. Le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine sont des molécules hautement polaires, qui ne passent pas aisément à travers la membrane plasmique. Cependant des arguments expérimentaux penchaient en faveur d'une diffusion passive, notamment car l'entrée du cisplatine n'est ni saturable (Hromas *et al.*, 1987; Binks & Dobrota, 1990) ni inhibée par la présence d'analogues structuraux (Gately & Howell, 1993). Un certain nombre de travaux

plus récents suggèrent maintenant un rôle pour des transporteurs spécialisés dans l'internalisation des dérivés du platine.

Il s'agit surtout du transporteur du cuivre *copper transporter receptor 1* (CTR1) (Howell *et al.*, 2010). L'homéostasie du cuivre est un processus important qui permet à la fois d'assurer la présence de ce métal (cofacteur pour de nombreuses enzymes) dans la cellule mais aussi de la protéger contre ses effets nocifs (production de radicaux libres par réaction avec l'oxygène moléculaire ou le peroxyde d'hydrogène).

CTR1 est le principal (mais non le seul) transporteur responsable du passage du cuivre à travers la membrane. L'absence de CTR1 rend levures et cellules de mammifères résistantes à des concentrations élevées de cuivre, cisplatine, carboplatine et oxaliplatine, alors que sa surexpression produit l'effet inverse pour ces mêmes composés métalliques. L'étude de tumeurs et lignées cancéreuses a cependant mis à jour bien peu de cas où CTR1 se trouve sous-exprimé. Une hypothèse vient fournir une explication à ce phénomène : l'absence de glycosylation en T^{27} de CTR1 inactive la protéine par protéolyse de la partie N-terminale, mais permet à celle-ci de rester en place au sein de la membrane. Plusieurs types cellulaires résistants au platine présentent une voie de glycosylation défectueuse, et la transfection de telles cellules avec un gène de CTR1 intact produit une protéine de taille inférieure à la normale qui ne permet pas d'abolir la résistance au cisplatine (Howell *et al.*, 2010).

CTR1 se trouve aussi modulé par le cisplatine : l'exposition de cellules de cancer de l'ovaire humaines à cet agent engendre une rapide élimination de CTR1 par macropinocytose, un mécanisme empêché par les inhibiteurs du protéasome bortezomib et lactacystine ; la protéine se trouve aussi polyubiquitinylée suite à exposition au cisplatine et au bortezomib, et se trouve ainsi adressée pour dégradation. Le mécanisme exact de transport du cisplatine à travers CTR1 est envisagé de la façon suivante (Figure 10) : un empilement de structures en forme de cercle riches en méthionine (côté extracellulaire) permettrait le transfert séquentiel du cuivre Cu^+, et donc potentiellement du cisplatine, d'un cercle à l'autre par transchélation jusqu'à un dernier cercle riche en cystéine à l'extrémité cytoplasmique du transporteur. Ce mode de passage s'explique par le fait que l'ion Cu^+ et le cisplatine, acides faibles, sont capables de former des interactions faibles avec les acides aminés soufrés (Howell *et al.*, 2010).

Remarquons enfin que si CTR1 contribue à l'accumulation intracellulaire du cisplatine, du carboplatine et de l'oxaliplatine, il paraît également exister pour ce dernier dérivé d'autres mécanismes car son entrée est moins affectée par la suppression de l'expression de CTR1 (Holzer *et al.*, 2006).

En revanche, nous avons déjà évoqué plus haut, dans le cas de l'oxaliplatine, le rôle d'autres transporteurs qui tendent à favoriser l'entrée du dérivé dans la cellule (Zhang *et al.*, 2006). La transfection de cellules rénales avec des plasmides portant les gènes des transporteurs SLC22A1 et SLC22A2 confère des sensibilités 8 et 74 fois plus importantes, respectivement, pour l'oxaliplatine alors que la sensibilité au cisplatine et au carboplatine n'est pas significativement modifiée. C'est le ligand non labile organique présent sur

l'oxaliplatine mais pas sur le cisplatine et le carboplatine après activation, qui permettrait l'interaction avec ces deux transporteurs. SLC22A1, et dans une moindre mesure SLC22A2, ont été détectés au sein de lignées cellulaires issues de cancers du colon, suggérant leur rôle actif dans la médiation de la toxicité de l'oxaliplatine dans ces tissus particuliers. La variabilité de sensibilité pourrait d'ailleurs être liée à la variation d'expression de SLC22A2, mais sa faible présence au sein d'échantillons de tumeurs ovariennes sensibles ne permet pas de corréler son influence aux effets cliniques généralement observés pour ces tissus (Burger *et al.*, 2010).

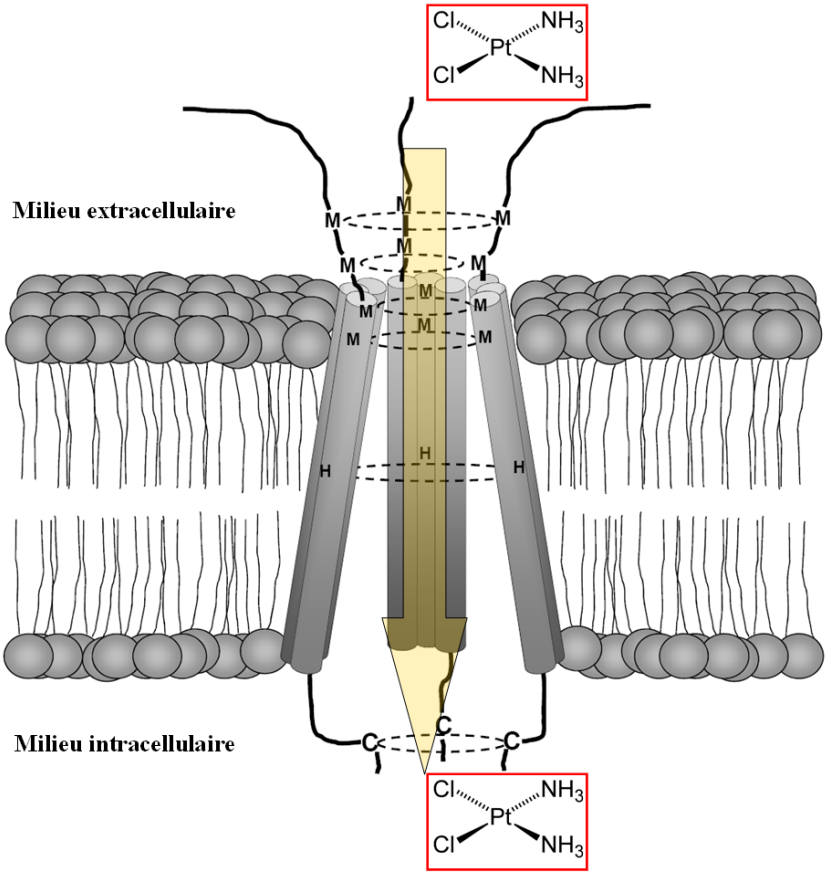


Figure 10 : Mécanisme envisagé pour le transport actif du cisplatine à travers la membrane plasmique *via* le transporteur du cuivre CTR1 et un phénomène de transchélation (adapté de Holzer *et al.*, 2006).

3. Activation intra-cytoplasmique

Le cheminement du dérivé du platine de l'extérieur de la cellule vers le noyau est présenté sur la Figure 11. Une fois parvenus dans le cytoplasme, les dérivés du platine doivent être activés pour agir sur leur cible privilégiée. Dans le cas du cisplatine, les ions chlorure sont remplacés en solution par des molécules d'eau. C'est ce qui se passe à l'intérieur de la cellule où la concentration en ions chlorure est plus basse ($[Cl^-]$ = 2-30mM). Cette aquation n'est pas possible dans les fluides extracellulaires (par exemple dans le sang) où la

concentration en ions chlorure est plus élevée ($[Cl^-] \approx 100mM$). Il se produit une activation analogue pour les autres dérivés, dont les substituants labiles sont également remplacés par des molécules d'eau. Les groupements aqua du cation nouvellement formé sont bien plus réactifs à l'encontre des groupes nucléophiles de macromolécules (ADN, ARN, protéines). En conséquence, 75 à 85% des molécules de cisplatine pénétrant dans une cellule réagissent directement avec les protéines (Fuertes *et al.*, 2003) puis 14 à 24% avec d'autres biomolécules, dans le cytoplasme ou au sein du noyau. Au final, seulement 1% du cisplatine est capable d'atteindre l'ADN génomique (Arnesano & Natile, 2009). Bien qu'à doses pharmacologiques, son association avec l'ARN ou les protéines intracellulaires ne paraît pas capable d'inactiver directement ces molécules, il faut malgré tout garder à l'esprit que les effets du cisplatine sur d'autres molécules que l'ADN ont été à ce jour assez peu étudiés et qu'une modulation de sa cytotoxicité *via* ces cibles n'est pas à exclure.

4. Formation d'adduits sur l'ADN génomique

L'identité du phénomène principal responsable de l'activité cytotoxique des dérivés du platine a longtemps fait débat. Il est cependant aujourd'hui admis que ce sont ces adduits à l'ADN qui en sont la cause majeure, en agissant de façon négative sur les processus normaux de réplication et transcription comme nous allons le voir. Après l'étape initiale d'activation, le cisplatine forme dans un second temps des adduits monofonctionnels avec l'azote 7 du cycle imidazole des guanines ou adénines (dans une moindre mesure pour ces dernières) accessibles à l'intérieur du grand sillon (Figure 11, encadré rouge). Enfin, plus de 90% de ces adduits réagissent de nouveau afin de former des adduits bifonctionnels. Dans le cas du cisplatine, les temps observés *in vitro* pour chacune de ces trois étapes sont, respectivement : $t_{1/2}$ = 1,9h ; $t_{1/2}$ = 0,1h ; $t_{1/2}$ = 2,1h (Bancroft *et al.*, 1990). On constate ainsi que l'étape de remplacement des ions chlorure est limitante par rapport à celle de formation de l'adduit à proprement parler. Le carboplatine, l'oxaliplatine et le satraplatine suivent des schémas réactionnels identiques. Les liaisons générées entre les bases sont irréversibles. Les adduits bifonctionnels résultants comprennent différents types de liaisons intra- ou interbrin qui perturbent la structure tridimensionnelle de l'ADN en causant courbure et torsion de la double hélice.

Il est important de noter que la formation des lésions du platine dépend de l'accessibilité de l'ADN, autrement dit de son état de compactage au sein du nucléosome et, plus largement, de la chromatine. Une forme plus ouverte, et donc plus accessible, favorise la fixation d'agents platinants, ce qui est d'ailleurs illustré par leur préférence pour l'ADN de liaison internucléosomal.

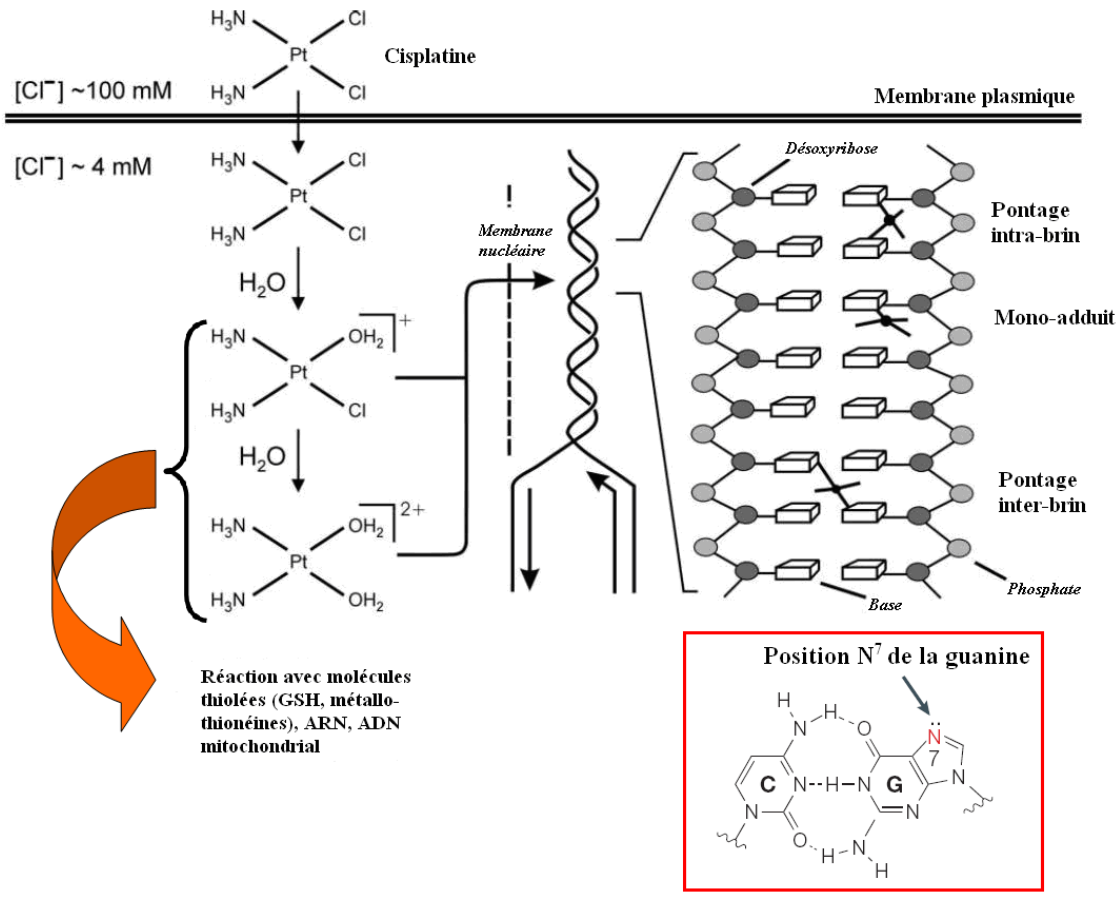


Figure 11: Mécanismes de transformation du cisplatine dans la cellule. La perte des ligands chlore remplacés par des groupements aqua rend le composé réactif vis-à-vis des sites nucléophiles de molécules telles que l'ADN, l'ARN et les protéines. Il peut alors réagir avec l'ADN génomique pour former des adduits monofonctionnels et bifonctionnels, notamment en réagissant avec l'azote N7 des purines (adapté de Kartalou & Essigmann, 2001b et Wang & Lippard, 2005).

5. Proportions des différentes lésions de l'ADN

Sept années après la mise sur le marché de la molécule, les différentes formes d'adduits du cisplatine sur l'ADN étaient identifiées (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985). Les proportions relatives de ces adduits sont indiquées dans le Tableau 2. La lésion la plus courante induite *in vivo* par le cisplatine, et aussi la plus étudiée, est l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG)-$[Pt(NH_3)_2]^{2+}$, représentant environ deux tiers du total des adduits constatés (voir Tableau 2). Le carboplatine forme les mêmes adduits que le cisplatine, mais dans des proportions différentes. L'oxaliplatine, quant à lui, forme aussi les mêmes adduits mais là encore dans des proportions très différentes, y compris en fonction des types cellulaires (Hah *et al.*, 2010). Il semble que pour ce dérivé les monoadduits soient légèrement majoritaires par rapport aux autres espèces (voir Tableau 2). Le JM118 (métabolite actif du satraplatine), enfin, génère majoritairement des pontages entre deux guanines adjacentes. Comme cela a été indiqué précédemment, du fait de la structure asymétrique de la molécule, les adduits formés par ce dérivé possèdent une isomérie d'orientation, le ligand cyclohexylamine étant dirigé soit

vers l'extrémité 5' soit vers l'extrémité 3'. Il semble que, dans l'ADN double brin, le rendement penche en faveur de l'orientation 3' pour un ratio proche de 2:1. En effet, la présence du phosphate en 5' autorise la formation d'une liaison hydrogène avec le ligand amine, entraînant la formation préférentielle de cet adduit. Une plus faible quantité d'adduits 1,2-d(ApG) est également formée en comparaison avec le cisplatine, alors que la lésion 1,3-d(GpG) est au contraire plus présente (Hartwig & Lippard, 1992).

DÉRIVÉ	TYPE D'ADDUIT	FRÉQUENCE
Cisplatine	Intra-1,2-d(GpG)	65%
	Intra-1,2-d(ApG)	25%
	Intra-1,3-d(GpNpG)	5-10%
	Inter-d(G*pC)/d(G*pC)	2%
Carboplatine	*cis*-[Pt(NH_3)$_2$(dG)$_2$] (= intra-1,3-d(GpNpG) ou inter-d(G*pC)/d(G*pC))	36%
	Intra-1,2-d(GpG)	30%
	Intra-1,2-d(ApG)	16%
	Interbrin ou monoadduit	4%
	Non déterminé	14%
Oxaliplatine	Intra-1,2-d(GpG)	3-8%
	Intra-1,2-d(ApG)	1-3%
	Intra-1,3-d(GpNpG)	4-11%
	Inter-d(A*pT)/d(A*pT)	4-17%
	Monoadduit	6-10%
	Non déterminé	60-77%

Tableau 2 : Proportion des différents types d'adduits formés par les dérivés du platine d'importance clinique sur l'ADN *in vivo* (d'après Blommaert *et al.*, 1995; Todd & Lippard, 2009; Hah *et al.*, 2010).

6. Répercussions des lésions sur la structure de l'ADN

Des études structurales en cristallographie aux rayons X et spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont permis de déterminer la géométrie des modifications tridimensionnelles de l'ADN engendrées par la présence de l'adduit. D'une façon générale, on remarque que cette structure est altérée de sorte que la présence de la lésion induit une forte courbure ainsi qu'une torsion de la double hélice, et qu'au site du dommage le petit sillon est élargi et aplati alors que le grand sillon se trouve rétréci. Chaque type d'adduit cause un changement unique de conformation de l'ADN puisque les angles de courbure et de torsion (déroulement) de la double hélice sont variables. Pour l'adduit majeur du cisplatine, l'angle de courbure est de l'ordre de 60-80° alors que l'angle de torsion est de 20-25°, comme déterminés par RMN sur de courts oligonucléotides en solution (ADN de forme B) (Yang *et al.*, 1995; Gelasco & Lippard, 1998). La courbure induite par la lésion 1,2-

d(ApG) est d'environ 55° et serait plus déroulée que la lésion 1,2-d(GpG). Dans les deux cas, la déformation est plus marquée en 5' de l'adduit, rompant uniquement l'appariement avec la cytosine ou la thymine complémentaire. Des données déjà anciennes penchent en faveur d'un pouvoir mutagène supérieur de la lésion 1,2-d(ApG) par rapport à la lésions 1,2-d(GpG) (Burnouf *et al.*, 1990). Toujours à propos du cisplatine, la courbure de la lésion 1,3-d(GpNpG) est de 20°, avec une torsion de 20° également (Kartalou & Essigmann, 2001b). Dans le cas des pontages interbrins entre deux guanines, les liaisons hydrogène entre celles-ci sont rompues, permettant un rapprochement des azotes 7 de la molécule coordonnée de cisplatine qui va alors lier les deux bases. Les cytosines non appariées sont quant à elles dirigées à l'extérieur de la molécule, vers le solvant (Lilley, 1996). La courbure est moins prononcée (20-40°) mais la torsion de la double hélice est sévère (70-90°). En conséquence, la déformation se trouve étendue sur une distance de 4 à 5 bases autour de la lésion.

Les déformations créées par les adduits de l'oxaliplatine et du satraplatine ont une structure tridimensionnelle très proche de celles observées pour le cisplatine (Todd & Lippard, 2009). Cela peut d'ailleurs être constaté à l'aide d'anticorps ciblant les lésions majoritaires du cisplatine : ceux-ci sont également capables de reconnaître les adduits générés par d'autres dérivés dont l'oxaliplatine (Sundquist *et al.*, 1987). Les principales déformations de l'ADN induites par les dérivés du platine qui nous intéressent sont présentées sur la Figure 12, où l'on peut constater cette similarité de structure pour les adduits 1,2-d(GpG) engendrés par le cisplatine, l'oxaliplatine et le satraplatine.

7. Cytotoxicité des différents types de lésions

Il reste à identifier clairement, parmi ces différents types de lésions causées par les dérivés du platine, celles qui sont responsables de la cytotoxicité. Un faisceau de résultats permet de pencher en faveur des adduits 1,2-intrabrin. En effet, ils ne sont pas formés par l'isomère *trans* du cisplatine (transplatine), et ce composé est non toxique quoiqu'intéressant puisque possédant des capacités de radiosensibilisateur (Turchi *et al.*, 1999). Par ailleurs, ce type d'adduit présente une demi-vie plus longue que les adduits 1,3-interbrins car ceux-ci sont plus efficacement éliminés par les enzymes de réparation (Moggs *et al.*, 1997). Ces constatations ajoutées au rôle protecteur de certaines protéines pour ces dommages (voir plus bas) ont amené à considérer les adduits 1,2-intrabrin comme ceux responsables de l'activité antitumorale de ce complexe platiné (Fuertes *et al.*, 2003). Cela n'exclut cependant pas un rôle important pour les autres types d'adduits.

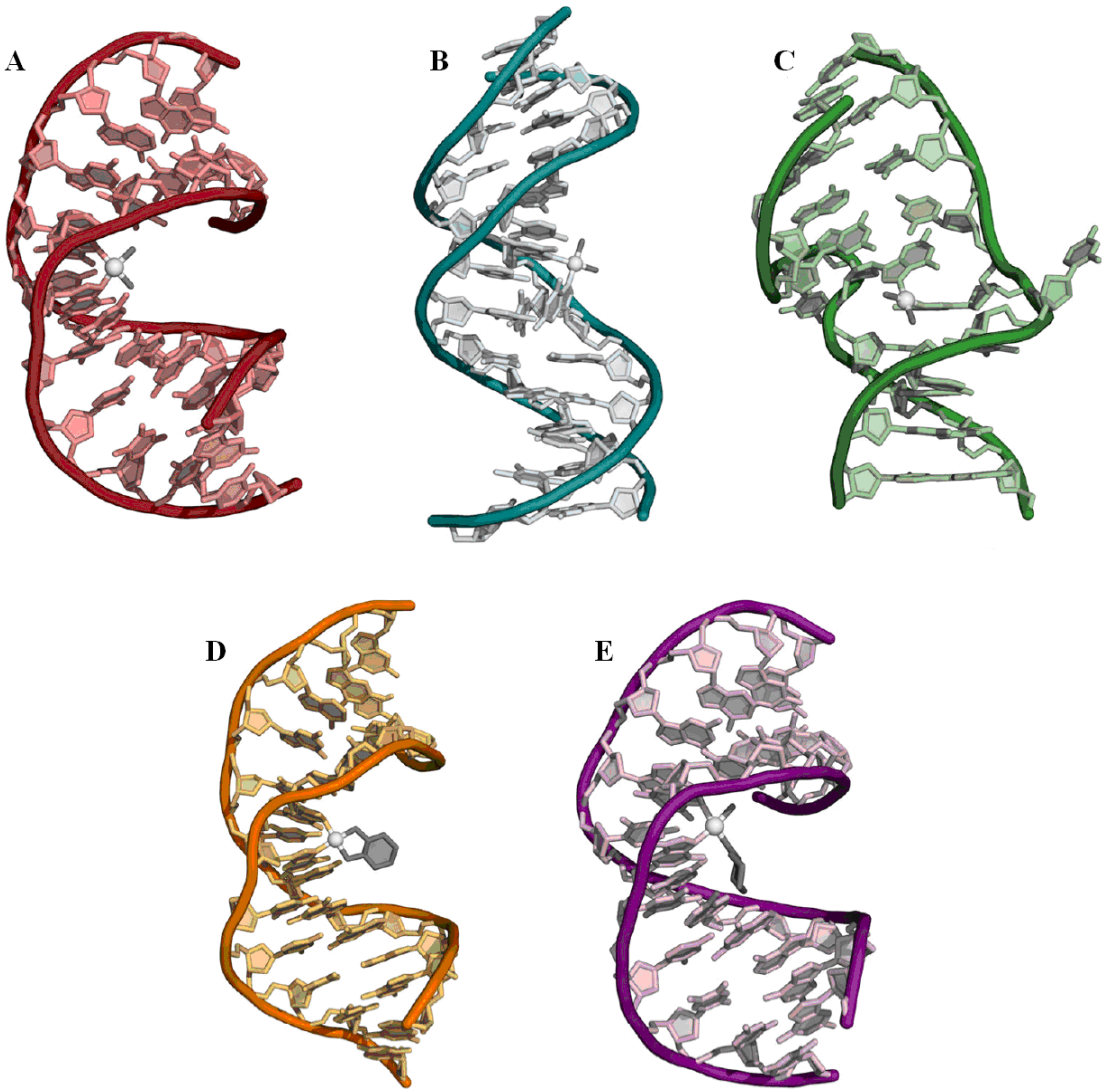


Figure 12 : Déformations de la double hélice d'ADN induites par la présence d'adduits du platine : (A) adduit cisplatine 1,2-d(GpG) intrabrin ; (B) adduit cisplatine 1,3-d(GpNpG) intrabrin ; (C) adduit cisplatine interbrin ; (D) adduit oxaliplatine 1,2-d(GpG) intrabrin ; (E) adduit satraplatine 1,2-d(GpG) intrabrin (adapté de Todd & Lippard, 2009).

C) Conséquences biologiques de la présence d'adduits du platine sur l'ADN

1. Conséquences directes

Les dommages platinés interfèrent avec les mécanismes nécessitant la séparation des deux brins complémentaires, tels que transcription et réplication. Les cellules présentant une forte activité de prolifération, comme c'est le cas pour les cellules cancéreuses, sont activement engagées dans des processus de synthèse d'ADN et d'ARN que les adduits du platine sont à même de déstabiliser, ce qui explique leur sensibilité particulière à ce type d'agents génotoxiques.

- Influence sur la transcription

Trois mécanismes participent à l'inhibition de la transcription par les adduits du platine. Ils sont illustrés par la Figure 13. Le premier d'entre eux concerne le blocage de l'ARN polymérase II lors du processsus de transcription. Les adduits déformants tels que ceux formés par les dérivés du platine (les adduits bifonctionnels sont alors plus efficaces pour bloquer l'enzyme que les adduits monofonctionnels, moins déformants) altèrent les bases concernées de sorte qu'elles ne peuvent plus être prises en charge par l'enzyme au sein de son site actif. Ce blocage interrompt l'activité d'élongation de la polymérase, mais induit la formation d'un complexe stable immobilisé sur le site du dommage. L'enzyme subit une étape d'ubiquitination causant sa dégradation. Elle fait ainsi place aux acteurs des systèmes de réparation (Jung & Lippard, 2006; Damsma *et al.*, 2007).

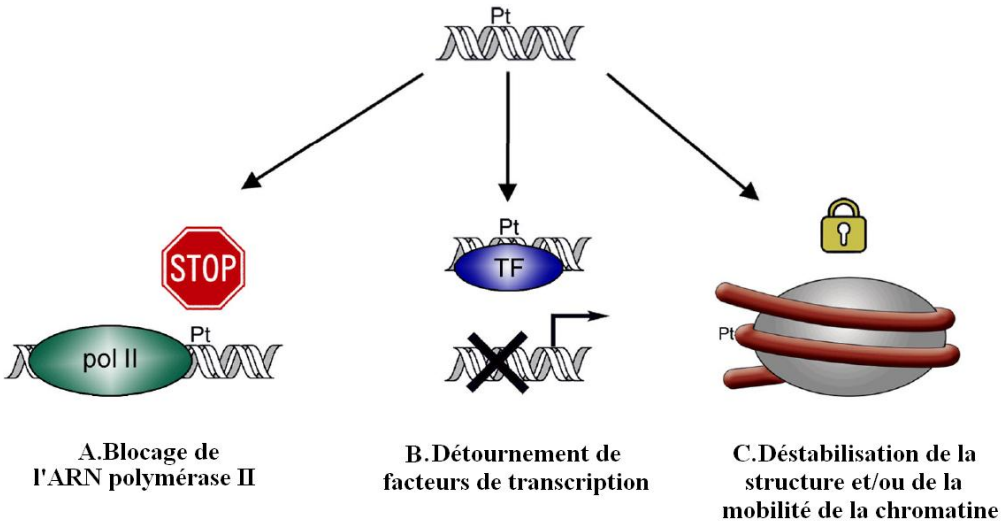


Figure 13 : Trois mécanismes participant à l'inhibition de la transcription par les adduits du platine : (A) le blocage physique de l'ARN polymérase II lors de la transcription ; (B) le détournement de facteurs de transcription de leurs fonctions naturelles ; (C) la rigidité du nucléosome qui diminue l'accessibilité des gènes (adapté de Todd & Lippard, 2009).

En amont de la transcription, ce sont les protéines initiatrices de celle-ci qui peuvent être directement touchées par les adduits du platine. Le mécanisme de détournement de facteurs de transcription (*transcription factor hijacking*) implique la fixation de certains de ces facteurs sur les adduits du platine. Cette séquestration a pour effet de réduire leur disponibilité, ce qui les empêche de remplir leurs fonctions naturelles (Kartalou & Essigmann, 2001b). L'exemple le plus connu est celui du facteur de transcription des ARN ribosomaux hUBF (également un *enhancer* de la transcription par l'ARN polymérase II), dont l'affinité pour les adduits du platine n'est que trois fois inférieure à celle pour sa séquence cible naturelle (Guminski *et al.*, 2002).

En dernier lieu, l'inhibition de la transcription peut être causée par l'augmentation de la rigidité du nucléosome suite à la formation des adduits du platine sur l'ADN. Cette perte de

mobilité rend également l'ADN moins accessible à la machinerie de transcription (Todd & Lippard, 2009).

- Influence sur la réplication

Les ADN polymérases, quant à elles, subissent un blocage analogue à celui de l'ARN polymérase II lorsqu'elles rencontrent un adduit platiné sur la séquence dont elles réalisent la copie (Harder *et al.*, 1976), ce qui a pour effet de figer la fourche de réplication. Cependant, un certain degré de tolérance existe *via* un mécanisme dit de synthèse translésionnelle (*replicative bypass*) : des polymérases spécialisées sont alors recrutées, peut-être par l'intermédiaire de PCNA, sur le site de blocage afin de poursuivre la réplication de l'ADN (Jung & Lippard, 2007). La cellule évite ainsi les effets délétères résultant de la présence de l'adduit et augmente le temps disponible pour une réparation ultérieure des lésions. Bien sûr, cette tolérance peut s'effectuer au détriment de la parfaite fidélité de copie du génome, et est donc un contributeur important dans l'apparition de mutations.

Les lésions déformantes telles que les dimères induits par les UV ou les pontages causés par les agents platinés sont particulièrement difficiles à contourner, en raison de la taille du dommage qui met en jeu deux bases adjacentes. Contrairement aux polymérases α, δ et ε (famille B) qui sont bloquées par l'adduit, les polymérases de la famille Y, telles que Pol β et Pol η, sont capables d'effectuer une synthèse translésionnelle, ignorant ainsi sa présence (Hoffmann *et al.*, 1996; Alt *et al.*, 2007), parfois aux dépends de la fidélité de réplication. La faible processivité de ces polymérases leur permet de se dissocier rapidement, laissant la place à celles de la famille B qui poursuivent la réplication. Au bilan, ce mécanisme autorise la poursuite du processus de synthèse d'ADN mais est susceptible d'engendrer la formation de lésions complexes, c'est-à-dire l'adduit en lui-même et la présence sur le brin complémentaire d'une seconde lésion de type mésappariement.

Les contraintes imposées au nucléosome, rendant celui-ci moins mobile et participant à l'inhibition de la transcription, ont également une influence sur les mécanismes de réplication (Todd & Lippard, 2009).

Les premiers indices expérimentaux montrèrent qu'après traitement au platine, les cellules se retrouvent bloquées en phase G_2 du cycle cellulaire : après une période de latence (dont on sait maintenant qu'elle reflète le délai pris par la cellule pour tenter de réparer les dommages), certaines se réengagent dans le cycle cellulaire alors que d'autres meurent. L'arrêt en phase G_2 est initié par certains points de contrôle du cycle cellulaire consécutivement à la détection des dommages (Sorenson & Eastman, 1988; Siddik, 2003). Le cisplatine induit très rarement le point de contrôle en G_1/S, pourtant crucial puisqu'il prévient une réplication de l'ADN endommagé. C'est donc plutôt le point de contrôle en G_2/M qui se trouve déclenché afin de permettre la réparation des dommages formés en S ou en G_2. La présence des lésions sur l'ADN inhibe l'action de la protéine CDK, ce qui a pour conséquence

d'empêcher l'accumulation des cellules en G_1 (Siddik, 2003). Plusieurs mécanismes de réparation des dommages de l'ADN rentrent ensuite en ligne de compte pour traiter les lésions générées par les dérives du platine.

2. Réparation des lésions

Parmi toutes les voies de réparation de l'ADN existantes, deux sont prépondérantes dans la médiation de la toxicité des dérivés du platine. Elles ont pourtant des conséquences opposées. Le système NER, tout d'abord, contribue à l'élimination des adduits platinés. La voie MMR, en second lieu, est capable de reconnaître ces lésions mais ne peut les réparer : elle va alors participer au déclenchement de l'apoptose en réponse aux adduits platinés. Nous allons maintenant décrire les étapes de chacune de ces voies, en lien avec la prise en charge des adduits du platine.

- Cas de la voie NER

D'une manière générale, ce mécanisme est responsable de la réparation des lésions volumineuses causant une distorsion de la double hélice de l'ADN. Celles-ci peuvent par exemple résulter de l'addition de molécules (hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le B[a]P), de pontages intrabrins par exposition aux rayonnements UV – dimères de pyrimidine (CPD) et photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone ((6-4)-PP) – ou à divers agents chimiques électrophiles tels que les agents platinants, les moutardes azotées ou les psoralènes.

Il s'agit d'un processus très étudié mais qui recèle encore de nombreuses zones d'ombre. Le schéma général est une identification de la lésion, suivie par son excision, et enfin la resynthèse du fragment d'ADN éliminé. Une trentaine de protéines possédant un rôle dans ce mécanisme ont été identifiées à l'heure actuelle. Elles agissent selon deux sous-voies, dont la principale différence se situe à l'étape de la reconnaissance des lésions. En effet, celle-ci peut se faire lors de la transcription (*transcription-coupled repair,* TCR) pour des zones transcriptionnellement actives, ou durant la surveillance générale du génome (*global genome repair,* GGR) pour des zones exprimées ou non. Cette discrimination est possible car la reconnaissance des dommages est effectuée par des protéines se cantonnant à ce rôle : elles n'interviennent pas dans l'étape d'excision-resynthèse qui suit, elle-même intégralement réalisée par d'autres protéines sans rôle connu dans la reconnaissance. Ces deux sous-voies sont détaillées ci-dessous et dans la Figure 14.

GGR : la grande diversité chimique des dommages reconnus par la NER étonne, dans la mesure où la machinerie de reconnaissance doit être capable de détecter de façon spécifique des lésions dont la nature varie largement, parmi un très large excès de bases normales. Il ne paraît pas exister de complexe préformé de type « réparosome » dans la cellule. Au contraire, l'assemblage des différents facteurs impliqués est séquentiel (Feuerhahn & Egly, 2008). Le

complexe initiateur du processus varie selon les lésions. Les plus grosses lésions (incluant les adduits du platine) sont reconnues par XPC-HR23B. Les lésions induites par le rayonnement ultraviolet (UV), de plus petites tailles, sont détectées par UV-DDB (XPE), un complexe qui recrute ensuite XPC-HR23B, lui-même responsable de l'assemblage des autres facteurs de réparation. TFIIH est le premier de ces facteurs recruté suite à la fixation de XPC-HR23B. L'activité hélicase de ses sous-unités XPB et XPD permet de déshybrider localement l'ADN. L'ensemble ainsi formé s'étend sur 20 à 30 paires de bases autour de la lésion. RPA (*replication protein A*), capable de se fixer sur l'ADN simple-brin non endommagé et de le protéger des attaques nucléasiques, et XPA (*xeroderma pigmentosum group A-complementing protein*), se positionnant grâce à un motif doigt de zinc sur le brin lésé, stabilisent l'ouverture de la double hélice. La présence de RPA et XPA permet aux endonucléases XPG (côté 3') et ERCC1/XPF (côté 5') de se positionner au niveau des jonctions ADN simple brin/double brin, générant une double coupure et donc l'excision d'un oligonucléotide de 24 à 32 paires de bases contenant la lésion à éliminer. C'est XPF (*xeroderma pigmentosum group F-complementing protein*) qui, au sein de l'hétérodimère, détient l'activité nucléase. ERCC1 (*excision repair cross-complementing 1*) contient un domaine de liaison à l'ADN et pourrait être responsable du positionnement correct de XPF (Nouspikel, 2009). Après l'incision, tous les facteurs à l'exception de RPA se détachent du site de réparation afin de permettre le recrutement de la machinerie de resynthèse (RFC et PCNA puis les polymérases δ et ε) et ligation (ADN ligase I pour les cellules en phase S, XRCC1/ADN ligase III pour les cellules se trouvant aux autres étapes du cycle cellulaire) (Fousteri & Mullenders, 2008). Enfin, la structure chromatinienne est restaurée. L'oligomère éliminé est ensuite très probablement dégradé dans le noyau, et le devenir du platine inconnu : il n'a en effet pas été possible, jusqu'à présent, de le suivre à travers la cellule après la réparation (Jung & Lippard, 2007).

TCR : il s'agit d'un mécanisme plus rapide que le précédent, n'agissant qu'au niveau du brin transcrit d'un gène en cours d'expression. Ses étapes successives sont pour le moment bien moins connues que celle de la GGR. De son efficacité dépendent la bonne poursuite de la transcription et, en cas d'échec, l'initiation des voies apoptotiques. Sa découverte provient de l'observation que la réparation au sein des gènes activement transcrits est plus rapide que pour les régions silencieuses du génome. De plus, cette rapidité se vérifie aussi lorsque l'on compare, au sein d'un gène exprimé, la réparation du brin transcrit avec celle du brin non transcrit (Friedberg, 2001). Au cours de l'élongation, l'ARN polymérase II interagit constamment avec CSB, protéine possédant des activités hélicase et de remodelage de la chromatine, et XPG. Lorsque la polymérase se retrouve bloquée par des bases anormales, dont celles possédant un adduit, l'interaction avec CSB se stabilise. L'ARN polymérase pourrait alors être déplacée, voire même dégradée, avant le recrutement de CSA-DDB1/CSN, HAT p300 puis des facteurs d'incision de la NER induit par CSB (Nouspikel, 2009). Ensuite, le mécanisme procède globalement de la même façon que la GGR.

Les propriétés de certains des acteurs de ce mécanisme, notamment leurs capacités d'interaction avec les adduits du platine, seront plus précisément décrites dans le chapitre suivant.

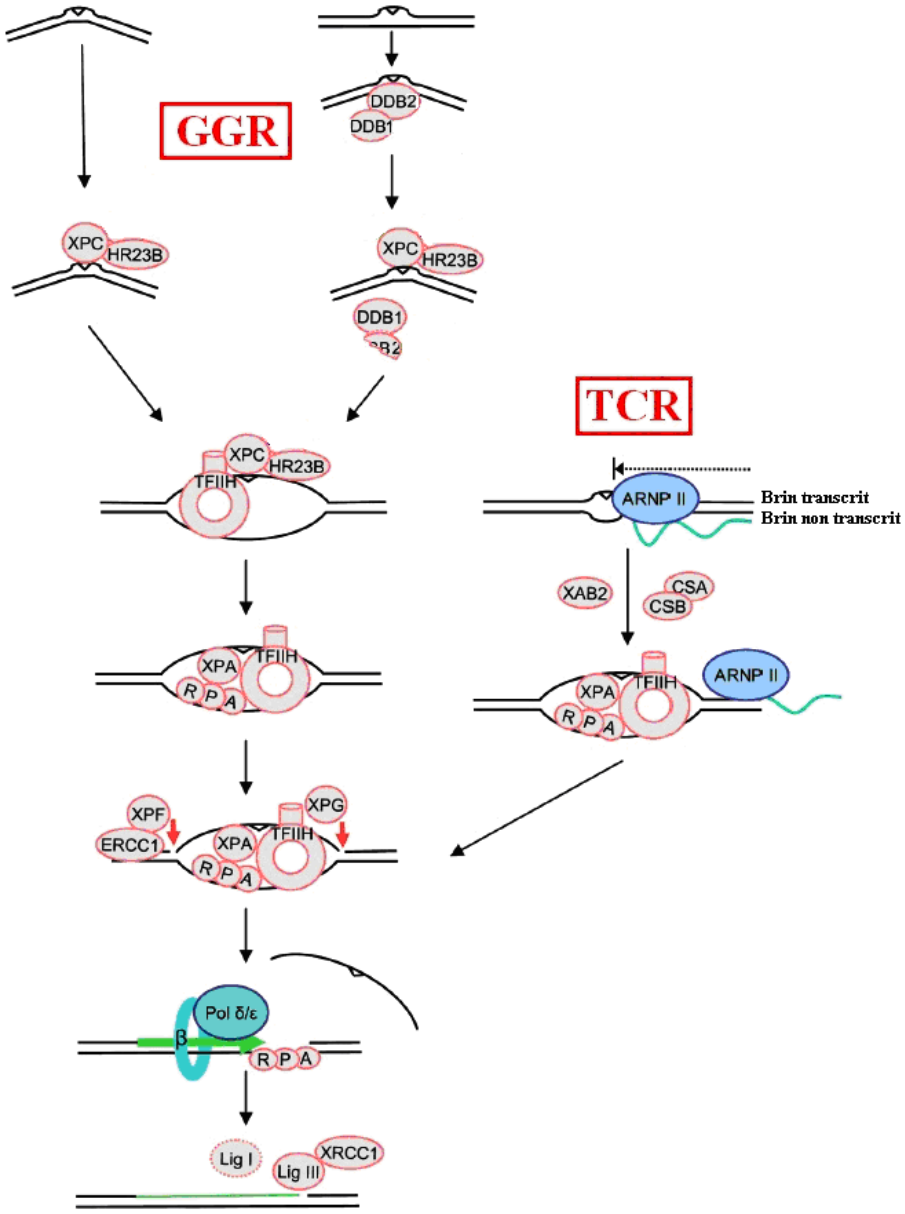


Figure 14 : Les étapes principales des deux voies de la réparation par excision de nucléotides. Le GGR détecte les lésions au sein de régions non activement transcrites de la chromatine, en faisant appel au complexe de reconnaissance XPC-HR23B (lésions platinées) ou au complexe UV-DDB (lésions UV-induites). Le TCR, quant à lui, est enclenché lorsque l'ARN polymérase II se trouve bloquée par la présence d'une lésion sur le brin qu'elle est en train de transcrire. Le recrutement des facteurs CSA et CSB permet d'assembler ensuite la machinerie de réparation (adapté de Nouspikel, 2009).

Précisons que l'efficacité de la réparation des adduits majoritaires par la voie NER est en temps normal équivalente pour le cisplatine, l'oxaliplatine et le satraplatine. En effet, la détection radioisotopique de fragments lésés excisés *in vitro* suite à l'action des facteurs du

NER montre que l'essentiel des dommages induits par les trois dérivés est réparé 30 à 60min après la mise en contact avec des extraits cellulaires. Dans le cas de cellules cultivées, les taux maximum d'excision sont observés 06h00 à 24h00 après le début de l'expérience. La reconnaissance de la lésion se produit de la même manière pour les trois molécules platinées, le groupement transporteur n'ayant que peu d'influence sur leur identification (Reardon *et al.*, 1999). La présence d'un mésappariemment en face de l'adduit (introduit par la synthèse translésionnelle) renforce la déformation de la double hélice et augmente l'efficacité de la réparation par le système NER (Moggs *et al.*, 1997).

L'un des mécanismes modulateurs de la réparation des adduits du platine est l'effet de protection des lésions (*repair shielding*) par certains facteurs, notamment les protéines à boîte HMG (*high mobility box*). De par leur importante affinité pour les adduits, elles sont susceptibles de bloquer l'accès aux lésions et donc protéger celles-ci de l'action des systèmes de réparation de l'ADN. Les lésions persistent ainsi dans la cellule, ce qui prolonge leur effet inhibiteur de la transcription et de la réplication (Kartalou & Essigmann, 2001b).

- Cas du MMR

Ce mécanisme de réparation prend en charge l'élimination des nucléotides incorporés par erreur par l'ADN polymérase lors des processus de synthèse d'ADN, améliorant ainsi la fidélité de la réplication. Les protéines de cette voie de réparation sont très conservées entre systèmes procaryotes et eucaryotes. Deux types de complexes sont impliqués dans la reconnaissance des mésappariements chez l'homme : MutSα et MutSβ. Le premier est responsable de la reconnaissance des mésappariements impliquant deux à quatre bases, alors que le second se charge d'identifier des dommages plus étendus. MutSα est un hétérodimère composé des sous-unités MSH2 et MSH6 qui, après sa liaison au mésappariement, va recruter MutLα (composé de MLH1 et PMS2) pour achever la reconnaissance de la lésion puis le recrutement des autres facteurs du mécanisme. L'activité endonucléase latente de PMS2 est mise en route par son interaction avec MutSα, RFC ou PCNA, et réalise le clivage du brin portant la lésion en deux sites autour de celle-ci. Ces coupures servent de site d'initiation pour l'excision de la lésion qui sera effectuée par ExoI, une exonucléase 5'→3'. Enfin, la resynthèse est assurée par Pol δ, aidée par PCNA et RFC, et l'ADN ligase I achève le travail en réalisant une ligation de la cassure restante (Kunz *et al.*, 2009).

Contrairement à la voie NER, qui répare les lésions platinées, l'existence d'une voie MMR fonctionnelle contribue à la toxicité de ces dernières. En effet, un adduit déformant la double hélice est susceptible de causer l'introduction d'une base erronée sur le brin complémentaire synthétisé, lors de la synthèse translésionnelle. Ce mésappariement est détecté par les complexes spécialisés de la voie MMR, entraînant réparation par excision d'un fragment du brin néoformé, mais aussi persistence de l'adduit sur le brin parental. Un deuxième cycle de réplication s'enclenche, à nouveau susceptible d'introduire une base erronée en face de la lésion. La répétition de ce cycle de synthèse/excision finit par activer les

voies de signalisation des dommages ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) ou ATR (*ATM-and RAD3-related protein*), qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2 puis éventuellement l'apoptose. Selon un second modèle dit de signalisation directe MutSα, par sa capacité à s'associer directement avec les adduits intrabrin 1,2-d(GpG) du platine, permet l'induction de mécanismes apoptotiques par les voies ATM ou ATR (Li, 2008; Martin *et al.*, 2008). Ces deux modèles sont illustrés par la Figure 15. Ajoutons une dernière hypothèse, dite d'occlusion : MutSα, se trouvant bloquée au niveau de l'adduit, ferait obstacle à la machinerie de réplication et conduirait par là à la mort cellulaire programmée. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la synthèse translésionelle se trouve largement augmentée en présence d'une voie MMR défectueuse (Vaisman *et al.*, 1998).

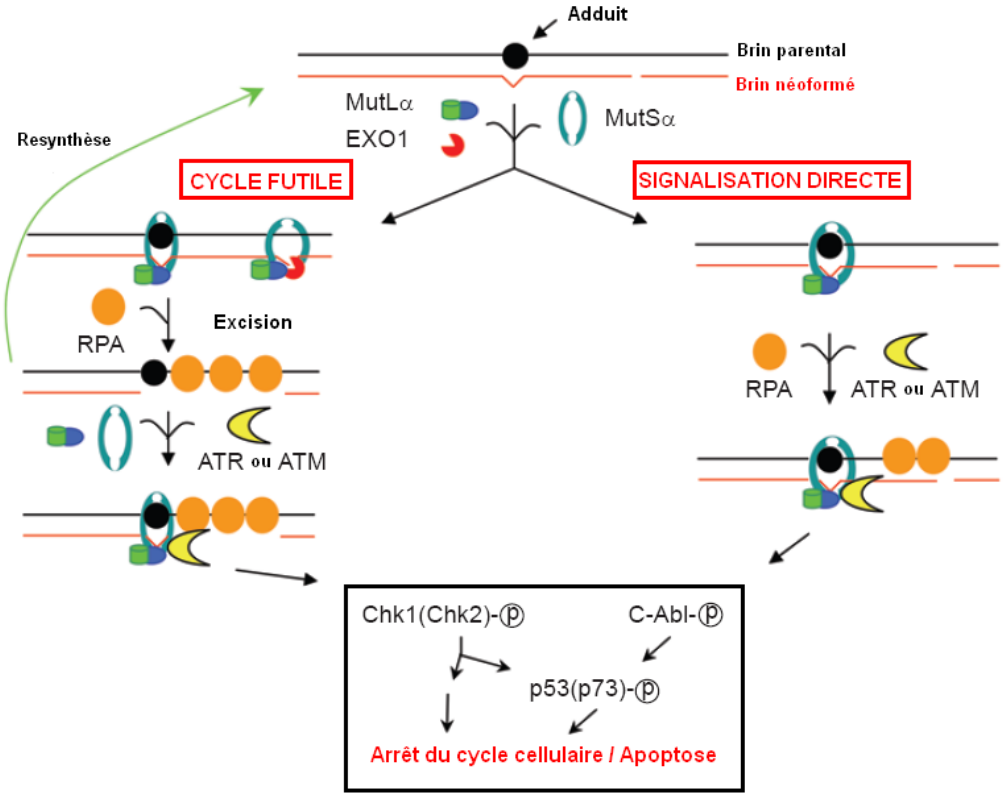


Figure 15 : L'enclenchement des voies apoptotiques par le système MMR suite à la détection d'adduits déformants de l'ADN (adapté de Li, 2008).

Le cancer colorectal héréditaire non polyposique est un exemple type d'atteinte liée à une voie MMR défectueuse (Martin *et al.*, 2008). L'extinction épigénétique de l'un des gènes impliqués dans le MMR (par exemple, par hyperméthylation du promoteur de MLH1) est aussi un facteur susceptible d'entraîner l'apparition de différents types de cancers (estomac, colorectaux, ovariens, pulmonaires non à petites cellules, gastriques et de l'endomètre) (Laadem & Cvitkovic, 2001). La cytotoxicité de l'oxaliplatine étant indépendante du statut MMR (MSH2 est incapable de reconnaître les adduits formés par ce dérivé), c'est ce médicament qui pourra être administré pour traiter ces affections (Fink *et al.*, 1996). Pour les mêmes raisons, le satraplatine reste cytotoxique lorsque la voie MMR est altérée.

La restauration d'un système MMR fonctionnel, en toute logique, sensibilise de nouveau des cellules de carcinomes du colon et de l'endomètre à l'action du cisplatine, phénomène qui n'est pas observé pour l'oxaliplatine et le satraplatine (Fink *et al.*, 1996). Enfin, soulignons le fait que des défauts dans l'expression de protéines de la MMR telles que MLH1 et MSH6 renforcent l'accessibilité de la zone lésée et donc les capacités de synthèse translésionnelle (Vaisman *et al.*, 1998), conférant par là des capacités de résistance au cisplatine.

Indirectement, les adduits du platine vont entraîner la formation d'autres lésions de l'ADN qui seront, elles, réparées par les systèmes dédiés. Les cassures, tout d'abord, peuvent résulter de la distorsion de l'ADN, ainsi que de l'éjection du complexe de réplication de la fourche, et des tentatives répétées mais inefficaces de réparation par la MMR. En outre, le cisplatine et l'oxaliplatine participent à la production de ROS (lors de la déstabilisation de la mitochondrie au cours de l'apoptose), et augmentent le taux de la 7,8-dihydro-8-oxo-2′-désoxyguanine (8-oxo-dG), lésion d'oxydation la plus fréquente (Preston *et al.*, 2009). Cette dernière est réparée par le système de réparation par excision de base (BER), destiné à éliminer les petites lésions résultant d'oxydations et d'alkylations ainsi que les sites abasiques.

À l'instar de son influence sur la transcription et la réplication, la rigidité du nucléosome imposée par la présence des lésions rend celles-ci moins accessibles. La voie NER est alors moins efficace pour réparer les dommages qui se retrouvent enfouis au sein de la chromatine. Ceci est confirmé par le fait que la réparation des dommages par la voie NER se produit plus rapidement au sein de régions d'ADN transcrit (Guminski *et al.*, 2002; Fousteri & Mullenders, 2008) que lors du GGR, pour lequel le mode de reconnaissance en contexte chromatinien n'a pas encore été élucidé. Les modifications post-traductionnelles des histones (épigénétiques) influencent cette accessibilité et donc aussi l'action de la voie NER (Jung & Lippard, 2007).

3. Induction de l'apoptose

Nous avons évoqué lors de la description de quelques dérivés du platine d'intérêt que le but premier de la formation de lésions sur l'ADN des cellules cancéreuses était l'induction de la mort cellulaire (Eastman, 1990). Il existe un seuil de tolérance des lésions, non précisement défini (Bagchi & Raychaudhuri, 2010), mais qui correspond au point où les capacités de réparation de la cellule sont dépassées par le trop grand nombre de dommages présents sur l'ADN. Une fois ce seuil franchi, la balance penche en faveur de l'activation de l'une des deux voies de mort cellulaire : apoptose ou bien nécrose (Fuertes *et al.*, 2003). Les très hautes doses sont responsables de phénomènes nécrotiques, notamment par une hyperactivation des protéines de la famille PARP, qui en retour causent une déplétion en NAD^+ et ATP, engendrant la nécrose (Wang & Lippard, 2005). Des doses plus faibles, au

contraire, entraînent la cellule vers une mort contrôlée et plus « propre », l'apoptose. Ce mécanisme joue ainsi un rôle de suppression de tumeur.

Les deux voies classiques d'activation des caspases semblent impliquées dans la réponse aux traitements par les dérivés du platine : la voie intrinsèque (dite aussi mitochondriale) induite par de nombreux agents endommageant l'ADN, mais également la voie extrinsèque (Figure 16). Nous verrons que les voies qui aboutissent à l'induction de l'apoptose ne passent pas toujours par les lésions de l'ADN mais également par une altération directe de la mitochondrie par les dérivés du platine. Les mécanismes biochimiques qui régulent ces voies sont extrêmement complexes et leurs enchaînements et interdépendances encore sujets à débat.

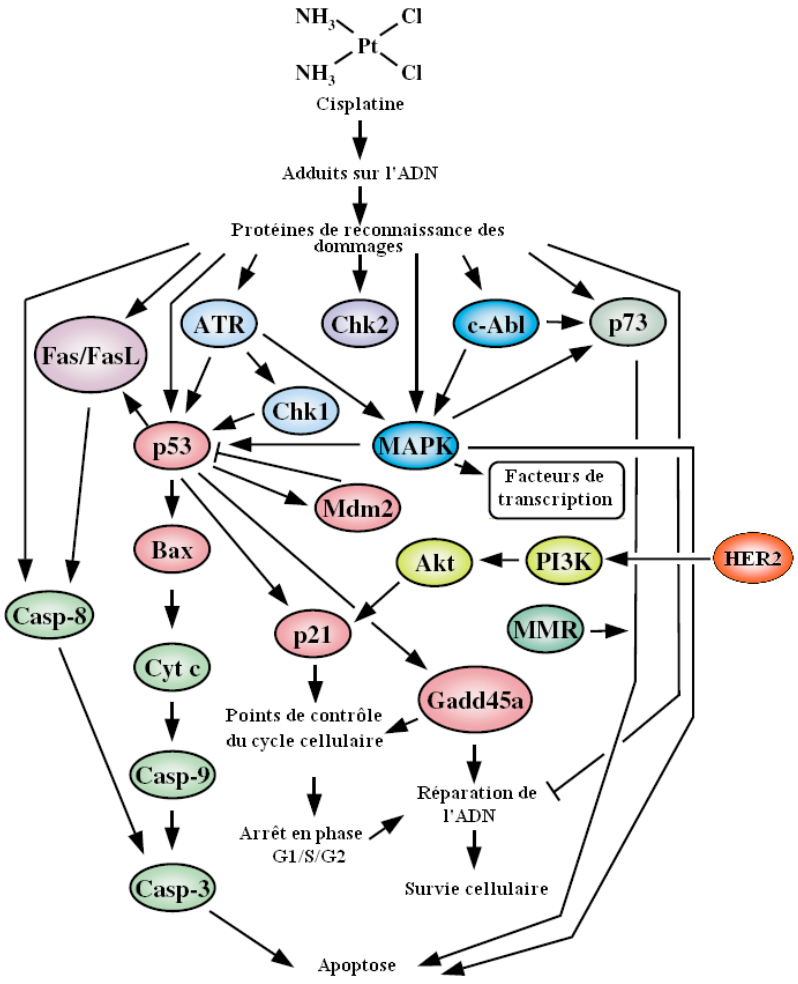


Figure 16 : La complexité des voies biochimiques d'enclenchement de l'apoptose suite à la détection de dommages induits par le cisplatine sur l'ADN (adapté de Siddik, 2003).

- Voie intrinsèque

La voie intrinsèque est initiée par de nombreux génotoxiques dont les dérivés du platine. L'un de ses acteurs clefs est la protéine p53 qui peut être activée *via* différents

mécanismes suite à l'action de ces agents de chimiothérapie. Cette activation passe par exemple par une phosphorylation de p53 par l'intermédiaire de la kinase ATR ou par des éléments de la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) tels que ERK (*extracellular-regulated kinase*).

Les différentes voies mettant p53 en jeu aboutissent notamment à l'induction de l'un ou l'autre de deux facteurs, ce qui a pour effet de décider du sort de la cellule. L'expression de p21 a pour effet de retarder l'entrée en phase S et explique que les cellules ne s'engagent plus vers l'apoptose : elles disposent au contraire d'un délai supplémentaire pour effectuer la réparation de l'ADN endommagé. À l'inverse, la protéine pro-apoptotique Bax peut elle-aussi être induite, passer du cytosol à l'intérieur de la mitochondrie et participer au relargage du cytochrome C en déstabilisant la membrane mitochondriale. Ceci a pour effet d'activer la voie des caspases et d'enclencher l'apoptose. Plus précisément, c'est le ratio entre Bax et une protéine proche mais au rôle antagoniste, Bcl-2, qui décide du basculement vers l'apoptose (Siddik, 2003).

- Voie extrinsèque

La voie extrinsèque caspase 8/caspase 3, quant à elle, peut être activée pour entraîner la cellule vers l'apoptose. Le récepteur transmembranaire Fas/CD95 forme avec son ligand FasL/CD95L le complexe DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) qui participe à l'activation de la caspase 8. Il a par exemple été démontré que le traitement de lignées cellulaires par le cisplatine était capable de provoquer une surexpression du marqueur CD95, susceptible d'activer cette voie extrinsèque (Fulda *et al.*, 1998).

- Ciblage direct de la mitochondrie

Les dérivés du platine peuvent induire l'apoptose en touchant directement la mitochondrie. En effet, l'ADN génomique n'est certainement pas la seule cible déterminante du cisplatine, et les dommages à la mitochondrie commencent à faire l'objet de plusieurs projets de recherche pour étudier les voies contribuant à la libération du cytochrome. Les dommages à l'ADN mitochondrial peuvent être impliqués, puisqu'il s'y forme proportionnellement plus d'adduits que sur l'ADN génomique (Cullen *et al.*, 2007). L'endommagement de l'ADN mitochondrial serait d'ailleurs responsable de certains effets secondaires du cisplatine (Devarajan *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Schwerdt *et al.*, 2003). La réparation des adduits sur l'ADN mitochondrial reste à éclaircir car cette organelle est dépourvue du système de réparation par excision de nucléotides, mais disposerait de voies propres, incluant réparation par excision de base (BER), recombinaison homologue (HR) et suture des extrémités (*non homologous end joining*, NHEJ) (Liu & Demple, 2010). L'étude des effets du cisplatine sur des cellules privées de leurs noyaux (cytoplastes issus de lignées de cancers ORL) a apporté des éléments pertinents qui confirment l'existence de voies

apoptotiques indépendantes des dommages à l'ADN génomique. La sensibilité de ces cytoplastes reste en effet proportionnelle à la dose de cisplatine administrée, et la libération du cytochrome C est toujours observée. À l'inverse, priver les cellules de leur ADN mitochondrial leur confère une plus grande résistance au cisplatine (Yang *et al.*, 2006).

Pour expliquer ce mécanisme, cette étude a suggéré l'influence de rôle de canaux ioniques voltage-dépendants, sur lesquels se lient les dérivés du platine. Exprimés dans les lignées de cancers ORL étudiées, ces canaux forment un complexe avec, entre autres, des membres de la famille Bax/Bcl-2 et pourraient favoriser la rupture de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome C. De plus ces canaux sont aussi insérés dans la membrane plasmique, le reticulum endosplasmique (RE) et la membrane nucléaire, ce qui permet d'envisager un rôle dans l'induction de l'apoptose par la voie extrinsèque (Thinnes, 2009). Des travaux sur d'autres modèles de cellules tumorales permettront de confirmer que l'influence des mitochondries dans la toxicité du platine s'étend au-delà des seuls cancers ORL.

Très certainement, les dérivés du platine sont responsables de l'induction de l'apoptose par d'autres voies, indépendantes des dommages à l'ADN. Celles-ci restent à découvrir ou approfondir à partir des indices expérimentaux déjà existants. C'est notamment le cas pour la voie de réponse au stress du RE. Celle-ci est généralement enclenchée lorsque cette structure se trouve incapable d'effectuer un repliement correct des protéines nouvellement synthétisées, résultant en une pause dans la production de protéines, et l'activation des protéines de la *cellular unfolded protein response*. Cette voie peut à son tour enclencher un processus d'apoptose si la situation est trop critique, et c'est ce qui paraît se produire au sein de cytoplastes issus de cellules de tubules proximaux du rein après traitement au cisplatine (Mandic *et al.*, 2003; Rabik & Dolan, 2007; Yu *et al.*, 2008)

Nous avons donc constaté que la toxicité des dérivés du platine résulte de l'addition de plusieurs effets. La formation d'adduits inhibant réplication et transcription est peut-être le plus important de ces effets, mais l'influence des autres processus est loin d'être négligeable et est parfois déterminante, selon les types de cancers. Les phénomènes de résistance aux dérivés du platine, dont il va maintenant être question, touchent pour la plupart les étapes déjà évoquées lors de la description des voies de toxicité.

D) Bases moléculaires de la résistance aux dérivés du platine

Nous avons précédemment cité les succès obtenus grâce à l'utilisation du cisplatine, notamment pour le traitement des tumeurs testiculaires. Ces excellents résultats ne se confirment pas systématiquement pour d'autres types de cancers, notamment à cause de mécanismes de résistance intrinsèques (cancers des poumons non à petites cellules,

colorectaux, de la prostate, du sein) ou acquis par les cellules tumorales (cancers ovariens) après un traitement initial.

Les bases moléculaires exactes de ces phénomènes n'ont pas encore été précisément déterminées, mais plusieurs mécanismes paraissant capables d'y contribuer ont tout de même été identifiés et peuvent être classés en deux catégories (Fuertes *et al.*, 2003) : ceux qui empêchent le cisplatine d'atteindre sa cible privilégiée, et ceux qui bloquent l'induction de la mort cellulaire en augmentant les capacités de tolérance aux dommages (diminution du nombre de lésions, perte de la transduction du signal de mort cellulaire). Même si l'un ou l'autre de ces mécanismes peut être prépondérant au sein d'un tissu cancéreux, il faut garder à l'esprit que la résistance d'une lignée à un agent toxique est généralement multifactorielle, et que plusieurs d'entre eux se trouvent certainement mis en jeu chez les patients concernés.

1. Mécanismes empêchant les dérivés du platine d'atteindre l'ADN

Nous avons précédemment décrit les étapes franchies par les dérivés du platine depuis leur administration systémique jusqu'à leur réaction avec certaines bases de l'ADN. À chacune de ces étapes correspond un mécanisme contribuant à la résistance cellulaire contre ces agents thérapeutiques, principalement par la diminution de la pénétration dans le cytoplasme puis par l'inactivation des molécules platinées à l'intérieur de celui-ci. Nous allons maintenant aborder ces deux points.

- Entrée du dérivé à l'intérieur de la cellule

Les lignées cellulaires résistantes au cisplatine présentent fréquemment une accumulation intracellulaire réduite de cette molécule. Cela peut être dû soit à une diminution de la pénétration à travers la membrane, soit à une excrétion accrue. Le mécanisme exact d'entrée du cisplatine dans la cellule n'est pas encore clairement élucidé, on l'a vu lors de la description de cette étape. L'hypothèse d'une diffusion passive (non saturable) à travers la membrane est supportée expérimentalement et généralement admise : la molécule de cisplatine est hautement polaire et pénètre assez lentement dans la cellule ; le pH, la concentration en ions sodium et potassium, ainsi que la présence d'agents réducteurs à l'intérieur de la cellule influencent l'entrée du cisplatine. Cependant, il existe aussi des indications du rôle de protéines membranaires dans la facilitation du passage de cette barrière

Le rôle de CTR1 a été décrit précédemment et, de ce fait, une régulation altérée de l'expression de ce transporteur est à même de jouer sur l'accumulation de la drogue à l'intérieur de la cellule même s'il ressort tout de même que les niveaux intracellulaires réduits sont majoritairement dus à une entrée limitée du cisplatine.

L'action de protéines de type *multidrug resistance proteins* (MRP) a été également envisagée. Elles ont pour rôle physiologique normal l'élimination de xénobiotiques, notamment les métaux lourds, par un mécanisme d'efflux ATP-dépendant. La pompe d'efflux

P-glycoprotéine, responsable de résistances multiples, n'est pas surexprimée chez les lignées résistantes au cisplatine. Une lignée de mélanome humain résistante au cisplatine surexprime la pompe MRP2, augmentation qui est corrélée avec une diminution du nombre d'adduits (Liedert *et al.*, 2003; Guminski *et al.*, 2006). De même, des hépatocytes de rat modifiés n'exprimant pas cette protéine se trouvent sensibilisés au cisplatine, mais plusieurs spécimens de cancer ovarien étudiés en parallèle ne montrent pas d'altération significative de l'expression de MRP2 (Guminski *et al.*, 2006). En revanche, des études infirmant cet effet ont aussi été publiées (Stewart, 2007).

Aucune autre protéine de ce type ayant un impact direct dans l'efflux actif du cisplatine n'a été formellement identifiée à ce jour, mais plusieurs candidats susceptibles de posséder cette capacité sont à l'étude (Kartalou & Essigmann, 2001a; Fuertes *et al.*, 2003; Kelland, 2007).

- Inactivation du dérivé par des agents intracellulaires

Bien que l'association des dérivés du platine avec des biomolécules autres que l'ADN ne soit pas regardée comme un des mécanismes biochimiques majeurs de leur action, nous avons vu que la plus grande partie des complexes platinés parvenant à passer la membrane plasmique interagit avec les protéines intracellulaires. Notamment, ils se trouvent inactivés par conjugaison avec certains peptides ou protéines. C'est le cas des protéines cytoplasmiques possédant des groupements thiol, notamment le glutathion et les métallothionéines, riches en acides aminés soufrés (cystéine et méthonine) auxquels le cisplatine se lie de façon préférentielle.

Le tripeptide glutathion (γ-L-glutamyl-L-cystéinylglycine) est présent à des concentrations importantes (0,5-10mM) dans le cytoplasme. Il peut se lier de façon covalente au cisplatine suite à une attaque nucléophile, formant un complexe qui est transporté à l'extérieur de la cellule par une pompe ATP-dépendante. Ce mécanisme d'élimination du cisplatine est également actif pour d'autres molécules endommageant l'ADN génomique, notamment les agents alkylants (Kelland, 2007). Une inhibition de la synthèse de glutathion par la buthionine sulfoximine engendre une diminution significative de la dose létale 50 (DL_{50}) de cisplatine chez des lignées de cancer ovarien parentale et résistante (Andrews *et al.*, 1988) ainsi que chez une lignée de cancer ORL. Un régime à base de buthionine sulfoximine administré à des souris transplantées avec cette dernière lignée double leur temps de survie par rapport à la chimiothérapie seule (Bier, 1991).

Le rôle du glutathion dans la détoxification du platine, s'il n'est pas négligeable, n'est cependant peut-être pas critique. Le rôle de la GST P1-1, préalablement associée à des cas de résistance au cisplatine, a été vérifié sur des lignées MCF7 (carcinome mammaire) et HepG2 (hépatocarcinome), montrant que son activité de conjugaison du cisplatine au glutathion ne permet d'augmenter que très faiblement la résistance des lignées, y compris lorsque les capacités de conjugaison de la protéine sont améliorées (Peklak-Scott *et al.*, 2008).

L'existence d'autres rôles pour le glutathion dans la médiation de la toxicité du platine est à envisager. Une étude portant sur plusieurs lignées issues de cancers de la sphère ORL a en effet montré qu'une déplétion du glutathion est associée avec une augmentation de l'apoptose malgré une stagnation de la quantité d'adduits formés (Yang *et al.*, 2000). Cela indique clairement que si le glutathion a un effet direct sur la formation des lésions, il possède également une influence sur la cytotoxicité des dérivés en marge de l'apparition des dommages. Une hypothèse concerne la production de ROS par les dérivés ou provoquée après relargage du cytochrome C lors des étapes initiales d'induction de l'apoptose (Cullen *et al.*, 2007).

2. Mécanismes intervenant après la formation des lésions

Les molécules platinées ayant passé les barrières citées ci-dessus réagissent avec l'ADN pour former des adduits dont la présence est potentiellement cytotoxique. Des mécanismes conférant aux cellules des capacités de résistance peuvent alors intervenir à deux niveaux principaux : réparation accrue des dommages et inhibition de l'apoptose. Les paragraphes qui suivent sont consacrées à ces mécanismes.

- Réparation accrue des dérivés du platine

Les cellules peuvent survivre à l'action du cisplatine après sa liaison à leur ADN grâce aux systèmes de réparation de l'ADN. Certaines lignées tumorales possèdent des capacités augmentées de réparation de l'ADN. Nous avons vu que c'est principalement le système NER qui prend en charge la réparation des adduits du cisplatine. Des phénomènes de résistance sont associés à une surexpression de deux acteurs de ce mécanisme, XPF et surtout ERCC1 (Dabholkar *et al.*, 1992; Ferry *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005). De récents travaux résument l'état des connaissances concernant le lien entre l'expression de ces deux protéines et la sensibilité aux dérivés du platine. L'utilisation d'ARN interférents pour éteindre l'expression d'ERCC1 et XPF dans différents lignées cancéreuses (ovariennes, mammaires, bronchiques non à petites cellules) permet en effet d'empêcher la réparation des adduits majoritaires apparus après traitement au cisplatine, et de favoriser la formation de cassures double-brin résultant de la persistance des adduits sur l'ADN génomique (Arora *et al.*, 2010). ERCC1/XPF seul n'interagit donc pas directement avec les adduits du platine, mais ce complexe peut par contre servir de marqueur prédictif de la réponse au traitement (Martin *et al.*, 2008). ERCC1/XPF possèderait un rôle additionnel potentiel dans le traitement des adduits interbrins, qui posent un réel challenge à la NER puisque les deux brins sont endommagés et qu'il n'est alors plus possible d'utiliser le brin complémentaire pour resynthétiser le fragment excisé avec la lésion. Lors de l'arrêt de la machinerie de réplication, par exemple, ERCC1/XPF viendrait réaliser une double incision, de chaque côté de la lésion, résultant en une cassure double-brin qui serait prise en charge par la voie HR. Il s'agit d'un

modèle établi sur un pontage interbrin réalisé avec le psoralène, mais il pourrait également jouer dans le cas des dérivés du platine (Kuraoka *et al.*, 2000).

La contribution de la voie NER à une résistance au cisplatine est modeste (Siddik, 2003), mais pourrait cependant suffir à faire échouer un traitement chimiothérapeutique (Aebi *et al.*, 1996). Cela souligne également un probable effet synergique avec d'autres voies modulant l'ampleur de la résistance totale de chaque tumeur. Dans le cas du système MMR, à l'inverse, une augmentation de la tolérance aux adduits platinés a été observée lorsque ses fonctions sont perdues, à cause de l'effet mutagène du cisplatine. L'acquisition de capacités de résistance par des cellules de tumeurs ovarienne et colorectale a pu être attribuée à la perte de la MMR, et notamment de MLH1 (Aebi *et al.*, 1996).

En marge des activités de réparation, n'oublions pas le rôle de la synthèse translésionnelle, qui contribue elle-aussi à la résistance cellulaire par le contournement des lésions qu'elle permet.

- Évasion apoptotique

L'ultime possibilité pour les cellules de survivre à un traitement platinant est l'échappement apoptotique. Généralement, la mort cellulaire résultant d'une exposition au cisplatine se fait au travers de la machinerie apoptotique, dont les étapes sont nombreuses et impliquent la variation d'un équilibre entre signaux pro- et anti-apoptotiques. Une inhibition de cette voie moléculaire à l'un ou l'autre de ses points critiques a donc pour effet d'augmenter les capacités de résistance des lignées cellulaires au cisplatine. p53 est la première cible des recherches menées sur cet aspect de la résistance aux dérivés du platine, puisque cette protéine se trouve mutée dans près de la moitié des tumeurs (Wang & Lippard, 2005). Une meilleure réponse au traitement est observée chez les cellules qui expriment une forme sauvage de p53. Les mutations les plus communément observées ciblent les capacités de liaison à l'ADN, empêchant celle-ci de transactiver les gènes qui en dépendent, notamment Bax. Les cellules se trouvent alors incapables d'enclencher les points de contrôle du cycle cellulaire.

Là encore, la sensibilité des tumeurs possédant une forme altérée de p53 dépend du degré de cette altération, de leur origine tissulaire, de l'environnement cellulaire, et de l'altération éventuelle de tous les mécanismes en amont et aval de l'action de la protéine. Par exemple, la surexpression de Mdm2, régulateur négatif de p53, a pour conséquence une résistance accrue au platine de cellules possédant une forme non mutée de p53. C'est AKT, par une phoshorylation de Mdm2, qui provoque la relocalisation nucléaire de cette protéine et lui permet alors de jouer son rôle d'inhibiteur de p53 (Wang & Lippard, 2005).

Les kinases Aurora phosphorylent p53, provoquant son ubiquitinylation et son adressage pour dégradation. Elles se trouvent surexprimées dans certains tissus tumoraux, et leur extinction permet de restaurer l'arrêt du cycle en G_2/M et de sensibiliser de nouveaux les cellules au cisplatine (Katayama *et al.*, 2004).

Quant à la protéine Bcl-2, elle est, nous l'avons dit, l'un des facteurs anti-apoptotiques classiques. Elle forme des homodimères dont l'excès par rapport à son antagoniste Bax empêche les cellules de s'engager vers l'apoptose. De ce fait, sa surexpression au sein de tumeurs ou lignées cellulaires résistantes au cisplatine a été maintes fois constatée (Cho *et al.*, 2006; Cullen *et al.*, 2007; Michaud *et al.*, 2009) et associée à un fort risque de rechute du cancer. Une influence similaire est attribuée à Bcl-xL, autre membre de la même famille. L'influence de voies apoptotiques indépendantes de p53 a été aussi identifiée. La kinase AKT possède là encore un rôle à jouer, en tant que régulatrice négative de l'apoptose par la phosphorylation du facteur XIAP, elle-même responsable d'une diminution d'activité de la caspase 3, cruciale pour le déclenchement de la mort cellulaire programmée (Siddik, 2003). On peut aussi évoquer l'activation de p21 *via* HER2, une tyrosine kinase membre d'un complexe transmembranaire surexprimé dans 20 à 30% des tumeurs mammaires et ovariennes. Sa surexpression est corrélée avec une faible réponse au cisplatine. Elle a pour effet d'augmenter l'activité d'AKT, qui s'associe alors avec p21 pour assurer la localisation cytoplasmique de cet inhibiteur de CDK d'où un arrêt en G_2/M et la possibilité pour la cellule de réparer les dommages.

La Figure 17 résume l'ensemble des étapes critiques au niveau desquelles un mécanisme de résistance aux dérivés du platine peut se manifester.

Comme nous venons de le voir, il existe plusieurs voies moléculaires par lesquelles le cisplatine et ses dérivés agissent afin d'éliciter la mort cellulaire. C'est ce qui rend ces agents anticancéreux si efficaces. Cependant, la Médecine a aussi vu apparaître les limites de leur utilisation, que ce soit par l'apparition de phénomènes de résistance, d'effets secondaires indésirables, ou de problèmes de biodisponibilité. Afin de mieux comprendre l'ensemble des processus qui régissent les répercussions biologiques des dérivés du platine, il apparaît nécessaire d'identifier les protéines impliquées dans la reconnaissance et la prise en charge de ces dommages, ainsi que celles qui présentent une capacité d'interaction avec ceux-ci alors qu'il ne s'agit pas de leur fonction initiale.

La réparation de l'ADN, en première ligne, est un ensemble de voies très étudiées depuis des décennies et dont certains des acteurs sont déjà connus pour leur capacité à interagir avec les lésions des dérivés du platine. En outre, et nous l'avons déjà abordé en citant certaines d'entre elles, d'autres protéines non directement impliquées dans la réparation sont aussi capables de se lier aux mêmes lésions, engendrant des conséquences au niveau cellulaire. La seconde partie de notre analyse bibliographique est donc consacrée à ces protéines interagissant avec les lésions platinées, qu'elles soient facteurs de la réparation ou impliquées dans d'autres processus biologiques.

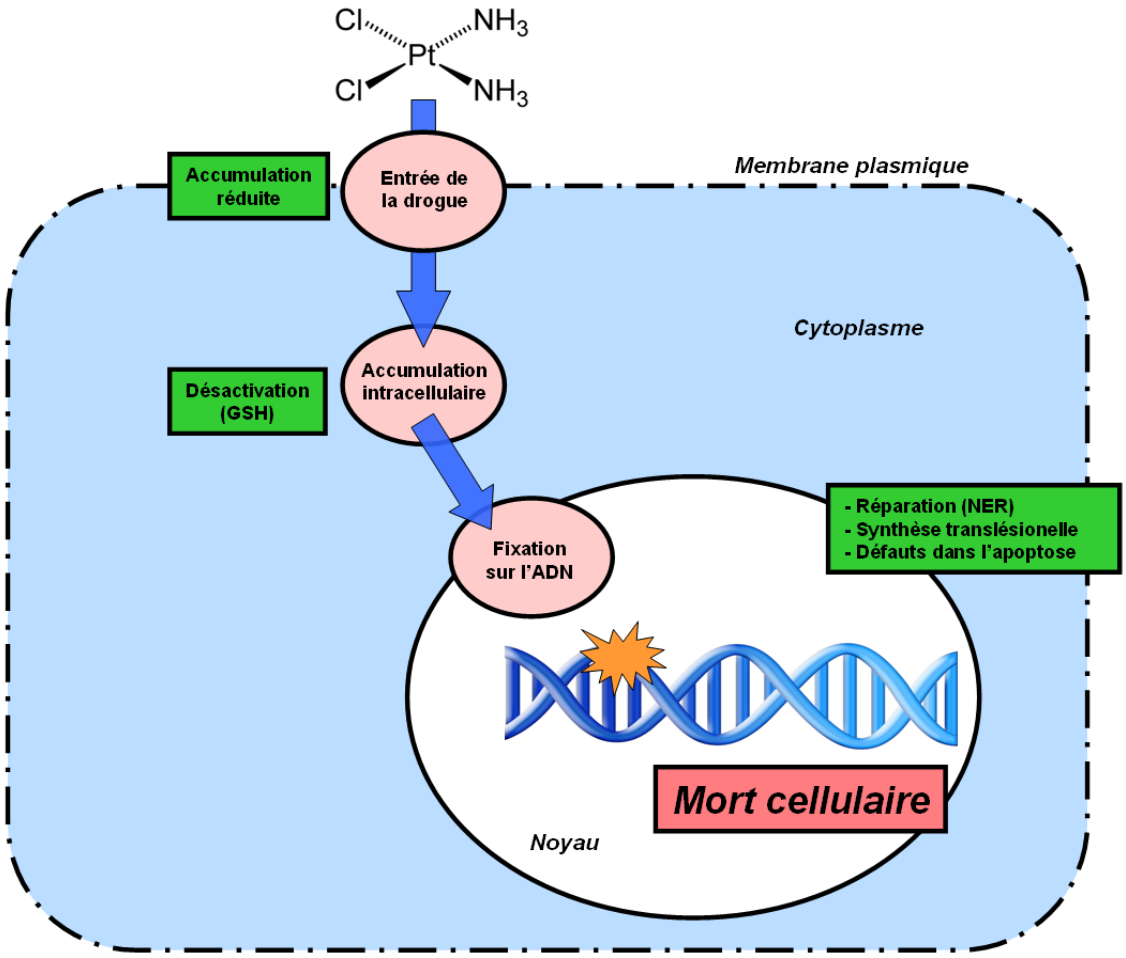


Figure 17 : Les mécanismes moléculaires majeurs associés à la résistance aux dérivés du platine, de leur entrée dans la cellule jusqu'à l'enclenchement de la mort cellulaire.

II. Interaction des adduits platinés avec des partenaires protéiques

Les lésions induites par les dérivés du platine entraînent des déformations de la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN, déformations qui présentent des conséquences potentiellement délétères pour la cellule. Ces modifications peuvent être reconnues par différentes catégories de protéines : ce peut être leur rôle premier, dans le cas des acteurs de la réparation des dommages de l'ADN, ou un rôle annexe mais lié aux fonctions qu'elles exercent naturellement, puisque découlant de leurs capacités à reconnaître des conformations particulières de l'ADN.

Dans cette deuxième partie, nous allons décrire les protéines connues pour leur capacité à établi un contact direct avec les adduits du platine. Nous nous pencherons tout d'abord sur les facteurs impliqués dans les mécanismes de réparation NER et MMR. Ensuite, nos évoquerons d'autres protéines de la réparation des cassures de l'ADN (HR et NHEJ). Enfin, nous nous pencherons sur les autres acteurs protéiques connus pour leur capacité à interagir avec les adduits platinés mais n'appartenant pas aux systèmes de réparation.

A) Interaction avec les protéines de réparation

L'ADN de chaque cellule eucaryote subit quotidiennement la formation de plus de 10 000 lésions (Ataian & Krebs, 2006) produites par des agents génotoxiques exogènes. La nature de ces agents varie largement : rayons X, rayonnements UV, polluants chimiques (B[a]P), agents chimiothérapeutiques (dérivés du platine, moutardes azotées), etc. À cela s'ajoutent les hydrolyses spontanées de bases, les produits d'oxydation issus du stress oxydant endogène et les erreurs de réplication.

Il est impératif pour la cellule d'être capable de prendre en charge ces lésions, sous peine de subir mutations, instabilité génomique, puis vieillissement et mort ou cancérisation. En raison de leurs origines très diverses, la structure chimique et la taille des lésions ainsi que la conformation spatiale qu'elles imposent à la double hélice d'ADN sont très différentes. La réponse cellulaire à ces altérations n'est pas unique et passe par cinq mécanismes principaux de détection et de réparation des lésions de l'ADN identifiés et décrits plus ou moins complètement à ce jour.

Nous avons déjà décrit les étapes principales de deux d'entre eux, particulièrement impliquées dans la prise en charge des lésions générées par les dérivés du platine. Nous allons maintenant évoquer, parmi tous les acteurs de ces mécanismes, les protéines qui participent directement à une interaction avec les adduits.

1. Interactions avec les protéines de la voie NER

La souplesse de la voie NER, c'est-à-dire sa capacité à détecter des lésions parfois assez différentes en termes de degré de déformation de l'ADN, passe par l'existence de

plusieurs acteurs de leur reconnaissance. La sous-voie GGR fait appel à deux complexes spécialisés : XPC-HR23B et UV-DDB. Nous allons tout d'abord nous intéresser aux propriétés de ceux-ci, en insistant largement sur la composante DDB2 du complexe UV-DDB puisque celle-ci se trouve au cœur de l'un des axes de cette thèse. Ensuite, les autres acteurs significatifs de la voie NER seront aussi abordés.

- XPC-HR23B

Cet hétérodimère senseur des lésions volumineuses reconnaît la structure particulière de l'ADN induite par la taille importante du dommage, de type petite bulle simple-brin (Mocquet & Egly, 2006). Il est suffisant pour effectuer l'étape de détection lors de reconstitions de l'activité de la NER *in vitro*, alors qu'*in vivo* la protéine culine 2 est également présente dans le complexe, sans que l'on puisse encore préciser son rôle exact (Neher *et al*., 2010). L'extraordinaire capacité de XPC à distinguer efficacement la conformation physiologique de la double hélice (lors de l'assemblage de la chromatine ou durant la transcription) des déformations induites par des bases lésées est longtemps restée mal expliquée. Deux acides aminés aromatiques critiques (Trp690 et Phe733) ont été récemment identifiés dans la partie C-terminale conservée de la protéine, au sein d'un motif de type repliement OB (*oligonucleotide-binding*) caractéristique des protéines se liant à des séquences d'acides nucléiques simple-brin (Maillard *et al*., 2007). Ces résidus semblent participer à un mécanisme de reconnaissance inversé au cours duquel c'est la partie simple-brin non lésée (en face de la lésion) dont les bases se trouvent expulsées vers l'extérieur de la double hélice, qui est repérée. Ce mécanisme procure un mode de reconnaissance universel à toute lésion induisant de grandes déformations de l'ADN.

L'influence de HR23B n'est pas encore précisément définie, mais elle participerait à l'ubiquitinylation de XPC, qui au lieu d'envoyer cette protéine vers la machinerie de dégradation, augmenterait son affinité pour l'ADN (Nouspikel, 2009). Des travaux récents sur l'adduit majoritaire du cisplatine suggèrent même un mécanisme de reconnaissance plus complexe que celui que l'on vient d'évoquer, au cours duquel XPC établirait un contact avec brin lésé et brin non lésé, en 5' et en 3' de la lésion, et qu'il en serait de même pour HR23B (Neher *et al*., 2010).

La fixation de XPC-HR23B accentue la distorsion de la double hélice, facilitant ainsi le recrutement des autres facteurs. L'affinité du complexe mesurée par retard sur gel est plus de dix fois supérieure pour l'ADN portant un adduit du platine que pour l'ADN non lésé, et environ trois fois inférieure (K_d = 27nM) pour les adduits 1,2-d(GpG) que pour les adduits 1,3-d(GpNpG) (K_d = 8nM), ce qui est corrélé avec la différence de vitesse de réparation de ces lésions, de deux à trois fois supérieure pour l'adduit 1,3-d(GpNpG) (Trego & Turchi, 2006).

- UV-DDB

Les dommages UV, comme les adduits des dérivés du platine, déstabilisent la double hélice d'ADN qui devient plus flexible. Les bases dimérisées sont susceptibles d'être éjectées vers l'extérieur de l'hélice. Les lésions CPD ont un effet moins perturbateur que les lésions (6-4)-PP sur la structure de l'ADN (Kim *et al*., 1995). En raison de cette particularité, XPC-HR23B, pourtant capable de reconnaître une grande variété de déformations, se retrouve limité dans son aptitude à détecter les CPD, notamment en contexte chromatinien (Fitch *et al.*, 2003b). Un autre mécanisme est donc nécessaire, et il passe par le complexe UV-DDB (Scrima *et al*., 2008).

UV-DDB est, au sein de la sous-voie GGR, l'acteur spécialisé dans la détection des lésions UV en contexte chromatinien. Sa découverte est maintenant assez ancienne (Feldberg & Grossman, 1976) mais son mécanisme d'action fait encore l'objet de travaux. Ce complexe ne remplace pas intégralement XPC-HR23B, mais intervient plutôt en amont de ce dernier, dont il va favoriser le recrutement. Il est formé de deux sous-unités, DDB1 et DDB2, autrement appelées p127 et p48, respectivement. Le gène codant pour DDB2 est muté chez les malades souffrant de la variante XPE du syndrôme de *xeroderma pigmentosum*. Cette pathologie est associée à des mutations au sein des acteurs de la voie NER. Elle se caractérise par une extrême sensibilité au rayonnement UV et par une forte incidence de cances cutanés. La forme XPE de cette atteinte présente des symptômes atténués par rapport aux autres variants, puisque les capacités de réparation par la voie NER dans les cellules issues de patients conservent 40 à 60% des capacités de cellules normales (Rapic Otrin *et al*., 1998). DDB2 est une protéine exclusivement nucléaire qui, au sein du complexe, constitue l'élément de reconnaissance des photoproduits. DDB1, majoritairement cytoplasmique, est relocalisé à l'intérieur du noyau suite à l'augmentation de l'expression de DDB2 (Shiyanov *et al*., 1999). À l'inverse de cette dernière, DDB1 n'établit pas de contact avec l'ADN (Scrima *et al*., 2008) mais est cependant capable d'interagir avec CSA pour permettre la réparation par la voie TCR (Fousteri *et al*., 2006).

Les mutations observées chez les patients XPE ciblent des éléments responsables de l'interaction de DDB2 avec soit l'ADN lésé, soit DDB1. Si le mécanisme d'interaction entre DDB1 et DDB2 se trouve aboli, les conséquences sont négatives pour l'enclenchement du GGR (Scrima *et al*., 2008). UV-DDB reconnaît tout d'abord la lésion sur l'ADN et recrute XPC-HR23B. DDB1 s'associe ensuite avec CUL4/RBX1 pour former un complexe de type E3 ubiquitine ligase, dont l'activité est inhibée en temps normal par une association avec le signalosome COP9. La relocalisation chromatinienne suite à un stress génotoxique entraîne la perte de cette association, rendant UV-DDB/CUL4/RBX1 capable d'ubiquitiner XPC et DDB2 après fixation sur le dommage. L'affinité de DDB2 pour le dimère photoinduit se trouverait alors diminuée, ce qui lui permettrait de se détacher et être subséquemment dégradée par le protéasome (Li *et al*., 2006). À l'inverse, l'affinité de XPC pour le dommage se trouverait renforcée. Par ce mécanisme se produirait donc un transfert de la prise en charge

de la lésion, de DDB2 vers XPC, alors que le reste du complexe se détache grâce à l'auto-ubiquitination de CUL4/RBX1 (Sugasawa *et al*., 2005). Ce mécanisme, s'il est communément admis, est peut-être plus complexe, puisque UV-DDB paraît être également capable de recruter sur le site du dommage XPA, facteur qui se positionne suite à la reconnaissance de la lésion par XPC-HR23B (Wakasugi *et al*., 2009).

Le site de reconnaissance des dommages de DDB2 est de petite taille et parfaitement adapté aux photoproduits, peu déformants. Ceci explique le fait que des lésions de taille plus importante, comme par exemple les moutardes azotées, soient de moins bons substrats pour la protéine. DDB2 possède un élément en « épingle à cheveux » (*hairpin*) composé des résidus Phe371, Gln372 et His373, très conservés parmi ses orthologues. Il s'insère au cœur du duplex d'ADN, au niveau du petit sillon, élargissant celui-ci et générant un débobinage de l'ADN d'environ 23°. Par ce mécanisme le dimère de lésion est éjecté vers l'extérieur (remplacé, en quelque sorte, par les résidus Gln372 et His373), alors que ses bases complémentaires restent à leur position initiale. Cette section d'ADN simple-brin est stabilisée par l'épingle de DDB2 (Figure 18). Les bases flanquantes de la lésion ne semblent pas avoir d'influence sur les capacités de reconnaissance de DDB2 (Scrima *et al*., 2008). *In vitro*, DDB2 interagit préférentiellement avec les (6-4)-PP. *In vivo* en revanche, ce sont les CPD qui sont préférentiellement reconnus du fait de la capacité réduite de XPC à traiter ces lésions. Ainsi, la réparation des CPD est largement diminuée chez les cellules de patients XPE, alors que celle des (6-4)-PP est moins affectée. Ces considérations expliquent le phénotype moins sévère de ces malades (Tang & Chu, 2002).

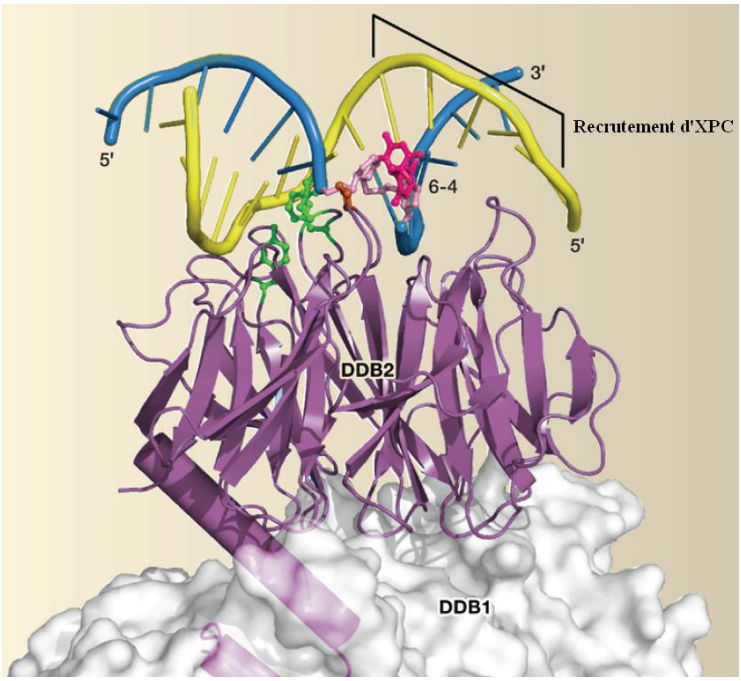


Figure 18 : Structure du complexe UV-DDB fixé sur une lésion de type (6-4)-PP. DDB2 insère deux de ses résidus (en vert) au niveau du petit sillon près du site de la lésion. DDB1 assure la stabilisation du complexe. XPC-HR23B peut ensuite être recruté afin de poursuivre les étapes de la NER (adapté de Chu & Yang, 2008).

La présence de sept domaines WD40 sur la protéine indique qu'elle pourrait être capable de faciliter le remodelage de la chromatine au niveau du site de lésion, justifiant par là son rôle aux côtés de XPC (Hwang *et al.*, 1998). Il faut ajouter que l'ubiquitination par le complexe UV-DDB/CUL4/RBX1 des histones entourant la zone lésée aurait pour conséquence une relaxation du nucléosome, facilitant l'accès aux facteurs de la NER dont l'assemblage nécessite, on l'a vu, le dégagement d'une certaine longueur de brin (Thoma, 2005; Scrima *et al.*, 2008). Ce mécanisme implique une diminution rapide de la quantité de DDB2 au sein de la cellule après un stress génotoxique. En outre, l'expression de DDB2 est maximisée lors de la transition G_1/S, ce qui concorde avec un mécanisme de contrôle de l'ADN génomique avant sa réplication (Nag *et al.*, 2001).

La modulation de l'expression de DDB2 au cours du temps suite à une exposition au rayonnement UV est bien documentée. Le niveau de la protéine décroît rapidement (01h00-02h00) après application du stress (Rapic-Otrin *et al*., 2002; Fitch *et al*., 2003a; Barakat *et al*., 2009), puis la transcription du gène reprend alors véritablement dès 04h00 chez des cellules HeLa (Praetorius-Ibba *et al*., 2007), mais bien plus tardivement (24h00 à 48h00) chez les fibroblastes (Nichols *et al*., 2000; Rapic-Otrin *et al*., 2002). Ceci est en accord avec le mécanisme de prise en charge des photoproduits impliquant le recrutement de XPC-HR23B par UV-DDB et la dégradation de ce dernier afin de permettre au premier de se stabiliser et enclencher les étapes suivantes de la voie NER-GGR. Une diminution de son expression permet de ne pas interférer avec ce mécanisme, alors que l'expression est augmentée tardivement afin de restaurer la quantité basale de la protéine (Ford, 2005).

En plus des photoproduits, DDB2 possède la faculté de reconnaître d'autres types de lésions, notamment les sites abasiques, pour lesquels elle démontre une affinité plus importante que pour les CPD. Une capacité à reconnaître les adduits majoritaires du cisplatine a également été relevée, ce qui explique la présence de cette protéine dans ce chapitre (Chu & Chang, 1988; Payne & Chu, 1994; Fujiwara *et al.*, 1999). Cette propriété suggère à nouveau, pour DDB2, un rôle dans la réparation de ces dommages. En effet, on peut remarquer que la déstabilisation de la structure tridimensionnelle de la double hélice d'ADN générée par les lésions UV-induites, avec une éjection des bases concernées vers l'extérieur, est une propriété partagée avec les pontages du cisplatine. En accord avec l'hypothèse de la prise en charge des adduits platinés par DDB2, la culture de cellules HeLa avec des concentrations croissantes de cisplatine engendre l'apparition de lignées quatre fois plus résistantes que la lignée parentale, et pour lesquelles l'expression de DDB2 est augmentée d'un facteur identique. De plus, ces lignées résistantes présentent de meilleures capacités de réparation des adduits du platine (Chu & Chang, 1990) et des dommages générés par les UV (Chao *et al.*, 1991) par rapport à la lignée parentale. Malgré cela, d'autres travaux sur des fibroblastes XPE ont montré que, malgré l'absence d'une DDB2 fonctionnelle, ces cellules conservent la capacité de traiter l'adduit 1,3-d(GpTpG) du cisplatine, capacité qui est inchangée après supplémentation en UV-DDB alors que l'ajout de RPA permet d'augmenter l'efficacité de réparation (Rapic Otrin

et al., 1998). Cette étape de reconnaissance des lésions du cisplatine par DDB2 et ses répercussions biologiques ne sont pas encore bien caractérisées.

DDB2 semble posséder des rôles annexes à la seule réparation de l'ADN, que nous allons illustrer par deux exemples. Cette protéine est ainsi capable d'augmenter les capacités de transactivation du facteur de transcription E2F1, un effecteur qui se trouve en aval des voies de contrôle dépendant de pRb (suppresseur de tumeur) (Hayes *et al.*, 1998; Shiyanov *et al.*, 1999). DDB2 influe également sur le phénotype (prolifératif/invasif et métastatique). Une plus forte expression de DDB2 est associée à l'augmentation des capacités de prolifération (Kattan *et al.*, 2008), et à une régulation négative de la superoxyde dismutase à manganèse (interaction directe avec le promoteur du gène de cette enzyme), ce qui pourrait permettre l'accumulation du radical superoxyde, potentiellement impliqué dans la prolifération (Minig *et al.*, 2009).

- RPA et XPA

Ces deux facteurs responsables de la stabilisation du complexe de réparation possèdent eux-aussi, à des degrés différents, des capacités de liaison à l'ADN endommagé. XPA, tout d'abord, présente une faible affinité pour les adduits du cisplatine. Plus particulièrement, des mesures par anisotropie de fluorescence et retard sur gel permettent de chiffrer cette affinité ($K_d \approx 400nM$), qui est trois fois supérieure pour l'ADN portant un adduit 1,3-d(GpTpG) que pour l'ADN non lésé, et pratiquement équivalente pour l'ADN simple-brin non lésé que pour l'ADN double-brin non lésé. De plus, des mesures identiques en conditions physiologiques montrent un K_d de l'ordre de 2µM pour la fixation sur la même lésion. Cette affinité est dépendante de la salinité, puisqu'elle diminue d'un facteur 2-10 lorsque la concentration en ions mono- et divalents (surtout ces derniers) est abaissée. Cela suggère un rôle accessoire, sinon inexistant, de XPA dans la reconnaissance des lésions.

Quant à RPA, des mesures utilisant la même méthode indiquent une affinité pour l'ADN lésé par le cisplatine proche de celle de XPC ($K_d = 23nM$), indépendamment de la présence de XPA (Hey *et al.*, 2001). RPA se lie préférentiellement aux adduits 1,3-d(GpNpG), puis aux 1,2-d(GpG), mais interagit plus avec l'ADN non lésé qu'avec les lésions interbrins. La déstabilisation plus importante de la structure tridimensionnelle de l'ADN par les adduits 1,3-d(GpNpG), avec notamment la rupture des liaisons hydrogène, favorise la formation d'une zone simple-brin en face de la lésion, ce qui expliquerait cette préférence. De plus, RPA perd sa capacité à se lier aux adduits du platine en présence d'HMGB1, ce qui est en accord avec le modèle de protection des lésions par cette protéine (Turchi *et al.*, 1999).

2. Interactions avec les protéines de la voie MMR

La voie MMR ne participe pas à la réparation des adduits du platine mais contribue plutôt à leur toxicité. De ce fait, les capacités de reconnaissance de ces lésions par les complexes MutSα/MutSβ, et notamment leur composante MSH2, sont cruciales pour ce phénomène. MSH2 est capable de reconnaître l'ADN lésé par le cisplatine avec une bonne affinité ($K_d \approx 67nM$). Ce facteur est plus particulièrement capable de se fixer sur un adduit unique de type 1,2-d(GpG), mais pas sur les adduits 1,2-d(ApG) et 1,3-d(GpTpG), ni sur les adduits du transplatine (Duckett *et al.*, 1996; Mello *et al.*, 1996). Ajoutons à ces informations que le complexe MutSα démontre une préférence pour les lésions complexes (une lésion sur chaque brin complémentaire, l'une en face de l'autre) composées d'un adduit du cisplatine et d'un mésappariemment composé d'une thymine en face de la cytosine en 3' de l'adduit (Yamada *et al.*, 1997). Des taux bien plus élevés de MSH2 sont observés dans les tissus testiculaires et ovariens que dans le côlon, ce qui pourrait être avec la plus grande sensibilité au cisplatine des tumeurs testiculaires et ovariennes (Mello *et al.*, 1996).

3. Interaction avec les protéines de réparation des cassures simple-brin

Les cassures simple-brin sont souvent le produit de l'action de radiations ionisantes ou de ROS. Elles résultent également de l'activité avortée d'enzymes telles que les topoisomérases ou les facteurs de la MMR et de la BER. Elles sont 1 000 fois plus fréquentes que les cassures double-brin. Le complexe de réplication est susceptible de se dissocier de l'ADN à leur rencontre, générant potentiellement des cassures double-brin. Il en va de même pour le complexe de transcription, qui peut lui aussi se retrouver bloqué sur un site de cassure simple-brin (Caldecott, 2008). Les cassures générées lors de la BER sont stabilisées par XRCC1 et réparées par les acteurs habituels de ce mécanisme. Celles induites par les topoisomérases sont réparées par une voie particulière impliquant aussi XRCC1 et l'ADN ligase III. Enfin, les cassures ayant pour origine un dommage du sucre sont détectées par la poly-(ADP-ribose)-polymérase-1 (PARP-1).

PARP-1, protéine impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires dont la réparation, est l'un des principaux détecteurs des cassures simple-brin. Il s'agit de la protéine nucléaire la plus abondante après les histones (10^5 à 10^6 copies par cellule). Elle est capable d'ajouter sur elle-même (se suractivant), et sur d'autres protéines acceptrices, des groupements adénosine-diphosphate-ribose (ADP-ribose, pouvant atteindre plusieurs centaines d'unités) suite à la détection de dommages de l'ADN et à son activation. Elle retrouve son état inactivé par l'action de la poly-(ADP-ribose)-glycohydrolase.

PARP-1 possède un domaine de liaison à l'ADN contenant deux doigts de zinc. Elle fait partie des protéines à même d'interagir physiquement avec les adduits du cisplatine (Zhang *et al.*, 2004; Guggenheim *et al.*, 2009), préférant l'adduit majoritaire. Elle peut aussi se lier au même type d'adduit généré par l'oxaliplatine et un troisième candidat, le pyriplatine

(Zhu *et al.*, 2010). Suractivée (par autoribosylation), elle perd sa capacité de fixation et laisse alors la place aux protéines de réparation. Les conséquences biologiques de sa liaison manquent encore de clarté. Ainsi, un mécanisme de protection des lésions contre la voie HR, similaire à celui d'HMGB1 contre la NER, a été suggéré (Zorbas & Keppler, 2005). Malgré tout, les inhibiteurs de PARP-1 contribuent à sensibiliser des lignées tumorales au cisplatine (Miknyoczki *et al.*, 2003) et le développement de telles molécules semble constituer un champ de recherche prometteur. Enfin, la déplétion en NAD+ induite par sa suractivation lors de la présence d'une grande quantité de dommages sur le génome et les conséquences dans l'induction de la nécrose ont déjà été évoquées plus haut.

4. Interactions avec les protéines de la réparation des cassures double-brin

Les cassures bicaténaires de l'ADN comptent certainement parmi les lésions les plus dangereuses pour la cellule, si bien que la présence d'une seule cassure double-brin peut l'entraîner vers une mort programmée (Rich *et al.*, 2000). Les radiations ionisantes, les traitements radiomimétiques, le stress physique imposé aux chromosomes durant la mitose et les erreurs de réplication, qui ciblent tous cette « colonne vertébrale » de l'ADN que constitue la chaîne sucre-phosphate, sont à l'origine des cassures. Ces modifications peuvent à l'inverse être souhaitables pour la cellule, comme c'est par exemple le cas lors de la recombinaison V(D)J qui vise à diversifier le répertoire de récepteurs des cellules T ou des immunoglobulines.

Au sein du spectre de lésions des dérivés du platine, les principaux responsables des cassures double-brin sont les adduits interbrins, imposant une plus grande contrainte physique sur l'ADN. Les cycles futiles de réparation par la voie MMR au cours desquels la machinerie peut se détacher en laissant une coupure sur le brin, sont également responsables de la formation de ces cassures.

Deux mécanismes sont impliqués dans leur réparation : la voie HR et la voie NHEJ. C'est le stade du cycle cellulaire qui dirige l'enclenchement de l'une ou l'autre de ces voies. En effet, la voie HR utilise des chromatides sœurs pour la réparation. Celles-ci ne sont présentes qu'en phase S tardive/G_2. La voie NHEJ prédomine dans les autres phases. Du fait de l'utilisation d'une séquence homologue, la voie HR est moins susceptible de commettre des erreurs que la NHEJ, qui se contente d'une suture des extrémités (Shrivastav *et al.*, 2008).

Le complexe *DNA-dependant protein kinase* (DNA-PK) est un acteur crucial de la NHEJ. Ses sous-unités Ku70 et Ku80 ont une affinité naturelle pour les cassures de l'ADN, et notamment les extrémités double-brin de l'ADN. Elles se fixent rapidement sur le site de cassure, servant à protéger les extrémités de la dégradation nucléasique, ainsi qu'à recruter les facteurs qui effectuent la ligation (complexe ADN ligase IV/XRCC4). Les adduits du platine sont également reconnus par les protéines Ku, pour lesquels elles possèdent une affinité (K_d = 0,11nM pour la lésion 1,2-d(GpG)) très proche de celle observée pour les extrémités de l'ADN (Turchi *et al.*, 1997). Cette fixation entraîne le recrutement de la sous-unité catalytique

DNA-PK_{cs} mais pas son activation, à l'inverse de la plupart des substrats ADN de DNA-PK (Turchi & Henkels, 1996). Cette inhibition pourrait résulter en un défaut du mécanisme de réparation des cassures double-brin induit par la présence des adduits du platine, sensibilisant ainsi les cellules tumorales à un tel traitement. L'absence de Ku70 ne paraît pas avoir d'effet sur cette sensibilité. Par contre, l'absence d'expression de Ku80 et DNA-PK_{cs} paraît plus critique, augmentant les capacités de résistance de cellules au cisplatine lorsque celles-ci sont très confluentes, peut-être par un mécanisme de signalisation inter-cellulaire *via* les jonctions communicantes (Jung & Lippard, 2007). Cependant, les conséquences biologiques exactes de l'interaction entre ce complexe et les lésions platinées restent encore à établir (Guggenheim *et al.*, 2008).

B) Autres acteurs de la reconnaissance des lésions platinées

Au-delà des systèmes de réparation de l'ADN, il existe de nombreuses protéines aux fonctions variées mais réunies par une capacité variable à interagir avec les adduits du platine. Cependant, même si elles se trouvent indépendantes des voies de réparation, elles peuvent avoir des conséquences positives ou négatives sur celle-ci, ainsi que sur l'induction de l'apoptose et la cancérogénèse. De ce fait, il est très important d'avoir une connaissance précise de leurs fonctions principales et annexes car cela peut améliorer la compréhension de la variabilité des réponses aux traitements anticancéreux à base de platine, en fonction des tissus et des patients. Nous allons donc maintenant dresser un catalogue de ces facteurs en décrivant les plus significatifs, leur rôle naturel, et la conséquence de leur interaction avec les adduits platinés.

1. Le facteur de transcription p53

Le rôle de p53 dans l'induction de l'apoptose suite à une exposition aux dérivés du platine a été abordé dans la première partie de notre analyse bibliographique. Nous pouvons ajouter ici que p53 possède une affinité pour les adduits majoritaires (mais pas pour les autres types) du cisplatine sans spécificité de séquence ($K_d \approx 150nM$), affinité qui est cependant inférieure à celle observée pour ses séquences de liaison avec l'ADN. De plus, la présence d'adduits au sein de ces séquences diminue son affinité pour ces motifs particuliers (Wetzel & Berberich, 1998; Kasparkova *et al.*, 2001). Parmi les deux domaines de fixation à l'ADN de cette protéine, c'est sa partie C-terminale qui semble être responsable de l'interaction avec les adduits platinés. La forme latente de p53 (non activée par une phosphorylation de sa partie C-terminale) démontre d'ailleurs une meilleure affinité pour les adduits du cisplatine (Pivonkova *et al.*, 2006).

2. Protéines à boîtes HMG

La superfamille des protéines à boîte HMG regroupe des protéines chromatiniennes différentes des histones. Elle comprend trois classes principales (O'Flaherty & Kaye, 2003) : HMGN (*HMG-nucleosomal binding*), HMGA (*HMG-AT-hook*), et HMGB (*HMG-box*). Cette superfamille contient les protéines extérieures à la réparation possédant la meilleure affinité pour les lésions platinées. Il est possible d'en dégager deux catégories, selon que ces protéines sont pourvues d'un (capacité de liaison séquence-spécifique) ou de plusieurs (capacité de liaison structure-spécifique) domaines HMG conservés d'environ 80 acides aminés (Lilley, 1996) contenant trois hélices α prenant une forme caractéristique en L. Chez les eucaryotes, ce type de domaine se retrouve dans différentes classes de protéines capables de se lier à l'ADN, notamment certains facteurs de transcription.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord nous intéresser à deux protéines respectivement incluses dans chacune de ces deux catégories, HMGB1 et hUBF, dont le rôle dans la médiation de la toxicité des dérivés du platine a déjà été cité. Nous citerons ensuite, et plus brièvement, d'autres protéines de cette superfamille dont les capacités d'interaction avec les adduits du platine ont été étudiées.

- HMGB1

Anciennement nommée amphotérine puis HMG1, HMGB1 est l'une des protéines dont la relation avec les adduits platinés a été la plus étudiée. Comptant parmi les protéines les plus abondantes au sein du noyau (10^6 copies par cellule), il s'agit d'une protéine ubiquitaire de 215 acides aminés (25kDa), comprenant deux motifs HMG A et B. Son rôle principal est de participer à l'organisation et au remodelage de la chromatine, notamment en facilitant le glissement des nucléosomes afin de rendre l'ADN accessible (Lange *et al.*, 2008).

Son importante mobilité à l'intérieur du noyau a été observée, et ses interactions avec la chromatine sont très brèves (Maréchal, 2003). Multifonctionnelle, elle est aussi importante pour d'autres mécanismes cellulaires (Maréchal, 2003). Ainsi, elle participe à la régulation transcriptionnelle en formant un complexe HMGB1/*TATA binding protein* (TBP), augmentant l'affinité de ce facteur de transcription pour sa séquence cible d'un facteur 20. La séquence de formation reste à élucider, puisque HMGB1 est capable de se lier à TBP indépendamment du fait que cette dernière soit libre ou déjà fixée à l'ADN.

HMGB1 se trouve également au cœur de la réponse inflammatoire en servant de médiateur (cytokine) capable d'agir au-delà de la barrière endothéliale. En effet, les cellules nécrotiques relarguent leurs protéines, et donc HMGB1, lorsqu'elles perdent leur intégrité. Sa présence dans le milieu extracellulaire a pour effet d'attirer les acteurs de l'inflammation et de la réparation des tissus, et de stimuler leur prolifération. De même, cette protéine provoque la maturation de certaines cellules dendritiques qui, avec les macrophages activés et les lymphocytes NK (*Naturel Killer*) vont cette fois secréter abondamment HMGB1 afin

d'amplifier la réponse inflammatoire. Enfin, HMGB1 stimule chez les macrophages la production de cytokines telles que les facteurs de nécrose tumorale, mais aussi des interleukines et l'interféron-γ (Maréchal, 2003; Bianchi & Manfredi, 2007).

HMGB1 aurait également un rôle dans l'induction de la croissance tumorale et l'apparition de métastases. L'un de ses récepteurs membranaires caractérisés est le *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE). L'influence négative d'HMGB1, favorisant le développement de certains cancers, passerait par son interaction avec RAGE qui est absent de tumeurs testiculaires évaluées mais fortement exprimé dans des tumeurs pancréatiques à forte capacité métastatique. La co-expression d'HMGB1 et de RAGE a aussi été associée à d'autres types de cancers en métastase (notamment cancer colorectal), alors que le blocage de l'interaction entre ces deux protéines diminue effectivement les capacités invasives de cellules de gliome de rat (Taguchi *et al.*, 2000; Kostova *et al.*, 2010).

La caractéristique principale d'HMGB1 est son affinité pour les structures tridimensionnelles altérées de l'ADN telles que l'ADN cruciforme (jonctions de Holliday durant les mécanismes de la voie HR : K_d = 1nM d'après Bianchi *et al.*, 1989) ou résultant de la présence d'une lésion. Dans ce second cas, il peut s'agir de dommages générés par certains mutagènes (acétylaminefluorène ; B[a]P-diol-époxyde ; UVC : K_d = 1-4µM selon la lésion, d'après Pasheva *et al.*, 1998) ou par des agents chimiothérapeutiques (molécules platinées). Ainsi, pour le cisplatine, HMGB1 reconnait spécifiquement la déformation induite par les pontages 1,2-intrabrin (affinité pour l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine : K_d = 370nM) mais pas celle causée par les adduits 1,3-intrabrins (Pil & Lippard, 1992). Elle est aussi capable de reconnaître les adduits interbrins du cisplatine avec une affinité équivalente que pour les adduits intrabrins (Kasparkova & Brabec, 1995). Les deux domaines HMG de la protéine sont capables de lier l'adduit 1,2-intrabrin d(GpG), mais cette fixation se fait différemment (Figure 19) : le domaine A se lie de façon asymétrique (en 3' de la lésion) sur 5-6 bases, alors que le domaine B se lie de façon symétrique autour de la lésion sur 7-8 bases. Le domaine A paraît avoir une plus forte affinité que le domaine B pour ce type de lésion (He *et al.*, 2000b).

Après avoir reconnu une structure particulière de l'ADN, HMGB1 est capable d'induire, seule ou en complexe, une déformation locale encore plus accentuée : en s'insérant dans le petit sillon, elle provoque une courbure dont l'angle est d'environ 77° (McCauley *et al.*, 2007). Elle ne possède pas de spécificité de séquence. Sa fixation au niveau de l'ADN de liaison du nucléosome déstabilise cette structure, augmentant la mobilité de la chromatine. Sa fixation sur un promoteur pourrait contribuer au rapprochement physique de facteurs de transcription, déclenchant leur interaction (Lange & Vasquez, 2009).

Son influence sur les mécanismes de réparation de l'ADN est controversée et reste encore à préciser. En effet, les protéines à boîte HMG, on l'a vu, paraissent jouer un rôle de protection des adduits contre le mécanisme NER, renforçant par là les effets cytotoxiques de ces lésions. De plus, la surexpression d'HMGB1 induite par des stéroïdes sensibilise des cellules d'adénocarcinome mammaire au cisplatine et au carboplatine (He *et al.*, 2000a), alors que son immunodéplétion restaure les activités de réparation des lésions du cisplatine (Li *et*

al., 1997). Cependant, il a également été démontré que l'absence d'HMGB1 cause une diminution de la réparation des lésions UV-induites (Lange *et al.*, 2008) et qu'une version tronquée de ce facteur (sans son extrémité C-terminale acide) possède une meilleure capacité de liaison aux adduits tout en ne protégeant pas ces derniers de la réparation (Mitkova *et al.*, 2005). Des recherches récentes (Ugrinova *et al.*, 2009) ont montré la capacité d'HMGB1 à se lier à l'ADN lésé en contexte chromatinien, grâce à l'utilisation de nucléosomes reconstitués. La protéine paraît donc capable de se lier à l'ADN endommagé, qu'il soit ADN de liaison ou ADN enroulé autour d'histones.

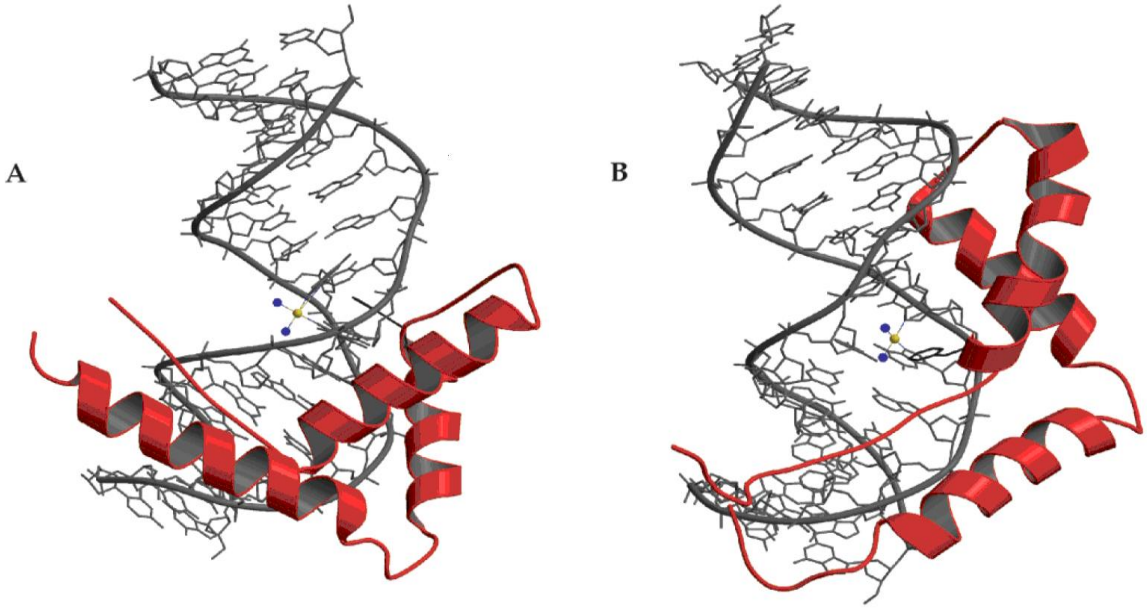


Figure 19 : Modes de liaison des domaines HMG A et B de la protéine HMGB1 sur l'ADN déformé par un adduit 1,2-intrabrin GpG du cisplatine (He *et al.*, 2000b).

Ajoutons que HMGB1 (il en est de même pour la protéine voisine HMGB2) facilite la fixation de p53 sur l'ADN et stimule donc ses capacités de transactivation (Jayaraman *et al.*, 1998). En retour, p53 est capable d'augmenter l'affinité d'HMGB1 pour l'ADN modifié par le platine par une interaction directe de son extrémité C-terminale avec la boîte HMG A (Imamura *et al.*, 2001).

Les rôles multiples joués par HMGB1 sont résumés sur la Figure 20, qui montre que la protéine se trouve au centre d'un grand nombre de processus biologiques *via* plusieurs voies de signalisation. Nous constaterons dans le prochain chapitre de cette analyse que HMGB1 est très souvent utilisée pour les étapes de validation ou de contrôle des méthodes destinées à étudier les interactions entre protéines et ADN platiné.

HMGB2 et HMGB3 ont également été caractérisées comme interagissant avec l'ADN platiné (affinité de HMGB2 pour l'ADN lésé par le cisplatine : $K_d \approx 0{,}2$nM) (Billings *et al.*, 1992). Les fonctions biologiques de ces deux protéines sont moins connues que celles de HMGB1. Elles semblent toutefois également intervenir dans l'accessibilité des gènes à travers

la régulation de la structure chromatinienne et la facilitation des assemblages nucléoprotéiques (Thomas & Travers, 2001).

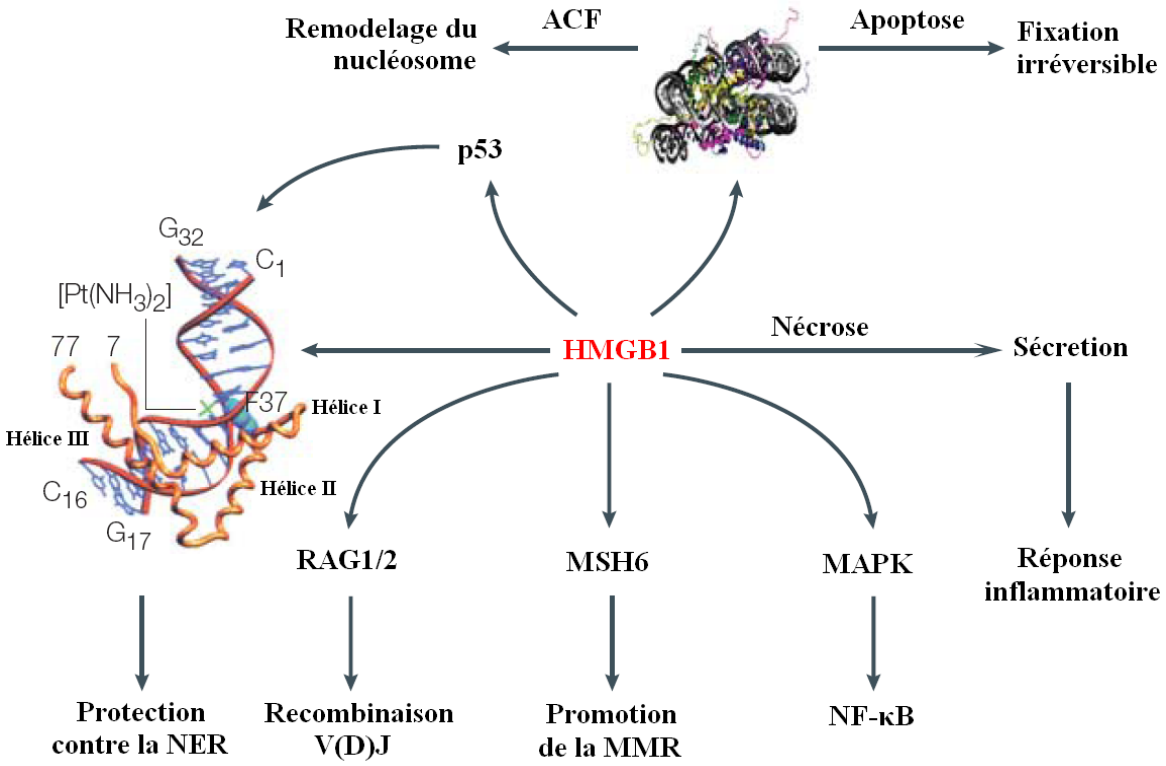


Figure 20 : HMGB1, une protéine « à tout faire ». Elle est directement ou indirectement impliquée dans un grand nombre de voies, dont celles de réponse à la présence de dommages de l'ADN (adapté de Wang & Lippard, 2005).

- hUBF

hUBF (*human Upstream Binding Factor*) est un facteur de transcription qui représente la catégorie de protéines à boîte HMG séquence-dépendantes. Les gènes encodant les ARN ribosomaux (rRNA) sont organisés en répétitions tandem et sont transcrits par l'ARN polymérase I. Chez l'homme, ce mécanisme nécessite l'intervention de deux facteurs de transcription : hSL1 et hUBF. Ce dernier existe sous deux formes, nommées hUBF1 (97kDa) et hUBF2 (94kDa), générées par épissage alternatif. hUBF1 contient six domaines HMG, alors que hUBF2 présente une délétion de 37 acides aminés dans la deuxième de ces boîtes. Le premier domaine HMG est celui qui participe à la fixation spécifique sur l'ADN, alors que les suivants sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle de cette protéine (Yang *et al.*, 2002).

hUBF est, parmi les protéines connues, celle qui possède la meilleure affinité pour l'adduit majoritaire du cisplatine, avec un K_d = 60pM, proche de l'affinité pour sa séquence régulatrice (K_d = 18pM) (Treiber *et al.*, 1994). C'est cette particularité qui lui permet de faire l'objet d'un détournement de sa fonction initiale par les adduits platinés (cisplatine et

oxaliplatine, à tout le moins) dont le nombre au sein d'une cellule traitée serait proche du nombre total de copie d'hUBF dans cette même cellule, avec pour conséquence une diminution de la synthèse d'ARN ribosomal et un impact potentiel sur les capacités de prolifération des tumeurs (Zhai *et al.*, 1998).

D'autres protéines à boîtes HMG, sont capables de se lier aux adduits du platine, y compris des protéines non humaines qui n'ont pas leur place ici (Jung & Lippard, 2007). Les facteurs qui suivent complètent la liste des protéines à boîte HMG les plus significatives.

- SSRP1

SSRP1 (*Structure Specific Recognition Protein 1*) forme avec Spt16 le complexe FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*). Là encore, il s'agit de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, facilitant son accessibilité aux facteurs de transcription, réplication et réparation. SSRP1 contient une boîte HMG. Sans Spt16, elle ne semble pas capable de se lier aux adduits du platine même si son domaine HMG isolé possède cette propriété. Spt16, quant à elle, ne possède aucune capacité de liaison aux dommages (Yarnell *et al.*, 2001). L'absence de SSRP1 et la présence de Spt16 lors d'une expérience de photopontage de protéines sur un adduit modifié du cisplatine suggère cependant que Spt16 se trouve physiquement plus proche de l'adduit que SSRP1. En effet, celui-ci serait en contact direct avec l'ADN mais pas avec la lésion proprement dite (Guggenheim *et al.*, 2009).

- LEF-1

LEF-1 (*Lymphoid Enhancing Factor 1*) appartient, comme hUBF, à la famille des protéines à boîte HMG séquence-spécifiques. La liaion de la protéine à sa séquence de reconnaissance cause une déformation de l'ADN dont la structure se rapproche de celle induite par l'adduit 1,2-(GpG)-cisplatine. L'affinité du domaine HMG isolé de LEF-1 pour l'adduit majoritaire du cisplatine, mesurée sur des oligonucléotides longs (92-100 paires de base) est équivalente à celle observée dans les mêmes conditions pour sa séquence naturelle (Chow *et al.*, 1994). Cette protéine a fait l'objet d'une étude visant à déterminer l'influence de la présence d'adduits du platine sur la séquence d'ADN reconnue. Il a été observé que la présence d'un adduit 1,2-d(GpG) sur des oligonucléotides plus courts (25 paires de base) augmente l'affinité du domaine HMG de LEF-1 d'un facteur 3-6 selon la séquence flanquante (celle-ci influencerait la liaison grâce à la formation de liaisons hydrogène entre des acides aminés du site de reconnaissance de la protéine et les bases entourant l'adduit), mais que ces affinités sont bien plus faibles que celle observée pour la séquence naturelle. Ainsi, le cisplatine ne serait dans ce cas précis pas un bon compétiteur pour détourner le facteur de transcription de sa cible habituelle. De plus, les mêmes travaux ont montré que LEF-1 ne paraît pas se lier au même type d'adduit généré par l'oxaliplatine (Chvalova *et al.*, 2008).

- SRY

SRY (*Sex-determining Region of Y chromosome*) est une protéine qui joue un rôle dans la formation des testicules lors de l'embryogénèse. Comme pour les autres protéines à boîte HMG, sa liaison à l'ADN induit une déformation locale de celui-ci (70-80°) (Werner *et al.*, 1995). L'affinité de son domaine HMG pour un oligonucléotide court portant l'adduit majoritaire du cisplatine est de l'ordre de K_d = 120nM, valeur 20 fois supérieure à celle de la même séquence sans lésion. SRY est elle aussi capable d'inhiber la réparation des deux adduits intrabrins majoritaires du cisplatine par la NER, de façon plus efficace que HMGB1 (Trimmer *et al.*, 1998).

3. Histone H1

Les histones de liaison sont des protéines que l'on trouve principalement fixées sur les régions d'ADN présentes entre chaque unité de nucléosome. Leur activité recoupe en partie celle des protéines à boîtes HMG, notamment par leur capacité à dérouler l'ADN et à se fixer sur l'ADN cruciforme. Cette observation a mené une équipe à tester la capacité d'H1 à lier les adduits du cisplatine. Leurs résultats montrent que cette protéine est en effet capable de se lier à ces lésions (mais pas à celles générées par le transplatine) et que, dans leurs conditions, H1 entre efficacement en compétition avec HMGB1 pour la formation d'un complexe ADN/protéine (Yaneva *et al.*, 1997), suggérant une influence de cette protéine importante dans la protection des lésions (rôle similaire à celui d'HMGB1) du fait de l'abondance d'H1.

4. TBP

Le facteur de transcription TBP, essentiel pour les trois ARN-polymérases eucaryotes, se lie à l'ADN au niveau de la boîte TATA (TATAAA ou des variantes contenant plus d'adénines), séquence présente au sein du promoteur d'un grand nombre de gènes et qui permet d'en initier la transcription. Cette liaison induit localement une courbure très proche de celle causée par l'adduit intrabrin majoritaire du cisplatine. L'affinité de TBP pour sa séquence consensus s'est avérée similaire à celle observée pour le dommage 1,2-d(GpG)-cisplatine (K_d = 0,3nM), alors que la protéine ne possède pas d'affinité particulière pour l'adduit 1,3-d(GpNpG)-cisplatine. Remarquons que TBP possède aussi une affinité pour les lésions UV-induites (Vichi *et al.*, 1997; Coin *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2001). L'une des conséquences biologiques principales, là encore, est due au fait que le facteur de transcription sera susceptible de se trouver séquestré par les adduits, ce qui l'éloigne de sa séquence cible et empêche l'initiation de la transcription. En accord avec ceci, la microinjection de TBP dans des cellules ayant subi une irradiation UV restaure leur capacité de transcription (Vichi *et al.*, 1997).

Des observations ont aussi montré que la liaison d'une TBP de levure à la boîte TATA peut être largement augmentée (affinité 175 fois supérieure) par la présence d'un ou deux adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine flanquant cette séquence (Cohen *et al.*, 2000) : plus l'adduit est proche de la boîte TATA, plus le complexe TBP/ADN est stable. Mécanistiquement parlant, il est probable que la lésion facilite l'insertion des résidus phénylalanine au sein de la séquence grâce à l'ouverture de la double hélice générée par l'adduit. Ceci a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse pertinente que la présence d'adduits au sein du promoteur d'un gène peut influer sur le niveau de transcription de celui-ci, par exemple en l'augmentant (faute de pouvoir dissocier TBP) ou en le diminuant (si l'interaction avec l'adduit gène les interactions subséquentes avec les facteurs de la machinerie de transcription). Dans tous les cas cette influence pourrait ne pas être négligeable puisqu'il paraît raisonnable d'estimer la présence d'adduit de 0,1 à 1 par boîte TATA fonctionnelle (Coin *et al.*, 1998).

Ajoutons enfin que la capacité de fixation de TBP sur la boîte TATA est augmentée par l'interaction de son extrémité N-terminale avec l'extrémité C-terminale fortement acide d'HMGB1, ce qui pourrait permettre de renforcer encore plus la formation d'un complexe boîte TATA lésée/TBP/HMGB1 (Das & Scovell, 2001).

5. YB-1

YB-1 (*Y-box Binding protein 1*) est un un facteur de transcription reconnaissant la boîte Y (dont la séquence est CCAAT). Il est utile de préciser que cette séquence est localisée au sein de promoteurs de gènes codant pour des protéines que nous avons déjà citées, impliquées dans les processus de réparation (PCNA) ou de résistance aux agents génotoxiques (*multidrug resistance proteins*). Protéine cytoplasmique, elle est déplacée dans le noyau après exposition au cisplatine (Uramoto *et al.*, 2002), où elle s'avère capable de se lier aux trois adduits majoritaires du cisplatine (Ise *et al.*, 1999). Un lien a été fait entre la surexpression d'YB-1 et la capacité de résistance au cisplatine de lignées et cultures primaires issues de cancers ovarien (Yahata *et al.*, 2002). Le traitement d'une lignée cellulaire issue de carcinome spinocellulaire avec le cisplatine induit une surexpression d'YB-1 par un mécanisme de transactivation initiée par p73 conduite par c-Myc (Uramoto *et al.*, 2002). YB-1 participerait au mécanisme de résistance au cisplatine en améliorant les capacités de réparation de la cellule, notamment par une interaction directe avec PCNA (Ise *et al.*, 1999; Yahata *et al.*, 2002).

Nous venons de voir, par la description des interactions « adduits du platine / protéines » et de leurs conséquences biologiques, l'importance qu'il y a à élucider en détails les mécanismes cellulaires mis en œuvre lors de la détection, de la réparation et/ou du contournement de ces lésions. Le Tableau 3 récapitule l'état actuel de l'interactome (44 protéines humaines) des dérivés du platine. Il reprend des protéines déjà citées plus haut ainsi que d'autres, identifiées dans la littérature mais sur lesquelles nous ne nous attarderons pas

dans le cadre de ce travail. Il s'agit des protéines piégées sur les adduits du platine, ce qui n'implique pas systématiquement l'existence d'une interaction directe. En effet, certaines de ces protéines ont pu être piégées avec les autres membres d'un complexe. Cela est notamment vrai pour les références les plus récentes, où seules certaines des protéines découvertes ont fait l'objet d'expériences complémentaires destinées à vérifier les capacités individuelles d'interaction. Ces références illustrent d'ailleurs que cet interactome est encore en constante évolution. Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts de découvertes de nouveaux facteurs, notamment par l'utilisation de méthodes fines autorisant cette identification.

C'est dans cette optique que se situe le travail de thèse présenté ici, qui s'appuie particulièrement sur des techniques originales que nous allons aborder dans la troisième et dernière partie de notre analyse bibliographique.

PROTÉINE	DÉRIVÉ(S) DU PLATINE AVEC LE(S)QUEL(S) UNE INTERACTION A ÉTÉ MONTRÉE	FONCTION BIOLOGIQUE	RÉFÉRENCE
HMGB1	Cisplatine, carboplatine, oxaliplatine, satraplatine	Remodelage de la chromatine	(Hughes *et al.*, 1992)
HMGB2	Cisplatine, carboplatine, oxaliplatine, satraplatine	Remodelage de la chromatine	
hUBF	Cisplatine, carboplatine, oxaliplatine, satraplatine	Facteur de transcription des ARN ribosomaux	(Treiber *et al.*, 1994)
LEF-1	Cisplatine	Facteur de transcription	(Chow *et al.*, 1994)
mTFA	Cisplatine	Facteur de transcription des ARN mitochondriaux	
SRY	Cisplatine	Régulateur de la transcription initiant le développement mâle	
SSRP1	Cisplatine	Remodelage de la chromatine	(Bruhn *et al.*, 1992)
TBP	Cisplatine, oxaliplatine	Facteur de transcription reconnaissant la boîte TATA	(Vichi *et al.*, 1997)
p53	Cisplatine	Facteur de transcription impliqué dans divers processsus du cycle cellulaire et de l'apoptose	(Wetzel & Berberich, 1998)
XPC-HR23B	Cisplatine, carboplatine, oxaliplatine, satraplatine	Reconnaissance des lésions déformantes de l'ADN	(Sugasawa *et al.*, 1998)
DDB2	Cisplatine	Reconnaissance des lésions déformantes de l'ADN (complexe UV-DDB)	(Payne & Chu, 1994)
ADN topoisomérase I	Cisplatine	Relaxation des structures superenroulées de l'ADN	(Kobayashi *et al.*, 1999)
DDB2	Cisplatine	Reconnaissance des lésions déformantes de l'ADN	(Payne & Chu, 1994)
XPA	Cisplatine	Stabilisation de la « bulle » de réparation lors de la NER	(Jones & Wood, 1993)
RPA	Cisplatine	Protection de la partie simple-brin lors de la NER	(Clugston *et al.*, 1992)
YB-1	Cisplatine	Facteur de transcription reconnaissant la boîte Y	(Ise *et al.*, 1999)
PARP-1	Cisplatine, oxaliplatine	Senseur des cassures simple-brin ; recrute certains facteurs de la réparation	(Zhang *et al.*, 2004)
MSH2	Cisplatine	Reconnaissance des mésappariements de base lors de la MMR	(Mello *et al.*, 1996)
AAG	Cisplatine	ADN glycosylase (BER)	(Kartalou *et al.*, 2000)
Histone H1	Cisplatine	Histone de liaison	(Yaneva *et al.*, 1997)
Aurora kinase A	Cisplatine	Régulation du cycle cellulaire par phosphorylation de certains facteurs impliqués	(Stansfield *et al.*, 2009)
Aurora kinase B	Cisplatine	Régulation du cycle cellulaire par phosphorylation de certains facteurs impliqués	
Proprionyl coenzyme A carboxylase	Cisplatine	Métabolisme (catalyse la synthèse de (S)- méthylmalonyl-CoA)	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	Cisplatine	Epissage alternatif	
Zinc finger protein 684	Cisplatine	Régulation de la transcription	
Ankyrin repeat & zinc finger domain containing 1	Cisplatine	-	
Apolipoprotein B messenger RNA editing enzyme	Cisplatine	Edition de l'ARN (introduction de codons stop)	
LIM domain kinase 2	Cisplatine	Phosphorylation des histones	
Melanoma antigen family B, 4	Cisplatine	-	
Ku70/Ku80	Cisplatine	Reconnaissance des extrémités et cassures de l'ADN	(Turchi & Henkels, 1996)
RFC1	Cisplatine-benzophénone	Interaction avec PCNA lors de l'initiation de la transcription, réparation de l'ADN	(Guggenheim *et al.*, 2009)
RFC2	Cisplatine-benzophénone	Réparation de l'ADN (NER)	
ADN ligase III	Cisplatine-benzophénone	Ligation des cassures de l'ADN	
PB-1	Cisplatine-benzophénone	Remodelage de la chromatine (possède une boîte HMG)	
SMARCA3	Cisplatine-benzophénone	Remodelage de la chromatine	
SMARCA4	Cisplatine-benzophénone	Remodelage de la chromatine	
SMARCC2	Cisplatine-benzophénone	Remodelage de la chromatine	
HMGB3	Cisplatine-benzophénone	Remodelage de la chromatine	
DDB1	Cisplatine-benzophénone	Reconnaissance des lésions déformantes de l'ADN (complexe UV-DDB)	
NUMA1	Cisplatine-benzophénone	Rôle structural durant la mitose	(Zhu & Lippard, 2009)
PNK	Cisplatine-benzophénone	Réparation des cassures simple-brin	
MutSβ	Cisplatine-benzophénone	Reconnaissance des mésappariements de base lors de la MMR	
XRCC1	Cisplatine-benzophénone	Coordonateur des voies de réparation BER et des SSB, ligation de l'ADN (NER)	
ZNF143	Cisplatine	Facteur de transcription	(Ishiguchi *et al.*, 2004)

Tableau 3 : État présent de l'interactome (protéines humaines piégées par diverses méthodes) des lésions du platine.

III. Méthodes d'étude des interactions entre ADN lésé et protéines

Au cours des paragraphes qui suivent, nous décrirons en premier lieu des méthodes visant à étudier l'association d'une protéine avec un type de lésion particulier, puis dans un second temps des méthodes « globales », ayant pour objectif la caractérisation de plusieurs interactions de façon simultanée (établissement de l'interactome). Nous présenterons quelques-uns des outils parmi les plus significatifs déjà mis au point pour étudier de telles interactions, majoritairement en lien avec les adduits du platine mais aussi avec d'autres types de dommages de l'ADN.

A) Caractérisation d'une interaction simple : une protéine/une lésion

Afin de caractériser une interaction spécifique entre une protéine et un motif particulier d'ADN, il existe différentes techniques qui peuvent d'une part permettre d'obtenir une simple confirmation de la faisabilité de l'interaction (réponse « oui/non »). D'autres permettent de déterminer certains paramètres de cette interaction, tels que la spécificité, les paramètres cinétiques et l'affinité.

Dans cette partie nous présenterons des méthodes éprouvées telles que le retard sur gel (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) mais aussi des méthodes plus originales développées pour l'étude des interactions se produisant entre protéines et ADN lésé.

1. Retard sur gel (EMSA)

La méthode classique pour la caractérisation d'une interaction ne mettant en jeu que deux partenaires (ADN ou ARN et protéine) est l'EMSA, décrite dès 1981 (Fried & Crothers, 1981). Les exemples la mettant en œuvre pour établir ou confirmer l'interaction de protéines avec les adduits du platine sont nombreux, et nous avons d'ailleurs évoqué certains d'entre eux au cours de la présentation des protéines déjà connues pour interagir avec ces lésions. Le principe de cette technique est fort simple, puisqu'il s'agit de mettre en contact une sonde oligonucléotidique marquée (généralement à l'aide d'un nucléotide radioactif contenant du ^{32}P) et une protéine (ou un extrait cellulaire) dans un milieu dont les propriétés physico-chimiques permettent une éventuelle interaction. La présence d'un compétiteur tel que de l'ADN non lésé permet d'éliminer les interactions non spécifiques. Ensuite, l'échantillon est résolu sur gel natif : après révélation, un retard (*i.e.* une distance de migration moins longue à partir du puits de dépôt) montre une interaction spécifique de la sonde avec la cible protéique. Grâce à cette technique, un ou plusieurs partenaires d'interaction peuvent être révélés à l'aide d'une même sonde, en fonction de la distance de migration qui dépend de la taille de ce ou ces partenaires (cas du super-retard sur gel, *supershift*). L'utilisation d'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt permet de confirmer son identité (cette variante prend également le nom de *supershift*) ou de localiser le site d'interaction si l'anticorps est capable de bloquer celui-ci (le site est alors

physiquement proche de l'épitope). La confirmation de l'interaction peut être réalisée, en ajoutant par exemple un compétiteur spécifique qui abolira l'interaction. De plus, des expériences réalisées avec des concentrations croissantes de protéines et/ou d'oligonucléotide marqué permettent de déterminer les constantes cinétiques caractérisant l'interaction grâce à une quantification des fractions liées et non liées de la sonde. Le principe général de cette technique est schématisé par la Figure 21.

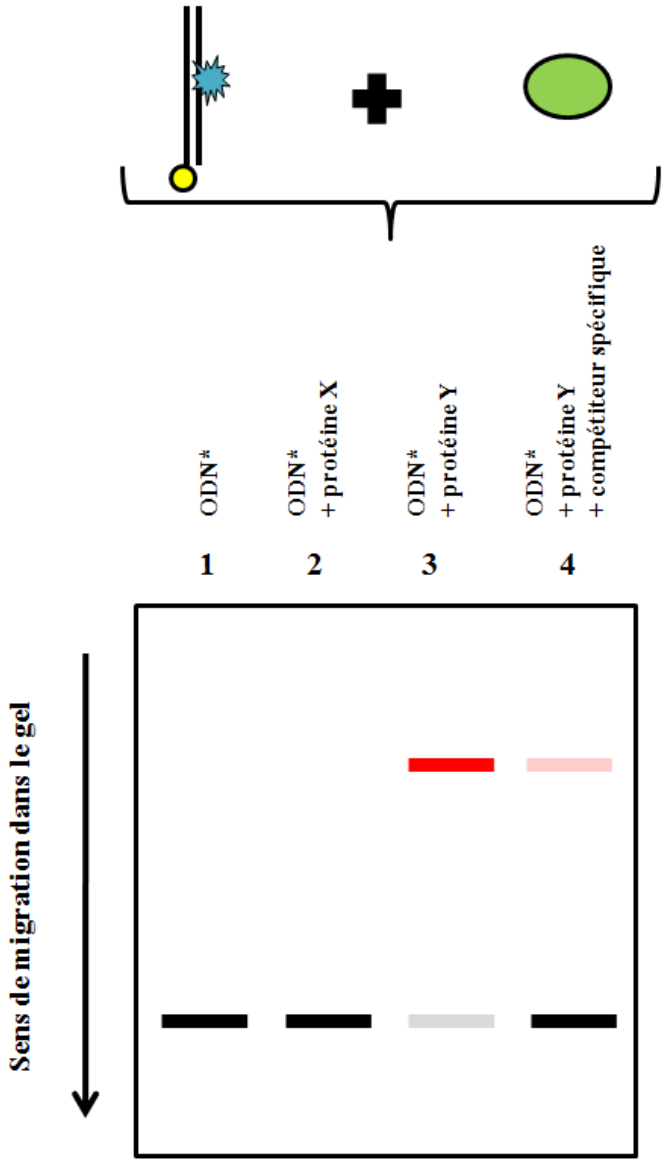


Figure 21 : Schématisation d'une expérience d'EMSA. L'oligonucléotide (ODN) radiomarqué portant la lésion (en bleu) est mis en contact avec une protéine (en vert). L'interaction est ensuite vérifiée par migration sur gel en conditions non dénaturantes. L'oligonucléotide radiomarqué (*) seul (piste 1) migre loin dans le gel. Il en est de même lorsqu'il est mis en présence d'une protéine X incapable d'interagir avec lui (piste 2). À l'inverse (piste 3), une protéine Y capable de reconnaître la lésion va former un complexe de plus haut poids moléculaire, qui migrera donc moins loin dans le gel (bande rouge) alors que l'intensité de la bande représentant l'oligonucléotide lésé radiomarqué seul va diminuer (bande grise). Enfin, l'introduction d'un compétiteur spécifique non radiomarqué (piste 4) permet d'abolir en partie l'interaction (bande rouge clair).

Les exemples d'utilisation de l'EMSA pour l'étude des lésions du platine sont légions. Nous l'avons vu employée, par exemple, lors de l'identification de la fixation de DDB2 sur les adduits intrabrins du cisplatine (Chu & Chang, 1988; Payne & Chu, 1994) ou bien celle de XPA et RPA (Clugston *et al.*, 1992; Schweizer *et al.*, 1999) sur le même type de substrat. Sans entrer dans un inventaire de tous les travaux sur les dérivés du platine faisant appel à cette méthode, illustrons-la simplement par une série d'expériences menées sur la 3-méthyladénine glycosylase (AAG), enzyme initiallement connue pour la réparation des bases alkylées ou oxydées (Kartalou *et al.*, 2000). Cette protéine reconnaît les trois principaux adduits intrabrins du cisplatine, causant un retard de la bande correspondant au complexe ainsi formé (Figure 22). Au cours de ces investigations la liaison d'AAG à la 1,N^6-éthénoadénine (εA) a aussi été démontrée, et des séries de compétition entre les différentes lésions ont permis de déterminer les constantes de dissociation suivantes : $K_{d(app)}$ (1,2-d(GpG)) = 115nM ; $K_{d(app)}$ (1,3-d(GpG)) = 144nM ; $K_{d(app)}$ (1,2-d(ApG)) = 71nM ; $K_{d(app)}$ (εA) = 26nM.

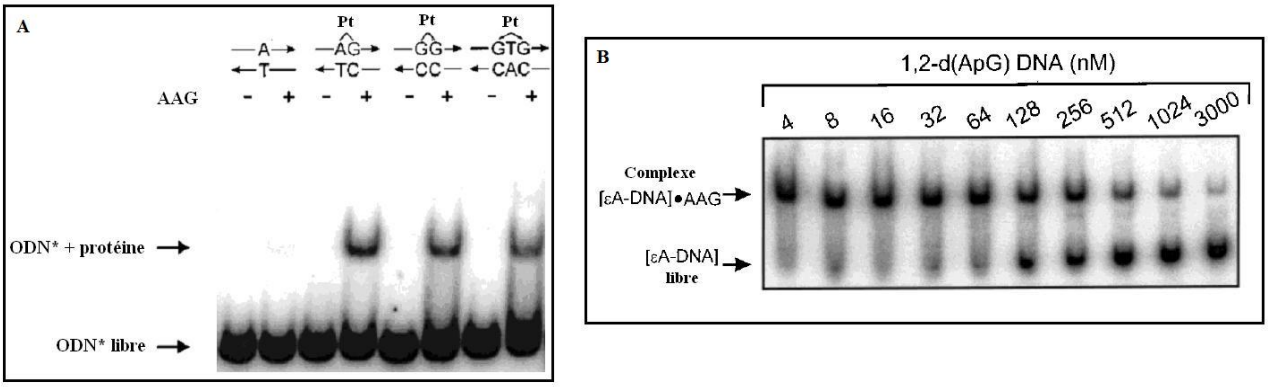


Figure 22 : (A) La protéine AAG se lie spécifiquement aux trois adduits intrabrins du cisplatine et cause un retard de la bande observable. (B) L'introduction d'un compétiteur spécifique tel qu'un oligonucléotide non marqué portant un adduit 1,2-d(ApG) du cisplatine à des concentrations croissantes permet d'abolir progressivement l'interaction d'AAG avec εA (adapté de Kartalou *et al.*, 2000).

L'EMSA est encore aujourd'hui une méthode de référence pour étudier les interactions ADN/protéine. Elle est extrêmement sensible, puisque faisant couramment appel à la radioactivité, et nécessite de très faibles quantités de sondes et de protéines y compris lorsqu'il s'agit de déterminer efficacement les paramètres régissant l'interaction observée. L'un de ses inconvénients majeurs est que la stabilité du complexe sonde/cible peut être affectée par les conditions de migrations, susceptibles de le déstabiliser et donc de fausser certaines mesures.

2. Autres techniques faisant appel à de l'ADN en phase homogène

À l'instar de l'EMSA, qui utilise des sondes oligonucléotidiques non immobilisées sur support, d'autres techniques existent pour étudier les interactions ADN lésé/protéine. Ainsi, la technique de *DNA footprinting* est utilisée afin de localiser précisément la zone de l'oligonucléotide sonde qui a été reconnue par la protéine d'intérêt. Il s'agit là encore d'utiliser

une sonde oligonucléotidique marquée pour réaliser une interaction avec une protéine d'intérêt puis d'employer un agent capable de digérer l'ADN de façon aléatoire. Le temps d'incubation est adapté à la génération d'un faible nombre de coupures sur chaque sonde. Après résolution sur gel, on peut alors observer l'ensemble des fragments produits, dont la longueur s'échelonne d'une base à l'oligonucléotide complet. La zone « protégée » par la protéine n'aura pas fait l'objet d'une digestion, et les fragments qu'il aurait alors été possible d'obtenir ne sont pas observés. Cela permet de déterminer le site de liaison de la protéine, et de vérifier s'il correspond à une séquence particulière, ou à une lésion. Dans ce dernier cas, la technique a un intérêt réduit par rapport à l'EMSA, puisque les oligonucléotides utilisés portent couramment une lésion unique, mais cette approche a tout de même été employée en complément, dans le but de confirmer ou d'affiner certains résultats. Elle a par exemple permis de confirmer le mode de liaison du domaine HMG A de la protéine HMGB1 sur l'adduit majoritaire du cisplatine (Ohndorf *et al.*, 1999). Cette méthode a aussi permis d'étudier l'influence de la présence d'un adduit 1,3-d(GpNpG) du cisplatine sur le positionnement du nucléosome (Danford *et al.*, 2005). La méthode de *Southwestern blotting* peut également être employée afin d'identifier des interactions entre ADN et des structures particulières de l'ADN (par exemple des séquences triple-hélice) à partir d'extraits cellulaires (Guillonneau *et al.*, 2001).

Afin de s'affranchir de l'utilisation de la radioactivité, à la base de la majeure partie des expériences d'EMSA et souvent contraignante à mettre en œuvre (nécessité de personnel qualifié, installations adaptées et surveillance drastique), des systèmes ont été développés à partir d'autres principes. Les méthodes à base de fluorescence, par exemple, sont sans risque et relativement aisées à mettre en place (détection facile, faible consommation de réactifs). Elles offrent également l'avantage d'une grande sensibilité.

Le premier exemple que nous pouvons donner est une approche fondée sur l'anisotropie de fluorescence (autrement appelée polarisation de fluorescence). Elle a été employée avec succès afin d'étudier les capacités de liaison de protéines de réparation sur des sondes lésées (mesures qualitatives et quantitatives). La technique utilise une propriété de dépolarisation de la lumière émise par des fluorophores excités par de la lumière polarisée. Cette dépolarisation varie en fonction des propriétés physico-chimiques de la molécule et de son environnement. Par exemple, elle diminue avec la mobilité (rotation) du fluorophore. Dans le cas d'un fluorophore lié à une molécule d'ADN, une variation de la polarité de la fluorescence induite par la fixation d'une protéine sur la séquence oligonucléotidique (et donc une limitation de sa mobilité propre) est détectable et permet de définir l'affinité de la protéine pour le motif considéré. Ainsi, l'affinité de XPA et RPA, pour des séquences lésées incluant un pontage 1,3-intrabrin (entre deux guanines) du cisplatine, un mésappariement et une insertion de base, ainsi que pour des séquences simple-brin non lésées ont été mesurées (Hey *et al.*, 2001). Les valeurs obtenues, déjà citées lorsque nous avons évoqué les capacités de liaison de ces deux protéines de la NER aux adduits du platine, sont du même ordre de grandeur que celles déterminées par l'EMSA. L'une des limitations importantes de cette méthode tient au fait que les mesures dépendent fortement de la taille des partenaires impliqués.

Les phénomènes de transfert d'énergie sont aussi très utiles puisqu'ils permettent de déterminer le rapprochement de deux molécules par émission ou extinction de fluorescence. Pour illustration, la fixation de la protéine bactérienne MutS (analogue bactérien de hMutα) sur différents dommages de l'ADN a été étudiée à l'aide d'une technique de fluorescence induite par transfert d'énergie (Lopez-Crapez *et al.*, 2008). Le principe consiste à mettre en évidence une interaction par le rapprochement d'une molécule fluorescente donneuse (ici le tris-bipyridine cryptate d'europium, TBP(Eu^{3+})) et d'un marqueur fluorescent XL665 accepteur qui émet à la longueur d'onde de 665nm suite au transfert d'énergie. Des oligonucléotides marqués à la biotine/XL665 et contenant un site unique de mésappariement sont incubés avec une forme recombinante du MutS contenant un tag polyhistidine reconnu par un anticorps marqué avec le groupement donneur (Figure 23).

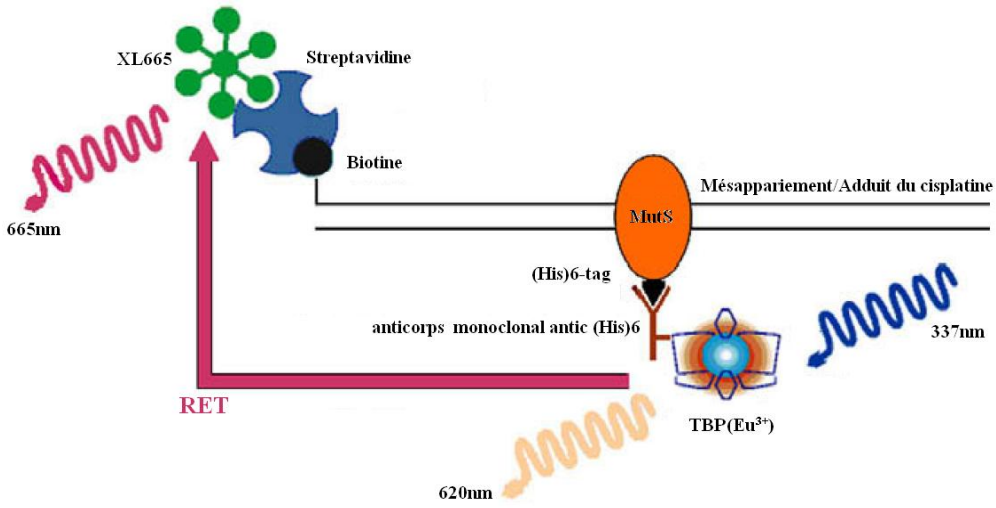


Figure 23 : Détection de la fixation de MutS sur une lésion par émission de fluorescence grâce au transfert d'énergie par résonance (RET ; adapté de Lopez-Crapez *et al.*, 2008).

Ce dispositif permet d'obtenir un signal spécifique 17 à 40 fois supérieur (selon la longueur de l'oligonucléotide considéré) à la fluorescence résiduelle du contrôle sans lésion. L'application de ce système à l'étude de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine et de la lésion complexe adduit-mésappariement a confirmé que MutS lie fortement l'adduit (signal 48 fois supérieur au contrôle) et possède une affinité encore quatre fois supérieure pour la lésion composée par rapport au simple adduit. Cette méthode offre l'avantage d'une détection par fluorescence, très sensible, en évitant l'utilisation d'une protéine de fusion MutS-*green fluorescent protein* (GFP), de moindre affinité pour les lésions. La détection semi-directe, en couplant directement MutS à l'accepteur, est également possible, même si elle semble légèrement moins efficace.

La microscopie à force atomique peut également être utilisée pour quantifier l'affinité d'une protéine pour un type de lésion. Il s'agit d'une méthode complexe, basée sur le traitement d'images obtenues suite à l'interaction. Ces images permettent de déterminer la distribution

moyenne de la protéine sur la longueur de l'oligonucléotide sonde couplé à un fluorophore. Si la lésion est placée au centre et que la protéine est capable de la reconnaître, cette distribution prend une allure gaussienne, et permet de déterminer la probabilité de liaison à chaque position. Il est alors possible d'évaluer la spécificité de l'interaction et l'affinité de la protéine, par exemple de MutS pour un mésappariement ou pour une insertion, avec une efficacité comparable voire supérieure à l'EMSA. En effet, cette technique prend en compte le site de liaison exact, ce qui n'est pas le cas de l'EMSA puisque c'est la simple fixation de la protéine sur la sonde qui est regardée, indépendamment de toute interaction non spécifique sur une position irrelevante de l'oligonucléotide, par exemple au niveau des extrémités. D'autres travaux employant un protocole similaire incluent une étude de l'interaction XPC-HR23B/adduit du cholestérol et OGG1/8-oxo-dG (Yang *et al.*, 2005).

3. Techniques faisant appel à de l'ADN immobilisé (analyses en phase hétérogène)

L'étude d'interactions simples (*i.e.* ne faisant pas appel à un trop grand nombre d'acteurs) peut être aussi réalisée à l'aide de sondes fixées sur support. Par exemple, des billes magnétiques fonctionnalisées à l'aide d'oligonucléotides sondes portant un adduit 1,3-d(GpTpG) du cisplatine rendent possible un examen de l'assemblage séquentiel et de l'importance individuelle des facteurs de la voie NER, ainsi que des activités de réparation résultantes (Riedl *et al.*, 2003). Cette méthode d'immobilisation de l'ADN a été employée au cours d'autres approches destinées à l'identification des membres de l'interactome de différentes lésions, sur lesquelles nous aurons l'occasion de revenir plus loin.

L'ADN peut aussi être immobilisé sur un support de façon à créer une biopuce. Dans ce domaine, les puces faisant appel à la résonance des plasmons de surface constituent une intéressante perspective de développement, que nous allons maintenant aborder.

- Résonance des plasmons de surface (SPR)

Les méthodes que nous venons d'évoquer dans les paragraphes précédents exigent généralement des étapes de marquage des sondes, n'autorisent pas d'étude cinétique en temps réel, et ne sont pas adaptées à des analyses en haut débit (Maillart *et al.*, 2004). Ces inconvénients peuvent être contournés grâce à la technique de SPR (*Surface Plasmon Resonance*, SPR). Il s'agit d'une méthode spectroscopique fondée sur la résonance plasmonique de surface, qui s'est déjà révélée très puissante pour détecter la liaison de bioanalytes à des sondes greffées sur une surface métallique, et qui peut être étendue à tous types de molécules biologiques (ADN, ARN, protéines, sucres).

Lorsqu'un rayon lumineux traverse un milieu possédant un indice de réfraction haut (tel que le verre) et atteint un milieu à indice de réfraction bas (tel que l'eau), une partie de la lumière est réfléchie au niveau de l'interface. Si l'angle d'incidence du rayon lumineux est plus grand que l'angle critique défini par cette interface, la lumière est intégralement réfléchie. Dans

le cas particulier où la surface du verre se trouvant à l'interface est recouverte d'une fine couche de métal noble tel que l'or ou l'argent, une partie de la lumière est absorbée par le métal. Il existe alors un second angle, de plus grande amplitude que l'angle critique, auquel cette absorption est maximale et la réflexion minimale : c'est l'angle de résonance des plasmons de surface θ_r. Il se trouve au minimum de la courbe de réflectivité tracée en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement (Figure 24). L'oscillation d'électrons délocalisés dans la couche de métal provoquée par l'absorption des photons génère des plasmons de surface, ondes électromagnétiques se propageant de façon parallèle à l'interface entre une couche métallique et un milieu diélectrique. Ces ondes sont très sensibles à toute variation intervenant au niveau de la frontière entre les deux milieux, par exemple lors de l'adsorption de molécules (van der Merwe, 2001).

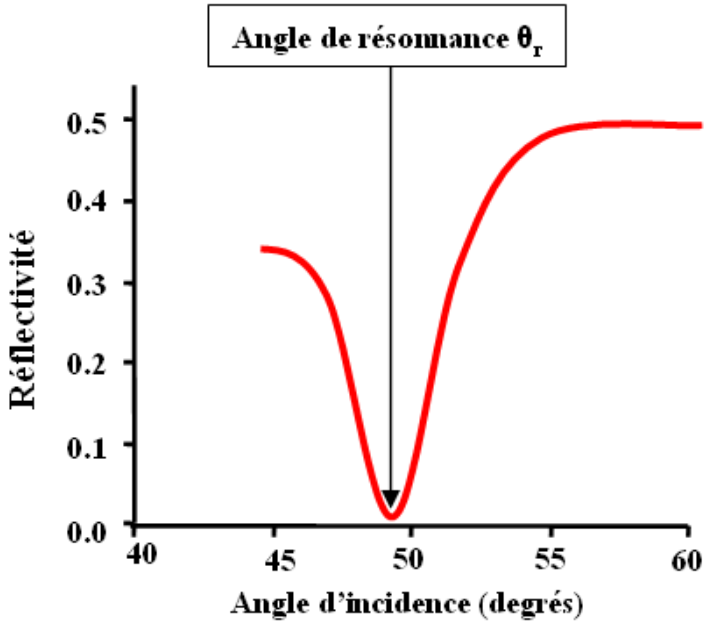


Figure 24 : L'angle de résonance des plasmons de surface définit le minimum de la courbe de réflectivité, lorsque toute la lumière est absorbée par la couche de métal et convertie en ondes plasmons (adapté d'un document commercial GenOptics).

Des sondes spécifiques peuvent être déposées en des points définis d'une surface métallique (généralement de l'or) de la même façon que pour des puces à ADN classiques. Tout événement (changement de la composition du milieu liquide, interaction entre une molécule greffée et une molécule à l'état libre dans le liquide) se produisant sur la surface d'or (dans la limite de 100-200nm au dessus de la surface) provoque un déplacement de l'angle de résonance et une diminution de l'absorption des photons (Figure 25).

La variation de réflectivité (ΔR) qui en découle est détectable en temps réel pour tous les points de la surface testée (Figure 26). Un sensorgramme présente en temps réel ΔR, et donc l'événement d'interaction.

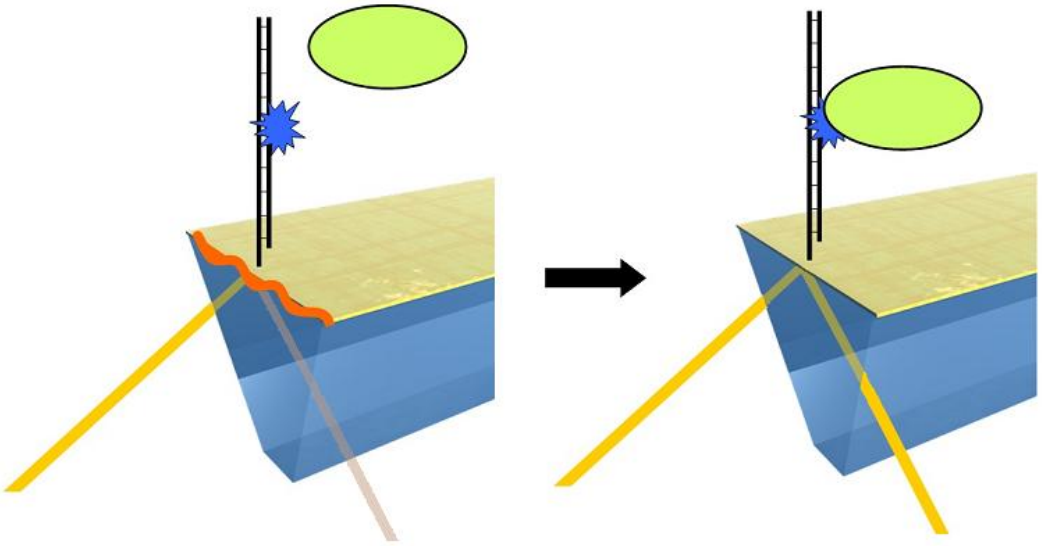


Figure 25 : Principe général de la détection spectroscopique par résonance des plasmons de surface. La lumière incidente est absorbée par la couche métallique et convertie en une onde évanescente (plasmons de surface, orange). Un événement se produisant à cette même interface, comme la fixation d'une protéine (vert) sur un oligonucléotide lésé greffé (en bleu) modifie les propriétés optiques de la surface, ce qui augmente l'intensité de la lumière réfléchie, et permet la détection.

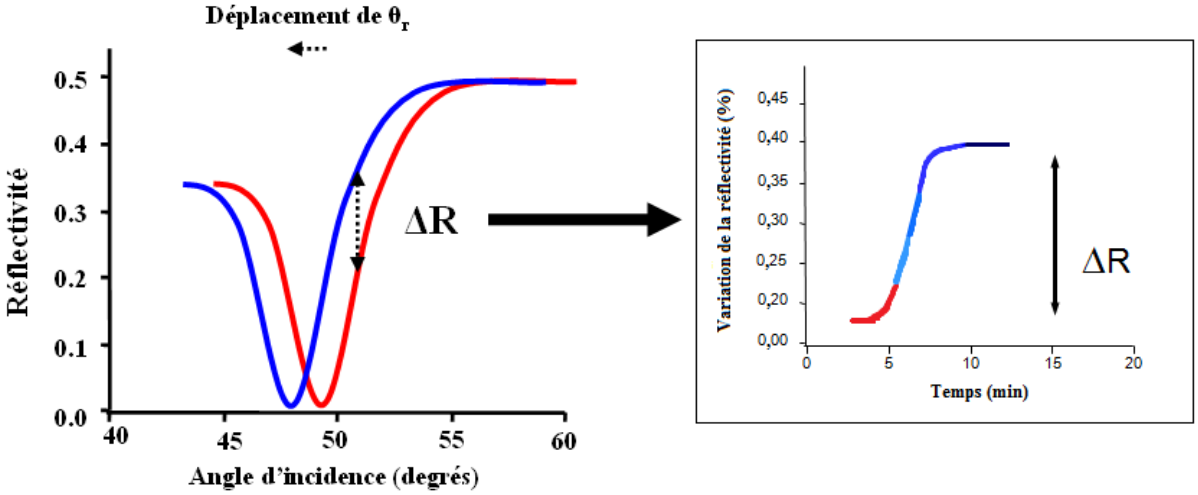


Figure 26 : Schématisation du déplacement de l'angle de résonance des plasmons de surface θ_r induit par un événement à l'interface surface métallique/milieu diélectrique. La variation de réflectivité ΔR est enregistrée par le dispositif et traduit l'événement que l'on souhaite observer (adapté d'un document commercial GenOptics).

Dans le cas qui nous intéresse, l'introduction d'un analyte puis sa liaison à la sonde induit cette variation de l'indice de réfraction, dont l'amplitude est proportionnelle à la masse de l'analyte. Cela permet alors d'enregistrer la cinétique d'association/dissociation entre les deux molécules. La sensibilité de cette technique est très importante, et la fixation de très petites molécules (induisant un faible changement dans l'indice de réfraction) peut aussi être détectée.

Les paramètres susceptibles d'entrer en jeu dans la définition d'une interaction ADN/protéine (nature du stress génotoxique/modifications dans la séquence cible, modifications particulières de la protéine, etc.) requiert l'utilisation de techniques permettant des analyses à haut débit, et si possibles multiparamétriques. Ainsi, la résonance des plasmons de surface se trouve à la base de nombreuses méthodes de mesure d'adsorption de molécules sur des surfaces métalliques, ou de mesure d'interaction entre un ligand en solution et un récepteur fixé sur la surface métallique. Les premières tentatives fructueuses d'adaptation de la méthode SPR pour le développement de biocapteurs sont déjà anciennes (Liedberg *et al.*, 1983; Jonsson *et al.*, 1991). La plus connue des méthodes actuellement utilisées est le BIAcore® (*Biospecific Interaction Analysis*, GE Healthcare), mise sur le marché dès 1990. Elle est utilisée en routine pour la découverte de petites molécules (ligands médicaments), la sélection de clones pour la production d'anticorps monoclonaux, la mise au point de tests d'immunogénicité pour des agents thérapeutiques, etc. (Jason-Moller *et al.*, 2006). Les puces fonctionnalisables sont commercialisées sous forme de lammes de verre recouvertes d'or.

La SPRi est une forme plus avancée de la technique de SPR. Décrite voici plus de 20 ans (Yeatman *et al.*, 1987), elle utilise des puces sous forme de prisme semblables à ceux présentées sur la Figure 26. La SPRi possède deux avantages par rapport aux méthodes conventionnelles (Scarano *et al.*, 2010). Le premier est la visualisation en temps réel sur un écran de l'intégralité de la surface de travail. Ceci permet notamment de contrôler la qualité de cette surface (dépôts de sondes) et d'obtenir, après traitement du signal et toujours sans marquage, une image reconstituée des événements se produisant à la surface du prisme. Le second avantage consiste en l'étude simultanée et en continu de plusieurs dizaines d'interactions, grâce à une surface fonctionnalisée selon un format de biopuce (dépôts localisés de dizaines de sondes).

Malgré leur attractivité, la SPR et, *a fortiori*, la SPRi, sont encore peu utilisées pour l'étude des associations ADN lésé/protéine, en comparaison avec des méthodes plus classiques telles que l'EMSA. De ce fait, il existe peu d'études publiées illustrant son emploi. Mises à part celles de notre laboratoire, toutes font appel au BIAcore®. Afin d'illustrer cette méthode de biophysique et ses possibilités, évoquons quelques-uns des travaux l'ayant employée pour l'étude des propriétés d'interaction entre protéines de réparation et ADN lésé.

Ce sont principalement les glycosylases qui ont fait l'objet des études les plus abouties. Ainsi, la SPR a été employée pour étudier l'inhibition de l'activité de la glycosylase MPG (impliquée dans l'élimination de bases alkylées) par un anticorps monoclonal (Adhikari *et al.*, 2008). Ensuite, la même équipe a pu précisémment mesurer, toujours grâce à la SPR, l'affinité de la protéine pour différents types de petites lésions (Adhikari *et al.*, 2009). Une analyse fonctionnelle (différentes mutations sur des acides aminés critiques) de la glycosylase MUTYH sur la 8-oxo-dG a aussi mis en œuvre la SPR (D'Agostino *et al.*, 2010), ainsi qu'une étude (interactions ADN/protéine et protéine/protéine) portant sur la coopération entre l'exonucléase X et MutL, protéines bactériennes, et les implications potentielles de cette interaction dans le mécanisme de recombinaison (Cheng *et al.*, 2010). Signalons également une étude de l'affinité

de PARP-1 pour des ODN mimant des cassures simple- et double-brin de l'ADN (Jorgensen *et al.*, 2009). Les photoproduits UV, lésions plus déformantes, furent également utilisés sur des sondes destinées à décrire l'affinité de XPA et de RPA pour ce type de dommage (Wang *et al.*, 2000).

Les adduits du cisplatine n'ont pas été oubliés par les chercheurs travaillant avec la SPR. Ainsi, nous pouvons citer une étude ayant pour objectif une meilleure compréhension du processus de reconnaissance de la lésion par les facteurs de la voie NER. Une expérience de comparaison de l'affinité du complexe XPC-HR23B et de RPA a ainsi été menée, sans objectif d'obtention de paramètres cinétiques (You *et al.*, 2003). Elle a d'une part confirmé la préférence de XPC-HR23B pour l'ADN double-brin portant un adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine par rapport à l'ADN double-brin non lésé et l'ADN simple-brin non lésé. L'injection de RPA sur les mêmes sondes a révélé sa très nette préférence pour l'ADN simple-brin non lésé, alors qu'elle s'associe peu et de façon équivalente à l'ADN double-brin avec ou sans l'adduit majoritaire du cisplatine. La SPR a donc permis de confirmer, pour ces deux protéines, des observations antérieures.

Les propriétés d'interaction de MutS avec une lésion complexe de type [mésappariement-adduit du platine] ont également été étudiées grâce à une analyse par SPR. Ces expériences ont d'une part montré que MutS possède une affinité supérieure pour le mésappariemment GT que pour l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine. D'autre part, la présence de cet adduit en face du mésappariemment augmente la fixation de MutS par rapport au seul mésappariemment (Fourrier *et al.*, 2003). À partir des résultats obtenus dans une seconde série de travaux réalisés par la même équipe (Sedletska *et al.*, 2007), on constate que MutS s'associe bien plus rapidement avec la lésion complexe, et que le signal brut final représentant cette association est plus important pour la lésion complexe. En outre, la présence d'ATP inhibe une partie des capacités de reconnaissance de MutS pour ces lésions, avec un effet bien plus prononcé pour le mésappariement (Figure 27). Au-delà de la phase d'association, il est également possible d'étudier par SPR la dissociation du complexe formé. Dans le cas présent, cette dissociation a été également étudiée en présence et en l'absence d'ATP dans le tampon de course, montrant que MutS se dissocie quatre fois plus lentement de la lésion complexe que du mésappariement et que l'ATP a, là encore, un effet inhibiteur plus important (Figure 28).

Ces résultats montrent que l'ATP n'est pas indispensable à la reconnaissance par MutS de lésions composées, notamment celles qui peuvent se former suite à l'action du mécanisme de synthèse translésionnelle. Ceci peut être mis en parallèle avec des observations tendant à montrer que la présence de mutations modifiant le site de fixation de l'ATP met en défaut la voie de réparation MMR mais pas l'induction de l'apoptose en réponse à un traitement au cisplatine. La formation d'un complexe protéine/lésion durable même en présence d'ATP pourrait expliquer ce phénomène.

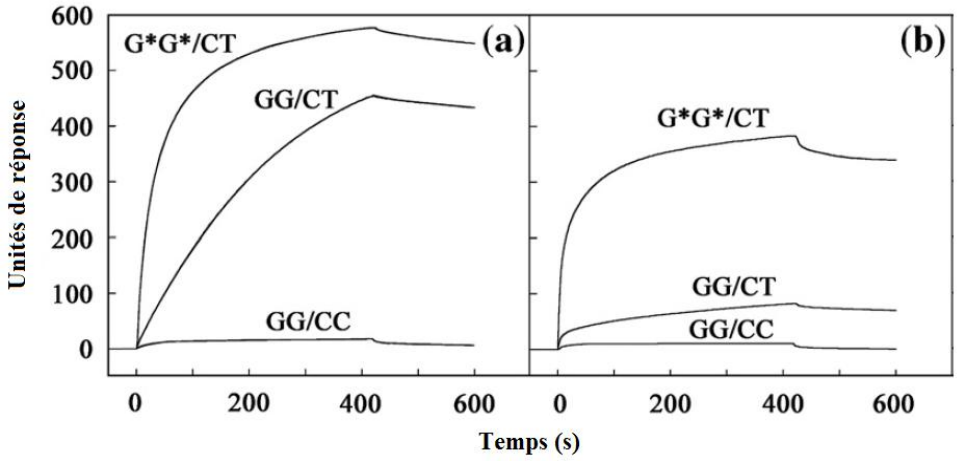


Figure 27 : Analyse par SPR de l'association de la protéine MutS avec un oligonucléotide non lésé (GG/CC), portant un mésappariement de base (GG/CT), ou une lésion complexe [mésappariement + adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine] (G*G*/CT) (a) en l'absence ou (b) en présence d'ATP. Le facteur de la MMR reconnaît mieux la lésion complexe et s'y associe plus rapidement (a), alors que la présence d'ATP ou d'AMPPNP inhibe sa fixation sur le mésappariement et dans une moindre mesure sur la lésion complexe (b) (adapté de Sedletska *et al*., 2007).

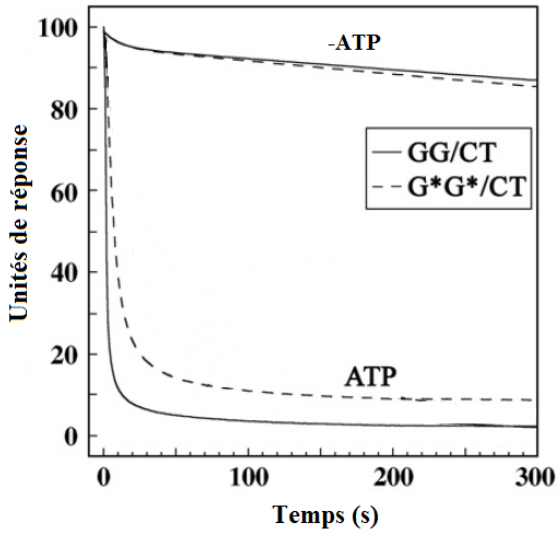


Figure 28 : Analyse par SPR de la dissociation de la protéine MutS avec un oligonucléotide portant un mésappariement de base (GG/CT) ou une lésion complexe [mésappariement + adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine] (G*G*/CT) en l'absence ou en présence d'ATP. L'ATP induit une dissociation rapide de MutS, un effet qui est plus important sur l'oligonucléotide portant le mésappariement ($t_{1/2} \approx$ 2s) que sur celui portant la lésion complexe ($t_{1/2} \approx$ 8s) (adapté de Sedletska *et al*., 2007).

Utilisant des appareils mis au point au laboratoire ou commerciaux (GenOptics Bio Interactions, IBIS technologies, GWC technologies), la SPRi a déjà été employée pour étudier des interactions ADN/protéines ou des activités de réparation d'ADN lésé. Nous évoquerons certains de ces travaux au cours de notre discussion puisqu'ils utilisent des méthodes dont nous

nous sommes nous-mêmes inspirés pour développer notre propre protocole au cours de ce travail de thèse.

B) Identification d'un interactome

D'une manière générale, les techniques évoquées précédemment se limitent à l'étude de cibles biologiques connues. Elles peuvent être, à l'occasion, couplées à des analyses protéomiques « à petite échelle » (immunodétection, séquençage d'Edman) mais celles-ci permettent rarement d'établir un catalogue d'interactions multiples mettant en jeu des facteurs seuls ou en complexes. Or la possibilité d'obtenir des listes plus complètes de facteurs capables d'établir (seuls ou en complexe) une liaison plus ou moins durable avec l'ADN endommagé est un point crucial afin de mieux appréhender l'ensemble des mécanismes biologiques enclenchés en réponse à ces dommages. Dans ce cas c'est l'obtention d'informations à haut débit qui est principalement recherchée. En effet, en raison de la multiplicité des interactions simultanées il est difficile d'étudier de façon plus fine chacune d'entre elle (pour ce faire on fera plutôt appel aux techniques décrites lors des paragraphes précédents).

Ces méthodes ont largement profité de l'essor des méthodes de protéomique, à moyenne (gel à deux dimension) ou large échelle (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, technique aussi appelée *shotgun proteomics*). Depuis quelques années, en effet, les avancées réalisées dans le domaine de la spectrométrie de masse ont permis d'introduire les machines dédiées dans les laboratoires de biologie, et d'adapter cette méthode analytique extrêmement puissante à l'identification et à l'étude globale des protéines, tout en incorporant des paramètres tels que la recherche des modifications post-traductionnelles, ou la réalisation d'analyses quantitatives. Ces avancées ont également profité du développement de bases de données permettant de faire un lien direct et rapide entre les données expérimentales et l'état des connaissances, et donc l'obtention de catalogues entiers de protéines. Nous allons maintenant présenter quelques exemples d'approches utilisées pour établir une cartographie protéique des partenaires de lésions de l'ADN.

1. *Ligand fishing* : principe et exemples

Les techniques d'affinité, que l'on peut désigner sous le vocable de *ligand fishing* ou capture spécifique de ligands, possèdent déjà un historique de résultats publiés conséquent, et nous allons maintenant présenter certaines de ces approches. Leur schéma général peut se décomposer ainsi : exposition d'un piège oligonucléotidique lésé à des protéines purifiées ou des extraits cellulaires, isolement du piège avec les protéines capturées, rinçages permettant d'éliminer les contaminants non spécifiques, identification des protéines d'intérêt par des méthodes protéomiques.

Des études axées sur les dérivés du platine ont été menées au cours des quinze dernières années. Un premier essai d'identification parallèle de plusieurs protéines se liant aux adduits du

cisplatine a tout d'abord été réalisé à l'aide d'ADN globalement lésé puis fixé sur une colonne de sepharose. Des extraits cellulaires HeLa ont été passés sur cette colonne, qui a ensuite été rincée à l'aide d'un tampon légèrement salin (élution des protéines fixées de façon non spécifique), puis un tampon plus stringent a été appliqué afin d'isoler l'ensemble des protéines spécifiquement retenues. Les capacités de liaison des différentes fractions d'élution ont ensuite été évaluées grâce à l'EMSA et les protéines identifiées par séquençage. Cette approche combinée a permis d'identifier HMGB1, XPA et RPA, ainsi que le complexe DNA-PK (Turchi *et al.*, 1999).

Afin de favoriser la capture des cibles protéiques à partir d'une lésion, il a aussi été envisagé de générer des pontages entre le dommage et la protéine. Des travaux réalisés dans le laboratoire de Stephen Lippard ont mis en œuvre un groupement benzophénone couplé à l'atome de platine afin de former une espèce photoréactive décrite par la Figure 29.

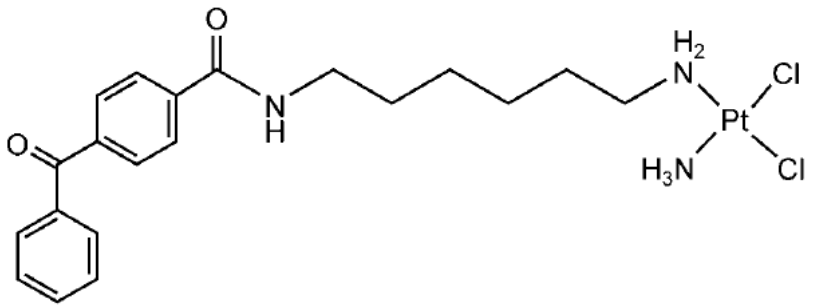


Figure 29 : Analogue photoréactif du cisplatine contenant un groupement benzophénone (Guggenheim *et al.*, 2009).

L'introduction de ce composé au sein d'oligonucléotides couplés à la biotine constitue un piège pour les protéines contenues dans un extrait nucléaire. Après exposition et irradiation UV simultanées (365nm), il est alors possible d'isoler l'ensemble à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine puis de réaliser l'identification protéomique des protéines capturées. La présence d'HMGB1 et HMGB2 démontre que le groupement benzophénone n'altère pas suffisamment la structure de l'adduit pour empêcher cette interaction. PARP-1 se trouve également piégée par ce système (Zhang *et al.*, 2004). Son utilisation à plus grande échelle avec des duplex de 25 et 90 bases de long contenant des adduits 1,2-d(GpG), 1,3-d(GpNpG) ou interbrins, a permis de décrire une partie de l'interactome des adduits du cisplatine (Guggenheim *et al.*, 2009; Zhu & Lippard, 2009), avec l'identification de plusieurs nouveaux membres. Nous reviendrons plus en détails sur les résultats de ces études au cours de notre discussion car il constitue un bon point de comparaison avec les approches que nous avons employées.

Très récemment, des sondes fonctionnant sur le même principe de capture par photopontage ont été synthétisées dans le but d'étudier l'interactome de la 8-oxo-dG. Elle comporte un groupement diazirine couplé à l'uridine. Ce groupement forme un dérivé réactif carbène après irradiation à λ = 365nm et se trouve placé sur le brin complémentaire de celui

portant la lésion. Exposées à des extraits nucléaires humains, ces sondes ont ensuite été isolées à l'aide de billes de sépharose recouvertes d'avidine. Elles ont permis d'identifier spécifiquement, après analyse protéomique, OGG1 (glycosylase spécialisée dans l'élimination des lésions oxydatives), PARP-1, HMGB1, l'uracile ADN- glycosylase et la nucléase APEX (Winnacker *et al.*, 2010).

De très récents travaux (Loeber *et al.*, 2009) ont mis en œuvre une méthode de *ligand fishing* afin d'identifier les protéines qui forment des liaisons covalentes avec la chlorméthine (c'est ici le génotoxique qui fait directement office d'agent pontant avec les protéines). La co-incubation d'oligonucléotides marqués à la biotine, d'extraits nucléaires de cellules HeLa, de la moutarde azotée choisie, et l'isolation des complexes formés à l'aide de billes de sépharose recouvertes de streptavidine, ont permis l'identification par spectrométrie de masse de 53 protéines appartenant à des familles variées (motilité, remodelage de la chromatine, initiation de l'apoptose). La présence de certaines d'entre elles peut s'expliquer par leur abondance relative, et donc une probabilité d'interagir avec la « lésion hameçon ». Cependant, une certaine surreprésentation des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN a été notée (AGT, XRCC1, PARP-1, Ku70/80, Ref-1), démontrant l'efficacité du piège.

2. *Ligand fishing* : améliorations récentes

L'un des obstacles à la mise au point de méthodes de *ligand fishing* est le « bruit de fond » important susceptible d'être généré, principalement par le support du piège mais aussi par le piège lui-même (les séquences d'ADN). Ce bruit de fond correspond à l'ensemble des protéines indésirables collectées dans l'échantillon final. Ces protéines sont présentes car la taille et la nature du support favorisent généralement les interactions non spécifiques avec les différents facteurs présents dans les extraits. Ainsi, dans l'approche que nous venons de décrire, la récupération des protéines fixées est effectuée à l'aide d'un tampon dénaturant. Ceci présente le désavantage de décrocher les protéines également fixées sur les billes magnétiques, et donc d'augmenter la présence de contaminants au sein de l'échantillon obtenu. Les contrôles appropriés peuvent permettre de palier à ce problème. Cependant, l'échantillon se trouve inutilement enrichi en espèces sans intérêt, qui sont par leur nombre à même de gêner l'analyse par spectrométrie de masse et donc de limiter la détection des protéines potentiellement intéressantes.

Quelques méthodes visant à limiter la présence de protéines non pertinentes peuvent être retrouvées dans la littérature (Hegarat *et al.*, 2008) :

- génération de pontage sonde/protéine à l'aide d'agents chimique ou par irradiation (déjà vu dans certains des exemples précédents) ;
- fractionnement préalable de la source de protéines (élimination des compétiteurs non spécifiques à l'aide de colonnes dédiées ou par incubation avec le support du piège) ;

- augmentation progressive de la concentration en détergent ou en sels (élution séquentielle de fractions hétérogènes) ;
- augmentation progressive de la température (rupture séquentielle des interactions par dénaturation) ;
- addition d'un compétiteur spécifique (décrochage ciblé des protéines ou des sondes) ;
- action directe sur la sonde (dégradation enzymatique de la sonde oligonucléotidique ; coupure de sa liaison au support solide).

Nous n'illustrerons pas chacun de ces points, mais allons tout de même évoquer deux techniques pour décrocher les sondes du support et relarguer les protéines associées : l'utilisation d'une nucléase et l'utilisation de groupements photoréactifs permettant de décrocher la sonde de son support.

L'un des premiers essais de ce genre d'approche sur l'ADN lésé utilisait l'un des propriétés des glycosylases spécialisées dans la prise en charge des sites abasiques. Ces enzymes possèdent une activité lyase qui leur sert à cliver le brin d'ADN où se trouve le site abasique. Durant ce processus un intermédiaire réactionnel aldimine (base de Schiff) se forme. Il peut être aisément réduit en présence de borohydrure de sodium, créant une liaison entre la protéine et l'ADN. Cette liaison covalente facilite la récupération de la protéine. Des oligonucléotides portant un site abasique ont été exposés à des extraits bactériens et de levure en la présence et en l'absence de l'agent réducteur. Afin de minimiser le bruit de fond engendré par le support (résine recouverte de streptavidine), une endonucléase est utilisée pour dégrader les sondes et ainsi ne décrocher que les protéines capturées. Après une analyse protéomique par spectrométrie de masse ces travaux n'ont révélé (outre la présence de protéines connues) qu'un seul candidat original (Rieger *et al.*, 2006). Cependant, cette approche est chronologiquement l'une des premières du genre, et soulève plusieurs points que nous aurons l'occasion d'aborder lors de la description de nos propres travaux.

L'emploi d'un groupement photolabile placé entre le support et la sonde est une approche élégante qui a été testée pour l'étude des cassures double-brin. Après exposition du piège à la source de protéines désirées, il suffit de réaliser une irradiation ($\lambda > 300$nm) pour détacher l'ADN et les protéines et éliminer les billes (Figure 30). Là encore, des analyses protéomiques subséquentes servent à identifier les protéines liées (Hegarat *et al.*, 2007). Tout d'abord évaluée par la fixation réussie de TetR (*tetracycline repressor protein*) sur sa séquence privilégiée (avec la présence d'un contaminant unique), cette technique a ensuite permis d'isoler, grâce à son extrémité laissée libre qui mime une cassure double brin, les protéines composant le complexe impliqué dans la réparation de ce type de dommage : DNA-PK_{cs}, Ku70 et Ku80, PARP-1. L'emploi d'une élution douce assure de plus la récupération de protéines dans leur conformation native, et qui retiennent donc leur activité (test de phosphorylation de XRCC4 par DNA-PK_{cs}).

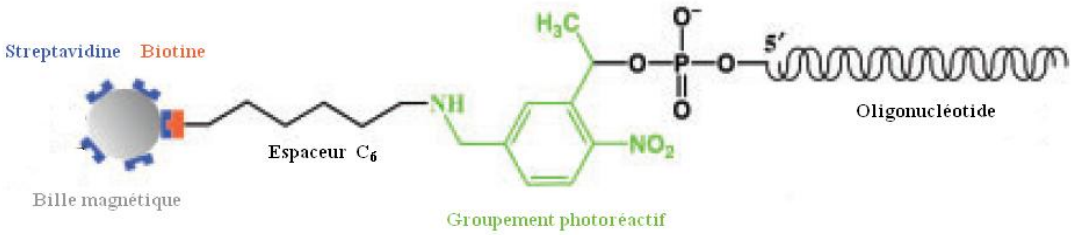


Figure 30 : Schéma du piège à protéines permettant une récupération sélective de l'ADN et des protéines liées par irradiation UV. Il utilise un groupement 1-(2 nitrophényl)-éthyl photoréactif lié à une molécule de biotine via un lien acide 6-aminocaproique, commercialement disponible (adapté de Hegarat *et al.*, 2007).

3. Puces à protéines

Les méthodes précédemment évoquées font appel à l'immobilisation de sondes d'ADN. À l'inverse, des puces à protéines, plus difficiles à mettre en œuvre en raison des contraintes de production de protéines, peuvent aussi être utilisées pour vérifier la fixation de séquences nucléiques marquées et l'identification subséquente de leur(s) partenaire(s), par exemple pour identifier les séquences de certains facteurs de transcription (Ho *et al.*, 2006).

Peu d'études de ce genre ont pour l'instant été menées en lien avec les lésions de l'ADN. Parmi celles-ci, un protocole simple d'expression de 4 256 gènes d'*Escherichia coli* K12 (> 99% de son génome) et de dépôt sur puce a pu être réalisé (Chen *et al.*, 2008). Une recherche subséquente des capacités d'interaction de ces protéines avec des oligonucléotides marqués (cyanines) portant des lésions particulières (mésappariements ou sites abasiques) a entraîné l'identification de nouvelles protéines reconnaissant ces lésions avec de fortes affinité et spécificité, parmi lesquelles : CspE, protéine de choc thermique capable de déstabiliser la sructure secondaire des acides nucléiques reconnaissant mésappariements et sites abasiques ; YbcN, reconnaissant mésappariements et sites abasiques et capable de déplacer les bases endommagées vers l'extérieur de la double hélice ; YbaZ, capable de reconnaître les sites abasiques et la lésion O^6-méthylguanine.

Si ce type d'approche est rendu possible par l'expression de protéines procaryotes, plus aisée, les protéines humaines et l'ADN modifié par les métaux n'ont pas été laissés pour compte. Ainsi, de telles puces ont été utilisées pour évaluer les capacités d'interaction d'une bibliothèque de protéines avec des oligonucléotides contenant des adduits métalliques (Stansfield *et al.*, 2009). C'est tout d'abord HMGB1, capable de reconnaître à la fois les adduits du platine et du chrome, qui a été utilisée sur des lames de type *macroarray* recouvertes de nitrocellulose pour réaliser la preuve de concept à l'aide de sondes nucléiques marquées avec un agent fluorescent. Malgré une bonne spécificité, la méthode développée a montré des limites importantes en comparaison de l'EMSA : les K_d obtenus avec cette technique éprouvée diffèrent d'un facteur 100 entre l'ADN lésé et l'ADN non lésé, alors que la fluorescence n'augmente ici que d'un facteur 4-8, mettant en question la possibilité d'obtenir des informations quantitatives avec ce type de biopuce. Ensuite transposée à un format de type

microarray commercial, contenant 1 800 et 3 000 protéines, elle a tout de même permis d'identifier 10 protéines interagissant avec la sonde platinée, dont une seule déjà connue (histone H1). Quatre de ces nouveaux facteurs (*Zinc finger protein 684, Ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1, Apolipoprotein B messenger RNA editing enzyme, LIM domain kinase 2*) possédent des motifs « doigt de zinc », à l'instar de XPA et ZNF143, deux protéines déjà connues pour leur capacité à lier les adduits du platine. De plus, les kinases sérine/thréonine Aurora A et B, ne possédant pas de capacité connue à lier les acides nucléiques, ont aussi été observées. Ces kinases jouent un rôle dans la régulation de la division cellulaire et semblent impliquées dans les phénomènes de tumorogénèse (Aurora A régulant notamment certaines activités de télomérases) et leur rôle exact aux côté du cisplatine doit maintenant être déterminé.

Les principales méthodes dont nous avons fait état se trouvent résumées dans le Tableau 4. Celui-ci permet de se rendre compte que c'est très récemment que l'étude des interactions ADN lésé/protéine a pris un nouveau tournant en profitant de l'établissement de méthodes à haut débit, permettant d'établir des listes de candidats impliqués dans la prise en charge des lésions.

Ces procédés avancés doivent néanmoins toujours s'appuyer sur des méthodes plus classiques afin de caractériser individuellement (ou au niveau d'un complexe) les partenariats déterminés ainsi que pour asseoir leur pertinence biologique, qui n'est pas une conséquence nécessaire de l'affinité observée. En outre, la multiplicité des techniques d'identification des interactions est tout à fait indicatrice du fait qu'il n'existe pas de méthode universelle pour étudier de façon exhaustive les interactions entre ADN lésé et protéines. Inspirés par les travaux déjà publiés, nous nous sommes proposé de mettre au point une nouvelle approche pour étudier les protéines interagissant avec les lésions du platine, et nous allons donc maintenant détailler les objectifs de ce travail de thèse ainsi que les moyens qui ont été mis en œuvre.

TYPE DE LÉSION	APPROCHE UTILISÉE (principales caractéristiques)	PROTÉINES SIGNIFICATIVES RETENUES PAR LE PIÈGE	RÉFÉRENCE
Adduits du cisplatine (1,2- & 1,3-d(GpG), interbrin) et de l'oxaliplatine (1,2-d(GpG)	Oligonucléotides (25 et 90pb) contenant un adduit modifié (groupement benzophénone) du platine (photopontage des facteurs d'intérêt) ; fixation des sondes sur support pour isolement ; analyse protéomique par gel 1-D et spectrométrie de masse en mode tandem	Protéines à boîte HMG, DDB1, RPA, PARP-1, Ku70/Ku80, DNA-PK$_{cs}$, MutSβ, XRCC1, etc. etc. (humain)	Zhang *et al*., 2004 ; Guggenheim *et al*., 2009 ; Zhu & Lippard, 2009 ; Zhu *et al*., 2010
Sites abasiques	Oligonucléotides (30bp) fixés sur billes ; analyse protéomique par gel 1-D et spectrométrie de masse en mode tandem	AroF, DnaK, MutM, PolA, TnA, TufA, UvrA (*Escherichia coli*) ; ARC1, Ygl245wp (*Saccharomyces cerevisiae*)	Riegert *et al*., 2006
Cassures double-brin	Billes magnétiques fonctionnalisées à l'aide d'oligonucléotides (58pb) possédant un bras photoclivable (élimination du support solide après interaction) ; analyse protéomique par gel 2-D et spectrométrie de masse en mode tandem	DNA-PK$_{cs}$, Ku70/Ku80, PARP-1 (humain)	Hégarat *et al*., 2007
Adduit de la chlorméthine (moutarde azotée)	Incubation conjointe d'oligonucléotides, d'extraits cellulaires et de l'agent alkylant (pontage chimique) ; fixation des sondes sur support pour isolement ; analyse protéomique par gel 1-D et spectrométrie de masse en mode tandem	AGT, XRCC1, PARP-1, Ku70/86, Ref-1, etc. (humain)	Loeber *et al*., 2009
Adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine	Puce à protéines humaines commerciale ; sondes oligonucléotidiques (50pb) fluorescentes	Kinases Aurora A et B, zinc finger protein 684, ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1, apolipoprotein B messenger RNA editing enzyme, LIM domain kinase 2, etc. (humain)	Stansfield *et al*., 2009
8-oxo-dG	Oligonucléotides (> 25bp) portant la lésion, un groupement diazirine (photopontage des facteurs) en face de celle-ci ; fixation sur billes d'agarose pour isolement ; analyse protéomique par gel 1-D puis nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem	OGG1, PARP-1, HMGB1, uracile ADN-glycosylase, APEX (humain)	Winnacker *et al*., 2010

Tableau 4 : Quelques méthodes significatives utilisées pour la détermination de l'interactome de lésions de l'ADN.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE

Nous avons pu juger, à travers l'analyse bibliographique, de l'importance qu'il peut y avoir à cataloguer les protéines interagissant avec les lésions de l'ADN, c'est-à-dire identifier l' « interactome » de ces dommages. Il s'agit d'informations cruciales pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse aux agents génotoxiques. Des exemples de méthodes destinées à remplir un tel but ont été donnés : les plus récentes profitent de l'essor de la protéomique pour faire appel à sa puissance de détection et augmenter la quantité ainsi que la qualité des résultats. Cependant, ces méthodes, si elles s'avèrent efficaces, ne peuvent être absolument exhaustives, et requièrent également une association avec d'autres techniques afin de confirmer, voire de caractériser, une interaction particulière.

Au début de cette thèse le laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques » n'avait que très peu d'expérience dans cette thématique et dans les méthodes qui lui sont associées. L'objectif de ce travail est donc, dans un premier temps, méthodologique. Il met en œuvre la complémentarité d'approches de biochimie, de chimie analytique et de biophysique pour l'identification et la validation de capacités de reconnaissance de protéines nucléaires pour une famille de lésions déformantes de l'ADN. Ce sont les altérations engendrées par les dérivés du platine qui ont été sélectionnées. Le choix de ce type de dommages est justifié :

- par leurs implications biomédicales ;
- par le panel de membres de l'interactome déjà connus qui nous apportent une base pour la validation de nos méthodes ;
- mais aussi par l'hypothèse que des adaptations méthodologiques permettront de compléter cet interactome par la découverte de protéines pas encore connues comme s'associant aux lésions engendrées par les dérivés du platine testés (cisplatine, oxaliplatine, satraplatine).

Le travail mené peut être décomposé en trois parties :

Détermination de l'interactome des adduits du platine – Dans cette première partie, nous décrirons un premier système, destiné à compléter la liste des protéines constituant l'interactome des adduits générés par les dérivés du platine à partir d'extraits de cellules HeLa. Après avoir remarqué que la plupart des protocoles décrits ont pour caractéristique commune l'utilisation de sondes oligonucléotidiques de courte taille (quelques dizaines à quelques centaines de bases), nous nous sommes proposés de construire une nouvelle forme de piège à ligands (méthode dite de *ligand fishing*) basée sur des sondes plasmidiques (donc plus longues) lésées immobilisées sur un support solide. Le choix de cette forme d'ADN présente plusieurs avantages : possibilité d'introduire plusieurs dizaines de lésions permettant de récupérer plus de protéines ; interaction avec des protéines ou complexes protéiques de toutes tailles. Le principe

de capture est ici uniquement basé sur l'affinité des différents facteurs pour les lésions, puisque notre protocole ne comprend pas d'étape résultant en une fixation covalente entre les deux partenaires.

Notre piège profite de la possibilité offerte par notre laboratoire, de par son expérience dans l'étude chimique des lésions de l'ADN, de caractériser finement notre piège, notamment grâce à un dosage du taux de lésions introduites sur les sondes plasmidiques par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. En outre, afin de disposer d'une liste finale de protéines fiables pour compléter l'interactome des lésions du platine, nous nous sommes tournés vers les méthodes de protéomique les plus avancées (nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem) pour réaliser l'identification de tous les facteurs retenus spécifiquement par nos sondes plasmidiques.

Mise au point d'une biopuce SPRi « lésions platinées » – Dans un deuxième temps, nous avons mis au point un second système sous format biopuce et dont le mode de détection est basé sur la SPRi. Cette technologie a déjà été utilisée pour l'étude d'interactions ADN lésé/protéines. À partir d'une séquence oligonucléotidique cible éprouvée, nous avons construit un modèle de puce dédié à l'étude simultanée de l'affinité de protéines connues ou des candidats originaux (identifiés grâce à l'approche de *ligand fishing*) pour l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine ainsi que ses équivalents générés par l'oxaliplatine et le JM118. Ainsi, deux protéines (HMGB1, membre bien connu de l'interactome, et TOX4, l'un des candidats originaux découverts à l'aide de l'approche de *ligand fishing*) ont fait l'objet d'une analyse en parallèle.

Étude du rôle de DDB2 dans la réparation des lésions du platine – Les deux premières parties de ce travail ont permis d'obtenir des résultats biologiques intéressants, mais portant surtout sur l'optimisation de techniques et sur l'exploitation d'un modèle biologique simple (extraits nucléaires commerciaux, protéines purifiées). Dans une troisième partie, nous avons souhaité commencer à exploiter les approches mises au point afin d'aborder une thématique plus biologique : approfondir le rôle de la protéine DDB2, membre présumé de l'interactome des lésions du cisplatine, dans la prise en charge de ces dommages. Cette étude préliminaire nous permettra de (i) confirmer à partir d'un autre modèle cellulaire les résultats obtenus sur les extraits HeLa (objectif technique) ; (ii) tester notre piège de *ligand fishing* avec un autre type de lésions de l'ADN (photoproduits UV) (objectif technique) ; (iii) évaluer les capacités d'interaction de la protéine DDB2 avec les adduits du cisplatine ainsi que son rôle dans leur réparation et/ou les autres voies de réponse à la présence de ces dommages (objectif plus biologique). Deux modèles cellulaires dérivés d'une lignée cancéreuse mammaire (MDA MB 231), dont un exprime de façon constitutive la protéine DDB2, ont été sélectionnés à cet effet, ainsi que deux traitements génotoxiques : l'exposition au rayonnement UV, et le traitement au cisplatine.

Nous allons maintenant présenter ces trois volets dans trois chapitres distincts. Chacun de ces chapitres sera découpé en trois parties. La première détaillera les matériels et méthodes utilisés. Pour les principales approches, un rappel sur la méthode sera effectué, avant de décrire les protocoles plus en détails. La deuxième partie décrira les résultats obtenus. La troisième partie sera constituée d'une discussion de ces résultats. Les conclusions et perspectives générales seront enfin abordées.

DÉTERMINATION DE L'INTERACTOME DES ADDUITS DU PLATINE

I. Matériel & Méthodes

A) Construction et utilisation du système de ligand fishing

1. Principe général

Nous allons décrire ici les étapes de construction du piège à protéines, puis son utilisation dans le cadre de l'établissement de l'interactome des lésions du platine. Les étapes succesives sont représentées sur la Figure 31. Il s'agira tout d'abord de préparer les sondes plasmidiques lésées, puis de les utiliser pour fonctionnaliser un support solide et d'exposer le piège résultant à des extraits nucléaires de cellules HeLa afin de capturer les protéines interagissant spécifiquement avec les lésions.

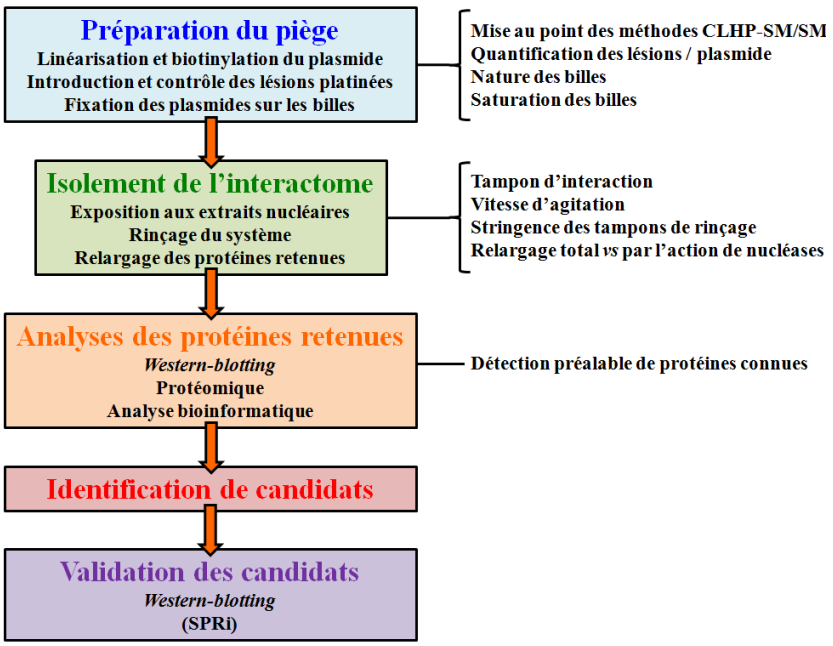


Figure 31 : Les étapes de construction et d'utilisation de notre piège plasmidique pour la détermination de l'interactome des lésions du platine. Les principales optimisations réalisées sont indiquées en parallèle.

Les extraits nucléaires proviennent d'une source commerciale qui nous a permis de disposer, pour nos expériences de piégeage, d'une abondante source de protéines favorisant la reproductibilité des expérimentations successives. Ils sont couramment utilisés dans notre laboratoire pour mesurer des activités de réparation sur biopuce.

Plusieurs étapes ont fait l'objet d'optimisations et de tests de validation qui seront également détaillés. Précisons que les protocoles mettant en œuvre la chromatographie liquide

couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM/SM) pour l'identification des protéines et le dosage de lésions sur les sondes plasmidiques utilisent des technologies distinctes et seront décrits dans des sections qui feront suite à celle-ci.

À l'inverse des systèmes que nous avons décrits au court de l'analyse bibliographique, notre piège se compose d'ADN plasmidique. Ce type de séquence a été choisi pour sa longueur, adaptable à un microsystème mais également capable de contenir plusieurs dizaines de lésions. Cela confère au piège la capacité d'interagir avec des protéines de toutes tailles, voire des complexes assemblés, et augmente la quantité totale de protéines retenues.

Après linéarisation du plasmide par restriction enzymatique, une molécule de biotine est introduite à l'une de ses extrémités, ce qui permet générer un point de fixation unique de la sonde afin de l'immobiliser sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Pour ce faire, nous avons retenu deux enzymes, chacune possédant un site de restriction unique qui se trouve au sein du site de clonage multiple du plasmide. Cela permet d'éliminer un court fragment d'ADN (33 paires de base) et de conserver deux extrémités collantes, dont une seule contient une thymine sur la partie simple brin. Ce site unique est utilisé pour introduire une adénine couplée à la biotine. Les autres nucléotides introduits sont modifiés par la présence d'un groupe phosphorothioate, qui protège les extrémités de l'action des exonucléases présentes dans les extraits cellulaires (Mello *et al.*, 2006). La procédure est schématisée par la Figure 32.

L'introduction de la biotine se fait à l'aide du fragment de Klenow. L'ADN polymérase I de la bactérie *Escherichia coli* possède une activité polymérase 5'→3' mais aussi une double activité exonucléase 5'→3' et 3'→5'. La partie responsable de l'activité exonucléase 5'→3' est éliminée à l'aide d'un traitement avec la protéase à sérine subtilisine, ce qui aboutit à une polymérase fonctionnelle qui est le fragment de Klenow. Cette protéine est notamment utilisée pour les réactions de *filling-in*, consistant en un remplissage des extrémités simple-brin en 3'. De plus, l'activité exonucléasique 3'→5' est elle aussi être éliminée en introduisant une mutation dans la séquence utilisée pour synthétiser cette enzyme, inactivant ainsi le site responsable de cette activité résiduelle.

Après l'étape de marquage, les lésions sont introduites sur les plasmides par un traitement approprié, ce qui permet de réaliser des stocks de plasmides lésés dont on peut ensuite contrôler le taux de dommages et qui serviront pour plusieurs séries d'expérimentations, assurant une meilleure reproductibilité pour ces dernières. Un degré d'endommagement équivalent pour chaque lot a été recherché.

La dernière étape de création du piège est la fixation des plasmides sur support. Nous avons choisi des billes superparamagnétiques (propriété d'inversion du magnétisme en fonction de la température que possèdent certaines petites particules ferromagnétiques). Celles-ci sont recouvertes de streptavidine. Le piège dans sa forme finale est représenté par la Figure 33. La fonctionnalisation des billes magnétiques avec l'ADN lésé se fait extemporanément, les billes

ne pouvant être congelées et la stabilité de l'ADN fixé conservé à 4°C n'ayant pas été évaluée au cours du temps. Le rapport quantité d'ADN/quantité de billes est volontairement bas, puisque nous fixons ~100 000 plasmides/bille, ce qui est 14 fois inférieur à la capacité théorique maximale (données du fabricant).

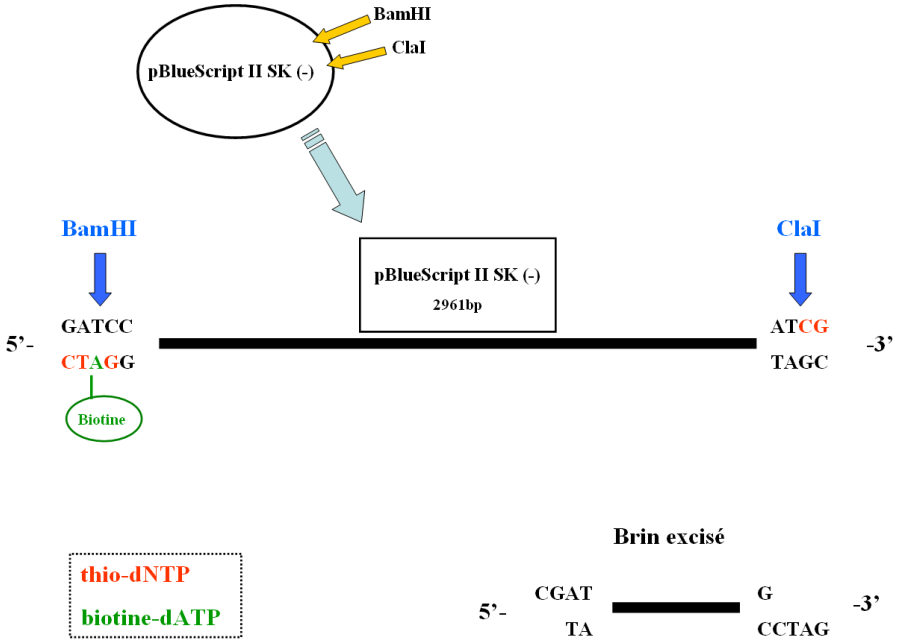


Figure 32 : Linéarisation du plasmide pBlueScript II SK (-) et insertion d'un ATP biotinylé à l'un de ses extrémités.

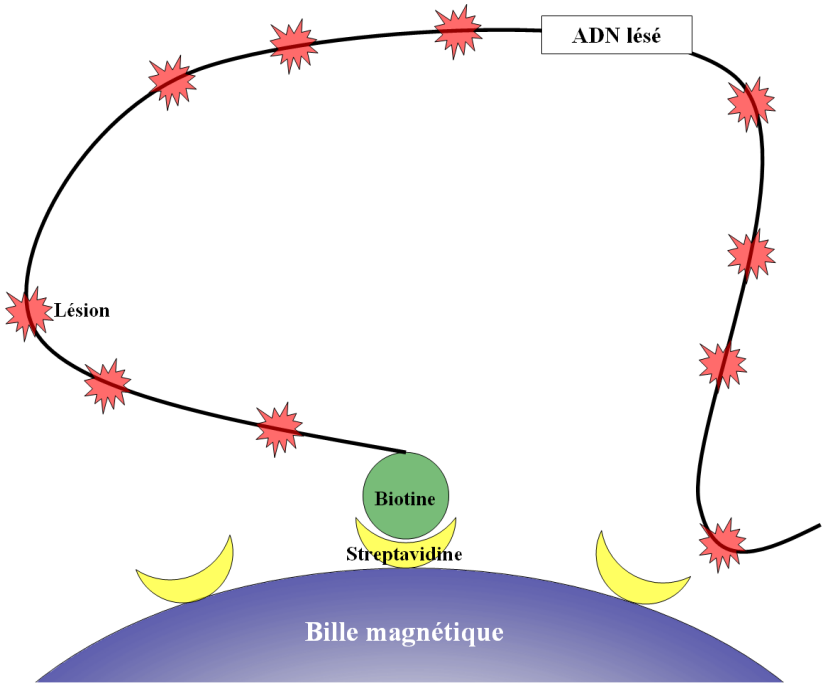


Figure 33 : Fixation de l'ADN plasmidique linéarisé biotinylé lésé sur les billes magnétiques grâce à l'interaction biotine-streptavidine.

2. Protocoles détaillés

- Production du plasmide

Le plasmide utilisé pour construire le piège est le phagemide pBlueScript II SK (-) (Stratagene Agilent Technologies), d'une longueur de 2961 paires de base. Il est produit par amplification dans *Escherichia coli* transformée (souche JM109) selon une méthode classique d'amplification. Les bactéries sont cultivées sur la nuit dans un milieu de type *Lysogeny Broth* contenant de l'ampiciline (12,5mg/L). L'ADN plasmidique est ensuite isolé à l'aide du Plasmid Purification Kit Maxi (Qiagen) puis précipité à l'aide d'un mélange isopropanol/acétate de sodium. La pelote d'ADN est rincée avec de l'éthanol (EtOH) à 70% froid, séchée, puis resuspendue dans de l'eau. Enfin, le stock d'ADN obtenu est dosé par absorbance UV à 260nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

- Linéarisation du plasmide

Chaque réaction de linéarisation contient 40µg de plasmide pBlueScript II SK (-), 20U de l'enzyme de restriction ClaI (New England Biolabs), 28U de l'enzyme de restriction BamHI (New England Biolabs), le tampon NEB Buffer 4 (concentration finale : 1X), 1% d'albumine de sérum bovin (New England Biolabs), dans un volume final de 100µl. Plusieurs échantillons sont préparés simultanément afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN (200-500µg). La digestion se fait durant 02h00 à 37°C, puis les enzymes sont inactivées par chauffage à 65°C durant 20min. L'ensemble des échantillons est rassemblé puis congelé et lyophilisé à sec. L'échantillon unique est enfin repris dans un volume d'eau permettant d'obtenir une solution à 1µg/µl de plasmide. La solution ainsi obtenue est filtrée afin d'éliminer le fragment de 33pb généré par la restriction enzymatique. La filtration s'effectue sur des colonnes Quick Spin G-50 sephadex (Roche) selon le protocole du fabricant. La charge maximale de chaque colonne est 100µl d'une solution à 1µg/µl, et leur seuil de rétention est 72 pb. L'éluat issu de la filtration et contenant l'ADN purifié est enfin précipité afin d'éliminer toute trace résiduelle de contaminants. Cette précipitation est réalisée par ajout d'un volume d'isopropanol froid et 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M (Sigma Aldrich). Après homogénéisation, l'échantillon est centrifugé à 15 000g durant 30min à 4°C, puis le surnageant et la pelote d'ADN rincée par ajout de 200µl d'éthanol à 70% froid puis centrifugation à 5 000g durant 10min à 4°C. Ce rinçage est répété une fois avant de sécher la pelote puis la dissoudre dans 200µl d'eau. La solution de plasmide linéarisé est finalement dosée au NanoDrop 1000 (Abs 260nm).

La présence du plasmide sous sa forme linéaire est vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,8% TBE 0,5X de 200ng du plasmide, en utilisant le marqueur de taille 1kb ladder 500-12 000pb (Invitrogen).

- Marquage du plasmide à l'aide de dATP biotinylé

Chaque réaction de biotinylation contient 20µg de plasmide pBlueScript II SK (-) linéarisé, 20U du fragment de Klenow (New England Biolabs), le tampon NEB Klenow (concentration finale : 1X), le dATP couplé à la biotine (biotin-14-dATP, Invitrogen) à 44,4µM final, les trois autres désoxynucléotides thiolés (kit 2'-Deoxynucleoside Alpha-Thiol Nucleotide, Trilink biotechnologies) à 300µM final, dans un volume de 90µl. Le marquage se fait durant 02h00 à 37°C, puis l'enzyme est inactivée par chauffage à 65°C durant 20min. L'ADN biotinylé est enfin précipité de la même façon que lors de l'étape de linéarisation afin d'éliminer les désoxynucléotides libres, dosé et vérifié par migration sur gel d'agarose comme précédemment décrit.

- Introduction des lésions platinées

Le protocole d'introduction des lésions sur les plasmides a subi plusieurs adaptations. Les premiers essais de platination de l'ADN faisaient appel à une exposition de plasmides après fixation sur les billes magnétiques, à une concentration de 33µM de cisplatine (poudre lyophilisée diluée à 15mg/ml dans le DMSO, Sigma) durant 02h00 à 37°C à l'abri de la lumière et sous forte agitation (1 100rpm). Nous avons ensuite décidé de préparer des lots de plasmides lésés en adoptant une méthode sans DMSO suite aux difficultés commentées dans la partie Résultats. Les conditions optimales de platination ont été déterminées à partir de cinétique de platination utilisant les trois dérivés du platine : cisplatine (solution saline injectable ; Bayer Pharma), oxaliplatine (Eloxatine®, Sanofi-Synthélabo), JM118 (poudre lyophilisée diluée dans un mélange 50% eau/50% EtOH, conservée à -20°C durant 7 jours maximum ; Agennix GPC Biotech).

Le plasmide circulaire (20µg) a été exposé à des concentrations croissantes (33, 66, 132, 264, 532µM) d'agent platiné dans un volume final de 50µl, durant 02h00, 04h00 ou 06h00 à 37°C sous agitation légère (300rpm) et à l'abri de la lumière. Chaque échantillon a été préparé en duplicat, et a ensuit subi une étape de digestion totale afin dobtenir un mélange d'adduits et de désoxynucléosides normaux. Le taux d'adduits (lésions majoritaires du cisplatine 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) et leurs équivalents pour les deux autres agents platinés) dans chaque échantillon a ensuite été déterminé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM). Une section propre à l'ensemble de la procédure de dosage des lésions sera incluse dans la cinquième partie de ce chapitre. Nous avons ainsi standardisé notre méthode d'introduction de lésions pour la production de 100µg d'ADN lésé par lot, avec les concentrations et temps suivants :

- 67µM cisplatine pendant 02h00 ;
- 200µM oxaliplatine pendant 04h00 ;
- 67µM JM118 pendant 02h00.

Le volume réactionnel final est de 500µl et la réaction se fait à 37°C sous agitation légère et à l'abri de la lumière. L'ADN est ensuite précipité comme décrit précédemment afin d'éliminer le platine, dissous dans de l'eau, dosé (NanoDrop 1000), vérifié par migration sur gel d'agarose et conservé à -20°C.

- Fixation des sondes sur les billes

Le type de billes retenues pour la construction du piège a fait l'objet d'une sélection. Nous avons évalué plusieurs marques de billes, vérifiant la fixation des plasmides ainsi que l'éventuelle influence de la nature du polymère composant les billes sur la fixation non spécifique de protéines. Les trois modèles de billes testés sont :

- les billes Dynabeads® (Dynal-Invitrogen), à la surface hydrophobe susceptible de favoriser la fixation de nombreuses protéines mais fournies avec un tampon indiqué pour la fixation de longs fragments d'ADN tels que les plasmides ;
- les billes M-PVA (Chemagen), hydrophiles du fait de leur composition (alcool de polyvinyl), et vendues avec un argument commercial attirant : les interactions non spécifiques seraient défavorisées par la nature de leur surface, et il serait de plus possible de fixer une plus grande quantité d'ADN biotinylé par mg de billes en comparaison des Dynabeads® ;
- les billes Magprep® (Novagen), faites de polystyrol, possèdent des propriétés similaires aux billes M-PVA.

Nous avons estimé la quantité de protéines liées de façon non spécifique sur les billes magnétiques (quantité identique de chaque référence, en µg) à l'aide d'une coloration au nitrate d'argent, après migration sur gel SDS PAGE d'échantillons de protéines récupérés à l'aide du tampon d'un tampon dénaturant suite à l'exposition à des extraits nucléaires (conditions identiques à celles du *ligand fishing* ; voir les protocoles concernés plus bas). Ceci nous a permis d'observer qu'une quantité équivalente de protéines se liait de façon aspécifique à ces trois modèles de billes. Nous avons donc retenu les Dynabeads®, tant pour des questions d'antériorité (utilisées dans de nombreuses publications) que d'efficacité de ce modèle. Leur solution de conservation contient 0,1% BSA. Nous avons également tenté de saturer la surface des billes à l'aide de la BSA afin de diminuer la fixation non spécifique des billes lors de l'interaction. Cependant, nous avons conclu que la quantité maximale de protéine de blocage jusqu'à laquelle la fixation des plasmides n'est pas inhibée (0,5% BSA) n'apporte pas d'avantage particulier par rapport à la quantité de BSA déjà présente dans le tampon de conservation de ces billes (0,1% BSA), et avons donc abandonné cette idée.

Le rapport quantité d'ADN/quantité de billes magnétiques est fixé à 10µg d'ADN biotinylé lésé ou non (5,2pmol) pour 500µg (50µl) de la solution de billes magnétiques Dynabeads® kilobaseBINDER (Dynal-Invitrogen). Ce volume de la solution de bille est prélevé et incubé durant 3min sur un portoir magnétique dédié (Dynal-Invitrogen) afin de culotter les billes sur la paroi du tube. Le surnageant (solution de conservation des billes) est éliminé, puis

les billes sont équilibrées dans 200µL de solution de fixation (binding solution), incubées 3min sur le portoir magnétique, et le surnageant éliminé. À nouveau 200µl de binding solution sont ajoutés, puis le plasmide pBlueScript II SK (-) biotinylé et lésé ou non. La fixation se fait durant 03h00 à température ambiante et sous forte agitation car les billes sédimentent aisément (une agitation sur vortex est effectuée toutes les 15min afin de remettre en solution les billes restées collées sur les parois du tube). Enfin, les billes sont lavées deux fois avec 200µl de solution de lavage (*washing solution*, 2M NaCl) puis deux fois avec 200µl d'eau pour éliminer les traces de sel. Les billes fonctionnalisées sont conservées dans de l'eau pour quelques heures, ou directement équilibrées dans le tampon A de *ligand fishing* (voir section concernée) si cette procédure suit immédiatement la fixation. Un contrôle de la fixation effective de l'ADN est effectué par dépôt des différentes solutions d'incubation et de rinçage sur un gel d'agarose. Un gel typique est visible dans la partie « Annexes » de ce travail.

- *Ligand fishing*

Plusieurs tampons, sélectionnés dans la littérature et utilisés pour des approches très similaires à la nôtre (ADN fixé sur billes magnétiques puis exposé à des protéines isolées/extraits cellulaires) ont été évalués pour déterminer les conditions les plus favorables à l'interaction entre les protéines nucléaires et les adduits du platine. Leurs compositions respectives sont indiquées dans le Tableau 5.

Seul le tampon A a permis la capture de protéines choisies, et c'est donc celui qui a été sélectionné. Sa composition a cependant été modifiée par un ajout de KCl, afin de disposer d'un tampon également adaptable aux expériences de SPRi, décrites dans la quatrième partie de ce travail.

Les échantillons de protéines isolées à l'aide des sondes platinées étaient destinés à une identification par immunodétection (protéines choisies) ou par CLHP-SM/SM (identification globale de la population de protéines présentes). Les protocoles ont été adaptés en fonction de ces destinations.

Pour l'identification par immunodétection, les billes fonctionnalisées avec l'ADN plasmidique non lésé ou lésé sont équilibrées par deux rinçages avec le tampon A 2X (80mM Hepes-KOH pH7,8 100mM KCl 10mM $MgCl_2$ 1mM dithiothréitol (DTT)) puis la concentration est ajustée avec le tampon A 2X à 0,2µg d'ADN ou 10µg de billes par µl.

Chaque réaction de *ligand fishing* est préparée dans un volume final de 100µl contenu dans des tubes LoBind (Eppendorf) afin de minimiser la perte de protéines par fixation aspécifique sur les parois. Un échantillon reçoit 1,2µg d'ADN fixé, 120µg de compétiteur non spécifique (ADN de sperme de hareng et morue, Roche), du tampon A 2X (concentration finales : 40mM Hepes-KOH pH7,8 50mM KCl 5mM $MgCl_2$ 0,5mM DTT) et 100µg d'extraits nucléaires HeLa. L'incubation de chaque échantillon se fait durant 45min à 37°C sous forte agitation, afin d'éviter la sédimentation des billes.

Nom du tampon (référence)	**A** (Gérard *et al.*, 2006)	**B** (Panov *et al.*, 2006)	**C** (Communication d'Eric Rassart, Université du Québec à Montréal)	**D** (Riedl *et al.*, 2003)	**E** (Guggenheim *et al.*, 2008)
Protéines notables retenues et description de la sonde	Assemblage du nucléosome (sur ADN lésé UVC)	Activation de la transcription des ARN ribosomaux par hUBF	Kif4, PARP-1, Apex-1, Bub3 sur le promoteur de l'apolipoprotéine D	XPC, TFIIH, XPA, RPA, XPG, XPF sur l'adduit 1,3-d(GpG)-cisplatine	HMGB1, HMGB2, hUBF, DDB1, Ku70, PARP-1, Msh2, etc. sur des dérivés photactivables des adduits du cisplatine
Composition	40mM Hepes-KOH pH7,8 5mM $MgCl_2$ 0,5mM DTT (composition simplifiée)	50mM Tris-HCl pH7,9 50mM KCl 12,5mM $MgCl_2$ 1 mM EDTA 1mM métabisulfite de sodium 1mM DTT 10% glycérol 0,015% NP-40 inhibiteurs de protéases	10mM HEPES-KOH pH7,9 25mM KCl 25mM NaCl 500µM EDTA 1mM DTT 1% ficoll 4% glycérol	50mM HEPES-KOH pH7,6 20mM Tris-HCl pH 7,6 2,5mM $MgCl_2$ 0,5mM EDTA 5% glycérol 500µM DTT	10mM Tris-HCL pH7,5 50mM KCl 10mM $MgCl_2$ 1mM EDTA 0,05% NP-40 0,2µg/ml BSA

Tableau 5 : Composition des différents tampons d'interaction évalués par la méthode de *ligand fishing* (concentrations finales). C'est le tampon A, optimisé pour l'assemblage de nucléosomes sur de l'ADN irradié par les UVC, qui a permis la capture de protéines choisies (HMGB1 et hUBF) et a donc été sélectionné pour établir notre protocole de *ligand fishing*.

Les extraits nucléaires HeLa utilisés sont commercialisés par la firme CILBiotech. Ils sont préparés selon une méthode adaptée de Dignam (Dignam *et al*., 1983). Après réception, les extraits (10mg protéines totales/ml) sont aliquotés et conservés à -80°C. Tout aliquot décongelé afin de prélever une partie de l'extrait n'est pas réutilisé afin de ne pas utiliser de protéine potentiellement altérée.

Le surnageant est ensuite éliminé par une incubation de 3min sur le portoir magnétique, puis le système est rincé deux fois à l'aide de 100µl d'un tampon de stringence variable (plus stringent : 150mM NaCl 20mM Hepes-KOH pH7,8 5mM $MgCl_2$ 0.025% Nonidet-P-40 ; moins stringent : 50mM NaCl 20mM Hepes-KOH pH7,8 5mM $MgCl_2$ 0.025% Nonidet-P-40).

Deux méthodes de relargage des protéines retenues par les sondes ont été évaluées. Lors de la première, les protéines sont éluées par incubation durant 10min à 90°C dans 20µl d'un tampon dénaturant de type Laemmli commercial (Bio-Rad, Californie, USA) supplémenté en β-mercaptoéthanol (2,5% final), et les billes éliminées. Les échantillons sont alors prêts à être déposés sur gel. La seconde méthode utilise une endonucléase pour dégrader les sondes plasmidiques. Dans ce cas, le système est repris dans 90µl d'eau auxquels sont ajoutés 10µl (2U) de nucléase P1 (*Penicilium citrinum*, Sigma) dans son tampon 10X (concentrations finales : 30mM NH4-OAc 0,1mM $ZnSO_4$). L'échantillon est incubé durant 02h00 à 37°C sous agitation, puis le surnageant est prélevé, congelé et lyophilisé avant d'être repris dans 20µl de tampon Laemmli. Après dénaturation par chauffage, les protéines sont prêtes à être déposées sur gel. Alternativement, la DNase I a été testée avec le même objectif. Dans ce cas, le système a été repris dans 87,5µl d'eau auxquels ont été ajoutés 2,5µl (5U) de DNase I (New England

Biolabs) et 10µl de tampon DNase I. L'incubation a duré 02h00 à 37°C sous agitation, le surnageant prélevé puis congelé et lyophilisé avant d'être traité comme précédemment.

La préparation d'échantillons destinés aux analyses protéomiques a suivi un protocole similaire, avec les variations suivantes : l'échantillon représentatif de chaque condition est constitué de la réunion de trois échantillons identiques préparés simultanément selon la méthode décrite ci-dessus afin d'augmenter la quantité de protéines ; l'élution par tampon dénaturant est réalisée à l'aide d'un tampon de type Laemmli (concentrations finales : 25mM Tris-HCl pH6,8 2% sodium-dodécyl-sulfate 4% glycérol 5% β-mercaptoéthanol 0,0008% bleu de bromophénol) préparé au Laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP) ; l'élution par utilisation d'une nucléase suit le même protocole que précédemment décrit, les protéines étant finalement dénaturées à l'aide du tampon de type Laemmli préparé au LEDyP.

B) Analyse des protéines

1. Coloration au nitrate d'argent

Après migration SDS PAGE comme décrit précédemment, les protéines isolées après *ligand fishing* ou simple exposition de billes magnétiques aux extraits nucléaires (dans les conditions identiques au *ligand fishing*, sans ADN fixé) ont également subi une coloration totale au nitrate d'argent afin d'évaluer la complexité des échantillons. Le kit PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare) a été utilisé en suivant l'ensemble des préconisations du protocole du fabricant.

2. Immunodétection (*Western blotting*)

Les gels de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide 29:1, Euromedex) possèdent une partie de concentration (4,25% acrylamide/bisacrylamide 125mM Tris-HCl pH6,8 0,2% SDS), et une partie de migration (10% acrylamide/bisacrylamide 375mM Tris-HCl pH8,8 0,1% SDS) (méthode *SDS polyacrylamid gelelectrophoresis*, SDS-PAGE). La polymérisation s'effectue en ajoutant 0,1% de persulfate d'ammonium (Sigma) et 0,1% TEMED (Euromedex). Les gels sont coulés à l'aide du système Mini PROTEAN (Bio Rad).

Les échantillons protéiques (20µl) sont déposés sur le gel. Dans le but de normaliser ces dépôts (afin d'effectuer des comparaisons quantitatives lors de l'immunodétection), des essais de dosage de protéines ont été effectués selon deux méthodes : absorbance UV à 280nm sur NanoDrop 1000 (après élution dans un tampon dénaturant) et µBC (après élution avec le tampon dénaturant ou l'aide d'une nucléase, voir protocole plus bas ; le protocole de µBC sera décrit dans la section Matériels et Méthodes de la cinquième partie de ce travail). L'une et l'autre de ces méthodes ont produit des résultats variables et donc peu fiables, car se trouvant aux limites inférieures de détection respectives. Il a été possible d'estimer à quelques dizaines de µg la quantité totale de protéines récupérées par l'élution totale dans chaque échantillon,

mais du fait de l'imprécision des mesures nous avons décidé de ne pas normaliser les dépôts de protéines sur gel. Par la suite, nous avons découvert la récurrence de la présence de β-actine dans les listes de résultats de protéomique, tous échantillons confondus, et décidé de l'utiliser comme contrôle de charge afin de contrôler la quantité relative des protéines d'intérêt au sein de chaque échantillon.

La migration des échantillons est réalisée à 150V dans un tampon 25mM Tris 192mM glycine 0,1% SDS. Un marqueur de taille à large échelle (20-120kDa, Euromedex) est utilisé pour déterminer la taille des bandes observées après détection. Le transfert est ensuite effectué sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C extra (Amersham) dans un tampon 25mM Tris 192mM glycine 30% méthanol, sur glace et à 100V durant 45min. La membrane est ensuite bloquée dans une solution TBS 0,5% Tween-20 5% lait lyophilisé durant 01h00, et l'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans cette même solution est réalisée sur la nuit à 4°C sous légère agitation. La membrane est ensuite rincée 3 fois 15min dans une solution TBS 0,5% Tween-20, puis l'incubation avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort est réalisée dans cette même solution durant 01h00. Après trois rinçages dans la solution de TBS 0,5% Tween-20, la membrane est partiellement séchée avant l'application de 1ml du réactif de révélation ECL Plus (GE Healthcare) durant 2min, puis un nouveau séchage de la membrane. Cette dernière est enfin emballée dans un film plastique et l'exposition se fait sur film photographique Hyperfilm ECL (Amersham), ensuite incubé dans un bain de révélateur puis de fixateur (Sigma). Les références et dilutions des anticorps utilisées sont présentées dans le Tableau 6.

Anticorps	**Dilution**	**Source (animal)**	**Fournisseur (référence)**
Anti-DDB2	1/3 000ème	Lapin	Philippe Becuwe (Université de Nancy)
Anti-HMGB1	1/2 500ème	Lapin	Abcam (18256)
Anti-UBF	1/1 000ème	Souris	Santa Cruz (13125)
Anti-XPC	1/1 000ème	Souris	Santa Cruz (74410)
Anti-TOX4	1/1 000ème	Lapin	Abcam (66651)
Anti-TERF2	1/5 000ème	Souris	Abcam (13579)
Anti-PPP1R10	1/5 000ème	Lapin	Abcam (70248)
Anti-PARP-1	1/1 000ème	Lapin	Cell Signaling (9542)
Anti-βactine	1/10 000ème	Souris	Sigma (A2228)
Anti Ig de lapin	1/20 000ème	Singe	GE Healthcare (NA934)
Anti Ig de souris	1/20 000ème	Mouton	GE Healthcare (NA931)

Tableau 6 : Références et dilutions de travail des anticorps utilisés.

3. Protéomique

- Principe général

L'identification des protéines présentes au sein d'échantillons complexes requiert aujourd'hui l'utilisation de méthodes qui vont au-delà du simple séquençage (méthode d'Edman), utilisé durant plusieurs décennies. En effet, deux paramètres sont cruciaux afin d'atteindre une nouvelle dimension d'analyse : la possibilité de réaliser de multiples identifications sur un même échantillon (haut débit), et celle de détecter des protéines présentes en très faible quantité par rapport à la population totale (large gamme dynamique). C'est dans ce but qu'ont été développés les protocoles de protéomique faisant appel à la spectrométrie de masse.

Les analyses protéomiques ont été réalisées sur la plate-forme EDyP-service du laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes (LEDyP, iRTSV, CEA Grenoble). Les échantillons sont d'abord débarrassés de toute présence résiduelle de billes magnétiques par SDS-PAGE. Ensuite, une digestion trypsique de toutes les protéines présentes est réalisée. Les peptides résultants ont été ensuite séparés par nano-CLHP (décomplexification de l'échantillon) et analysés en sortie à l'aide d'un spectromètre de masse à trappe d'ions (mesure des masses moléculaires de chaque peptide). Le couplage de la nanochromatographie (haute sensibilité et résolution chromatographique, diminution de la quantité d'échantillon nécessaire) au spectromètre de masse à trappe d'ion (haute précision de masse sur une large gamme dynamique, hautes résolution et sensibilité) permet d'obtenir une qualité d'analyse optimale.

Les données obtenues sont ensuite comparées à une base de données contenant les fragments trypsiques de milliers de protéines déjà identifiées, ce qui permet d'obtenir par cartographie peptidique (*peptide mass fingerprinting*) la liste de celles présentes dans nos échantillons. L'utilisation des contrôles appropriés (ADN non lésé fixé et billes sans ADN) permet de déterminer l'ensemble du bruit de fond que l'on va alors soustraire aux échantillons issus de l'exposition d'ADN lésé aux extraits nucléaires. La validation de l'ensemble des résultats a été facilitée par les outils bioinformatiques adaptés développés au sein du LEDyP. L'ensemble de ces étapes est résumé sur la Figure 34.

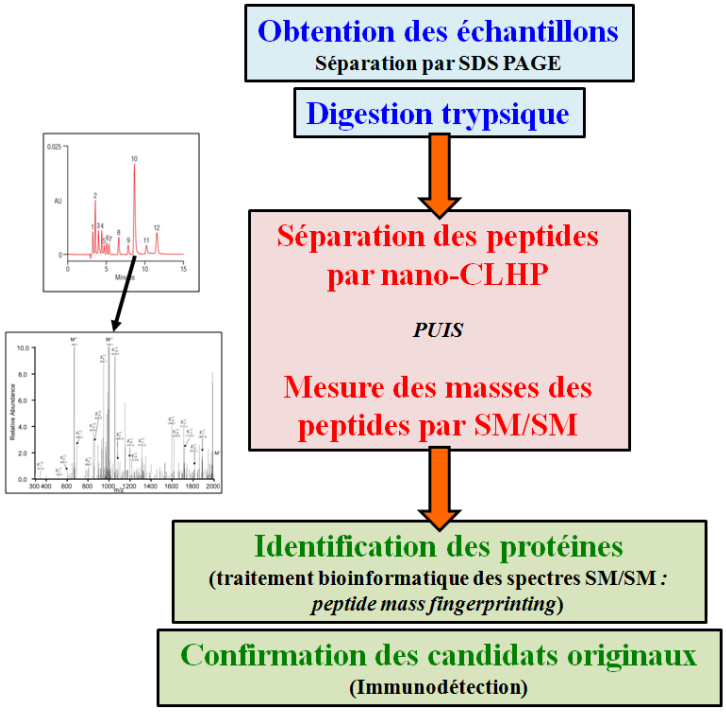


Figure 34 : Les grandes étapes de l'analyse protéomique des échantillons obtenus après piègeage des protéines par les sondes plasmidiques lésées.

- Protocole détaillé

Protocole d'analyse des échantillons protéiques – Les échantillons sont concentrés par SDS-PAGE en bande de 2mm (*stacking migration*) sur des gels précoulés NuPAGE (Invitrogen) par migration (temps < 2min) à 200V dans un tampon 50mM MES 50mM Tris 0,1% SDS 1mM EDTA. Les protéines sont ensuite fixées par un bain de 30min dans un tampon acide (7,5% acide acétique 30% EtOH) et colorées par un bain de 30min dans une solution de bleu de Coomassie (Bio-Rad). La décoloration se fait par plusieurs bains successifs dans le tampon acide. Les bandes de protéines sont ensuite manuellement excisées. La digestion des protéines et l'extraction des peptides résultants sont opérées par le robot EVO150 (Tecan) selon un protocole déjà décrit (Jaquinod *et al.*, 2007).

Les peptides extraits ont été analysés par nano-CLHP sur un système Ultimate 3000 (Dionex) couplé à un spectromètre de masse en tandem LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fischer).

Identification des protéines – Après acquisition des spectres, l'identification des peptides a été réalisée à l'aide du programme Mascot (Matrix Science). Celui-ci assigne un score probabilistique inversement corrélé à la probabilité que l'identification d'un peptide résulte d'un événement aléatoire, et la base de données Uniprot (compilation des données des bases Swiss-Prot, TrEMBL et PIR) sélectionnée pour l'espèce *Homo sapiens* comme décrit précédemment (Bernay *et al.*, 2009). Les modifications autorisées sur les peptides sont : acétylation du N-terminus ou présence d'un pyroglutamate, amidation du C-terminus,

oxydation et dioxydation des méthionines. La précision de masse est fixée à 2ppm et 0,8Da. Les protéines identifiées avec deux peptides et un score ≥ 70 ont été validées à l'aide du logiciel IRMa, notamment en identifiant les protéines partageant des ensembles communs de peptides (Dupierris *et al.*, 2009). Afin de renforcer la fiabilité des résultats, seules les protéines identifiées lors de deux expériences indépendantes ont été conservées pour l'établissement de l'interactome, mais les résultats d'analyses supplémentaires seront aussi présentés.

L'attribution de fonctions biologiques aux groupes de protéines a été effectuée à l'aide de la base Generic Gene Ontology Term Mapper (fichier goa_human Generic GO slim, humain, version 14 juillet 2010) accessible sur le site de l'Université de Princeton (url : http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermMapper/).

B) Quantification des lésions de l'ADN

1. Principe général

La CLHP-SM/SM est utilisée pour contrôler les taux de lésions générés sur les sondes plasmidiques. Ce type d'approche permet d'une part de discriminer les lésions présentes sur l'ADN analysé grâce aux temps de rétention ainsi qu'aux masses précisément déterminées. Elle permet d'autre part de les quantifier avec précision en comparant les signaux expérimentaux avec ceux produits par des solutions calibrées. Dans des conditions optimales d'analyse, il est possible de mesurer la présence d'un adduit pour un million de nucléosides normaux.

L'analyse CLHP-SM/SM se décompose en trois grandes étapes, représentées par la Figure 35 : la digestion de l'ADN qui permet de récupérer les nucléosides normaux et les dinucléotides lésés ; une séparation chromatographique du mélange d'adduits et de nucléosides normaux injectés. Les désoxynucléosides normaux sont mesurés par l'intermédiaire d'un détecteur UV, et les lésions par spectrométrie de masse en tandem.

Le principe de la spectrométrie de masse utilisé ici est le suivant : une source d'électronébulisation pulvérise l'échantillon et ionise les molécules qu'il contient. Ces ions pénètrent ensuite dans la chambre d'analyse. Nous disposons d'un analyseur quadripolaire qui fait office de filtre à ions par l'application d'un champ électromagnétique oscillant et autorise la sélection d'un ion parent selon son rapport masse/charge (m/z). Contrairement aux autres ions, qui vont entrer en contact avec l'une des électrodes du quadripôle, l'ion d'intérêt conserve une trajectoire stable au sein de l'analyseur et atteindra donc le détecteur. Dans un second temps, pour un spectromètre de masse en tandem tel que le nôtre, un deuxième quadripôle situé immédiatement après le premier concentre les ions au centre d'une chambre où ceux-ci vont être fragmentés par collision avec un gaz. Un troisième quadripôle, situé en aval, autorise la sélection d'ions fils (transitions) générés par cette fragmentation de l'ion parent de la même façon qu'est opérée la première sélection. La Figure 36 montre le trajet d'un ion sélectionné à travers un unique quadripôle. Ainsi, il est possible de confirmer l'identité de l'ion parent par

identification de fragments constituant sa « signature », et d'améliorer la mesure en termes de spécificité et de sensibilité.

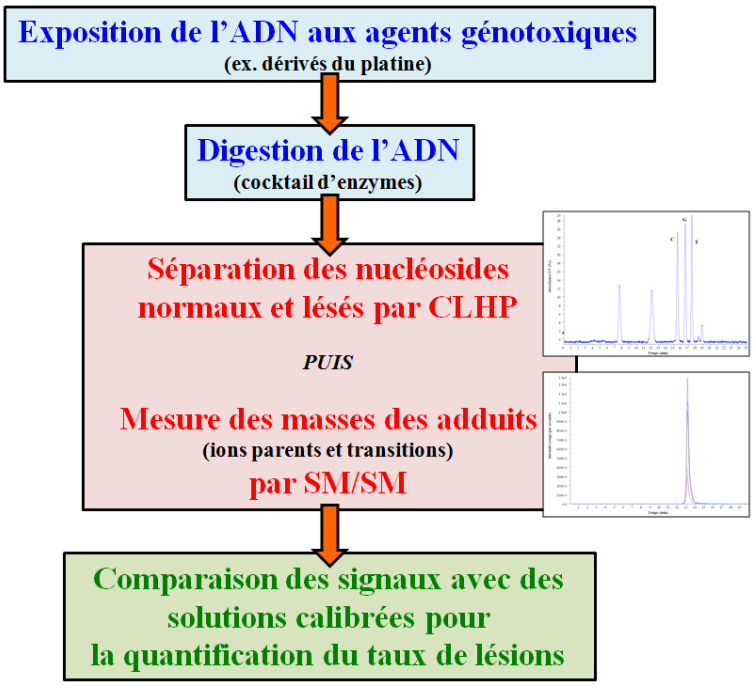


Figure 35 : Les étapes principales de la procédure de dosage de lésions dans l'ADN.

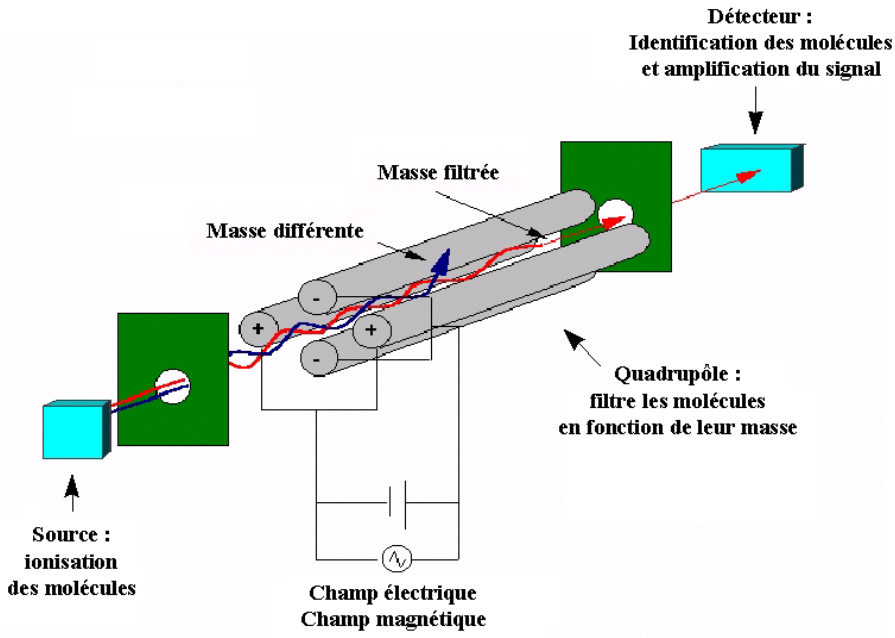


Figure 36 : Représentation schématique d'un unique quadripôle permettant la sélection de molécules selon leur rapport m/z. L'ion sélectionné conserve une trajectoire stable au sein du champ électromagnétique généré par les électrodes du quadripôle (trajet en rouge) alors que les ions non désirés sont déviés et éliminés (trajet en bleu).

Afin de doser les lésions par cette méthode, il est nécessaire de disposer de solutions calibrées (standards de concentration connue) de ces dommages. Souhaitant mettre au point un piège qui réunit théoriquement l'ensemble du spectre d'adduits qu'il est possible de générer, nous avons choisi de doser les deux lésions majoritaires, adduits de type 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) du cisplatine et leurs équivalents pour l'oxaliplatine et le JM118, afin de caractériser notre piège et de déterminer si les proportions de lésions déjà publiées sont effectivement retrouvées sur celui-ci.

Dans notre cas, la synthèse de standards se fait par une simple exposition du dinucléoside monophosphate d(GpG) ou d(ApG) à un excès de dérivé platiné. La purification du produit a été effectuée par CLHP, procédure au cours de laquelle il a été possible de collecter la ou les fractions correspondant au standard recherché. Ensuite, une vérification par CLHP-SM/SM de la masse de chacun des produits ainsi que des transitions générées après collision a été effectuée, confirmant l'identité des produits et définissant une méthode d'analyse pour chacune des lésions recherchées. Enfin, les échantillons à doser sont analysés à partir de la méthode désirée, au cours de laquelle la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est mesurée par absorbance UV alors que les bases pontées sont détectées par le spectromètre de masse. Les signaux sont quantifiés par comparaison avec les solutions calibrées, ce qui permet d'obtenir un rapport lésions/nucléosides normaux représentatif du taux de dommages présents dans chaque échantillon.

2. Protocole détaillé

- Préparation des standards de lésions platinées

L'acétonitrile (ACN, Sigma Aldrich), le méthanol (Carlo Erba), et l'acétate de triéthylamine (TEAA, Sigma) utilisés lors des procédures dont la description suit sont de qualité analytique.

Les solutions calibrées d'adduits du platine sont préparées en exposant 100nmol du dinucléotide d(GpG) ou d(ApG) à 240nmol de l'agent anticancéreux dans un volume final de 500µl durant 24h00 à 37°C à l'abri de la lumière et sous légère agitation. Après mise en condition initiale (10mM TEAA) de l'échantillon, chaque adduit est purifié sur une colonne Clarity 5µm oligo-RP 250 x 4,6mm (Phenomenex) à l'aide du gradient chromatographique dont les étapes sont résumées dans le Tableau 7, sur un système CLHP Agilent 1100 (Agilent Technologies) utilisant une détection UV.

Temps (min)	% A (10mM TEAA)	% B (100% ACN)
0	98	2
3	98	2
45	80	20
47	10	90
49	10	90
50	98	2

Tableau 7 : Gradient utilisé pour la purification des standards de lésions platinées.

Des chromatogrammes types obtenus pour chacun des adduits sont présentés sur les Figures 37 et 38. Le pic observé à 9,7min pour l'adduit oxaliplatine correspond à la molécule d'oxaliplatine elle-même.

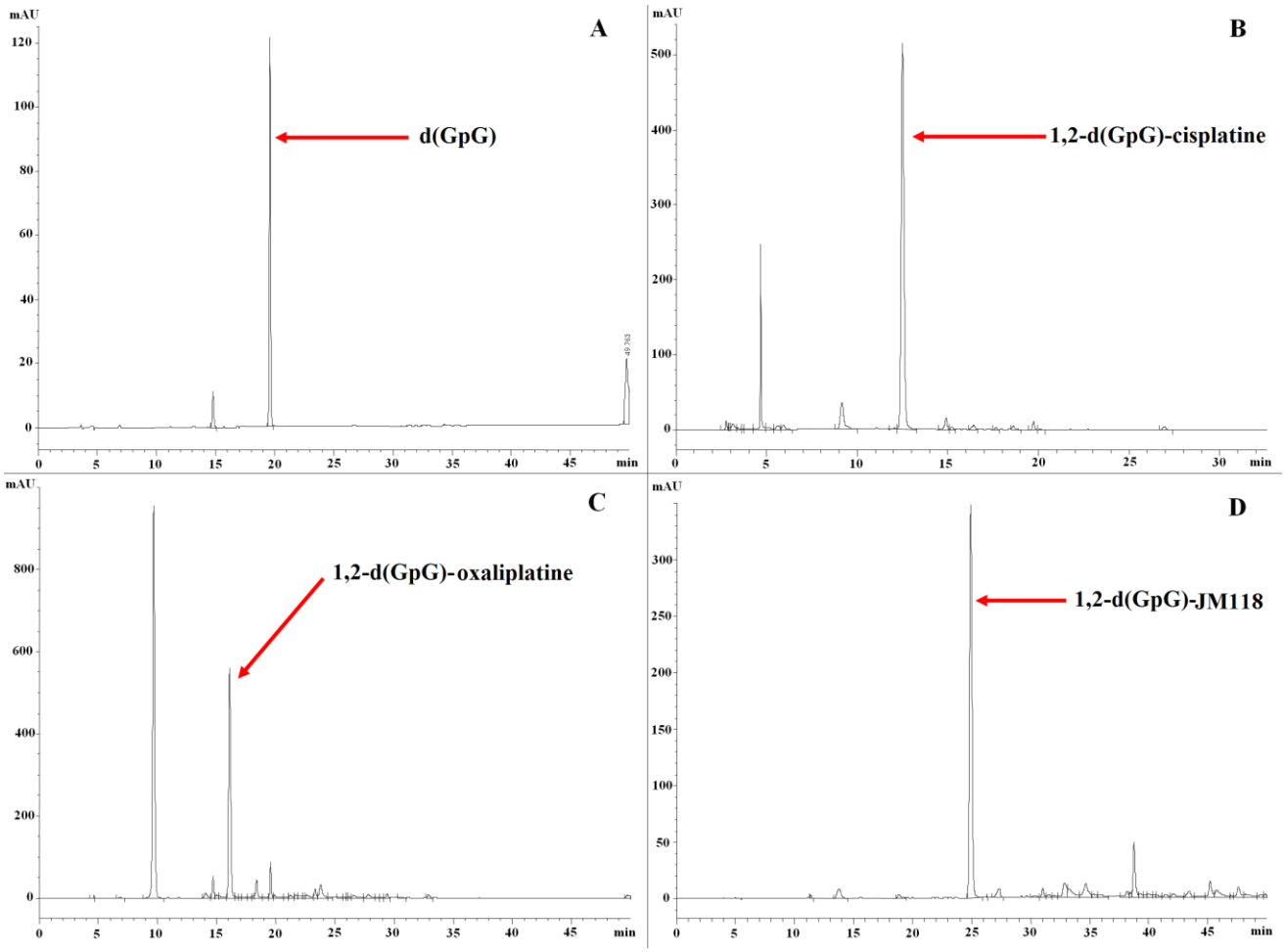


Figure 37 : Profils chromatographiques des adduits 1,2-d(GpG) : sans lésion (A) ; cisplatine (B) ; oxaliplatine (C) ; JM118 (D).

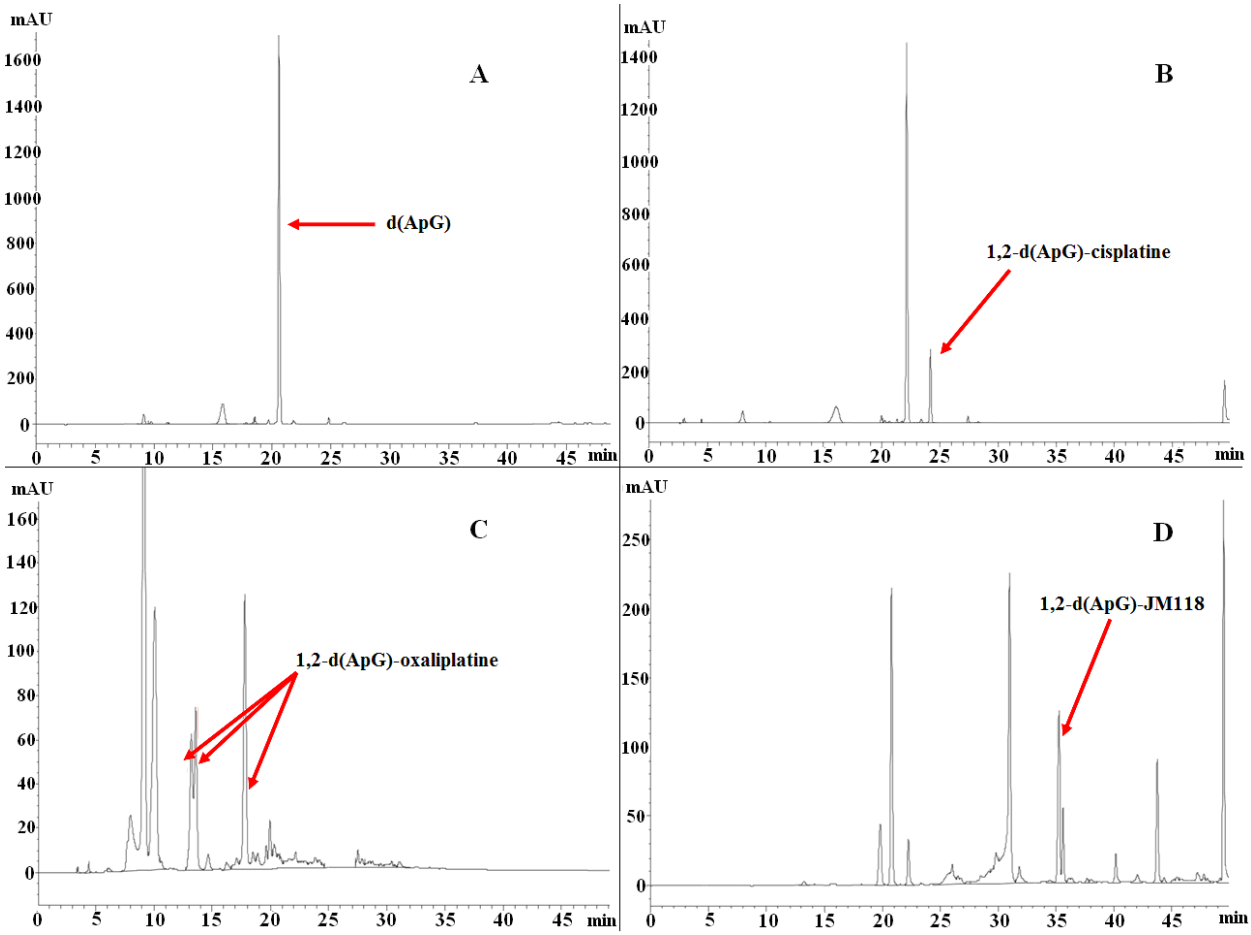


Figure 38 : Profils chromatographiques des adduits 1,2-d(ApG) : sans lésion (A) ; cisplatine (B) ; oxaliplatine (C) ; JM118 (D).

Pour l'adduit 1,2-d(GpG)-platine, une fraction unique a été récoltée après la première étape de purification, et ce pour les trois dérivés. Remarquons cependant que lors du contrôle de cette lésion pour le JM118 par CLHP-SM/SM en utilisant un gradient isocratique 80% A (TEAA 2mM) et 20% B (méthanol), il s'est avéré que la solution produisait deux pics qui ne sont pas résolus lors de l'étape de purification décrite précédemment, et dont les molécules possèdent la même masse. Ces deux molécules représentent très certainement les deux isomères qu'il est possible de synthétiser avec le JM118, molécule chirale (Hartwig & Lippard, 1992). Notre solution standard d'adduit comprend donc les deux formes. Ayant observé qu'elles produisaient des fragmentations similaires pour une même énergie de collision, nous n'avons pas cherché à les séparer et avons utilisé notre solution standard d'adduit telle quelle.

La synthèse des dinucléotides 1,2-d(ApG)-platine, en revanche, s'est avérée plus complexe. On constate en effet sur la Figure 38 la présence de plusieurs pics pour chaque synthèse. Un contrôle des masses des molécules représentées par chacun de ces pics a été effectué par spectrométrie de masse sur la plate-forme d'analyse de molécules du SCIB (Colette Lebrun), permettant de sélectionner les adduits désirés. Il s'agit généralement de l'un des pics minoritaires, dénotant une plus faible efficacité de réaction que dans le cas de l'adduit 1,2-d(GpG). Pour l'adduit 1,2-d(ApG)-oxaliplatine, les pics à t ≈ 13,2 et 13,6min ne se

trouvaient pas systématiquement séparés à chaque analyse, et contenaient tous deux une molécule correspondant à la masse attendue. Une seconde molécule de même masse, observée à t ≈ 17,8min, correspond elle-aussi à l'adduit, et c'est cette dernière qui a été retenue pour la quantification des adduits car son temps de rétention en condition de dosage des adduits correspond parfaitement à celui observé pour l'adduit issu de l'ADN plasmidique exposé à l'oxaliplatine. La différence avec l'adduit à t ≈ 13,5min n'a pu être déterminée (l'oxaliplatine ne produit pas d'isomères, contrairement au JM118).

- Préparation de l'ADN pour le dosage des lésions

L'hydrolyse de L'ADN plasmidique suit un protocole en deux temps, afin d'obtenir un mélange de nucléosides normaux et de nucléosides portant les lésions. Au cours de la première de ces étapes, les échantillons d'ADN reçoivent 0,5U unités de nucléase P1, 2,5U de DNase II et 0,025U de phosphodiesterase II (Sigma), ainsi que 2,5µl de tampon MSNPDE 10X (concentrations finales : 200mM acide succinique 100mM $CaCl_2$, pH6). La digestion est opérée à 37°C durant 02h00. Pour la seconde étape, 0,015U de phosphodiesterase I, 2U de phosphatase alcaline et 6µl de tampon Palk 10X (concentrations finales 50mM Tris 1mM EDTA, pH8) sont ajoutés aux échantillons, et ceux-ci sont incubés durant 02h00 à 37°C. À l'issue, la solution de nucléosides est neutralisée par ajout de 3,5µl d'HCl 0,1N. Les échantillons sont centrifugés afin de culotter l'excès d'ADN non digéré puis transférés en flacons CLHP, congelés, lyophilisés et enfin repris dans 50µl de tampon TEAA 20mM et conservés à -20°C en attente d'analyse.

- Dosage des adduits

L'identification des lésions de l'ADN est réalisée en deux temps : tout d'abord, la masse totale de l'adduit est mesurée par le spectromètre de masse ; ensuite, les ions parents retenus sont fragmentés par la machine afin de produire des transitions qui correspondent à la perte de l'un des groupements présents sur l'adduit, ce qui permet de s'assurer de l'identité de l'ion parent et améliorer la qualité du signal.

Nous utilisons un système 1100 microHPLC (Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse API 3000 (SCIEX Applied Biosystems) en mode tandem. Ce dernier possède une source d'ionisation de type électronébulisation (*electrospray*), couplée à un analyseur à triple quadripôles, positionné en mode MRM (*multiple reaction monitoring*) avec une ionisation négative. Avant d'être nébulisé, le flux provenant de la CLHP est mélangé à du méthanol arrivant à un débit de 0,1ml/min grâce à une pompe à méthanol L-6000 (Merck). L'ensemble du dispositif est sous le contrôle du logiciel Analyst (Applied Biosystems).

L'analyse est effectuée sur sur une colonne Modulo Cart QS Uptisphere 5 ODB 120 Å 5µm 150 x 2,1mm (Interchrom). Les conditions chromatographiques d'élution sont les suivantes :

- solvant A : 2mM TEAA (obtenue à partir d'un stock 200mM pH6,2 préparé au laboratoire à partir de solutions d'acide acétique et de triéthylamine (Sigma) et uniquement utilisé pour les analyses CLHP-SM/SM)
- solvant B : 100% acétonitrile (Merck)
- débit : 200µl/min
- température de la colonne : 28°C

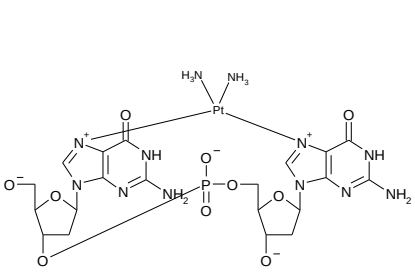
Les gradients chromatographiques utilisés pour chaque type de lésion sont présentés dans le Tableau 8.

Les structures des lésions sont présentées sur la Figure 39. Les transitions recherchées (masse et description du fragment) lors de l'analyse par spectrométrie de masse sont indiquées dans le Tableau 9. Des spectres et des chromatogrammes typiques enregistrés lors des analyses CLPH-SM/SM de chacune de ces lésions sont visibles dans la section « Annexes » située à la fin du présent volume.

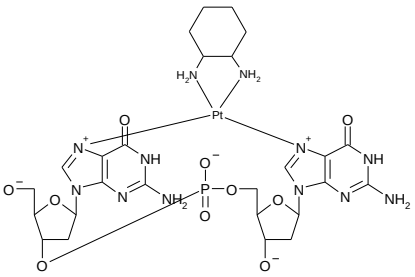
Lésion	Gradient utilisé
1,2-d(GpG)-cisplatine	de 0 à 20%B en 20min
1,2-d(ApG)-cisplatine	
1,2-d(GpG)-oxaliplatine	de 0 à 30%B en 30min
1,2-d(ApG)-oxaliplatine	
1,2-d(GpG)-JM118	de 0 à 40%B en 15min
1,2-d(ApG)-JM118	

Tableau 8 : Gradients chromatographiques utilisés pour l'analyse des lésions du platine par CLHP-SM/SM.

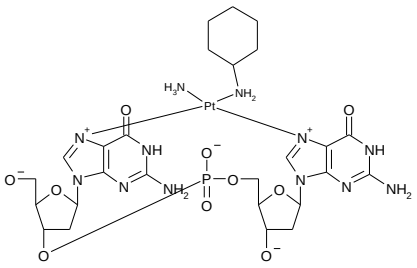
La quantification des lésions est réalisée en deux étapes grâce au logiciel Analyst. Il s'agit tout d'abord de déterminer la quantité d'ADN présente dans les échantillons en rapportant (intégration des pics observés) les signaux UV enregistrés lors de la séparation chromatographique aux signaux produits par un mélange thymidine-guanosine de concentration connue (injection de 3 concentrations au moins, en duplicat : 0,25 ; 0,5 ; 1mM). Les concentrations d'adduits sont quant à elles calculées par l'intermédiaire de solutions standards à 500nM (injectées en duplicat). Il ne reste plus qu'à rapporter les valeurs obtenues pour le nombre de lésions sur le nombre de nucléosides normaux pour obtenir le rapport [lésions/plasmide] ou [lésions/million de nucléosides normaux]. Des duplicats d'échantillons sont généralement analysés afin d'obtenir les taux de lésions.



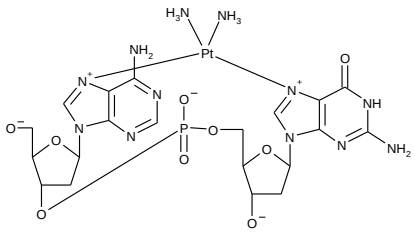
1,2-d(GpG)-Cisplatine



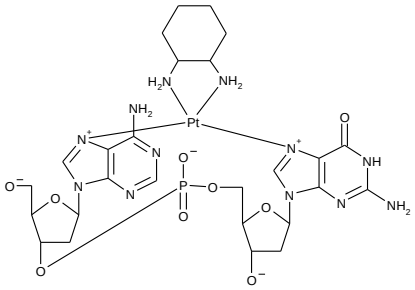
1,2-d(GpG)-Oxaliplatine



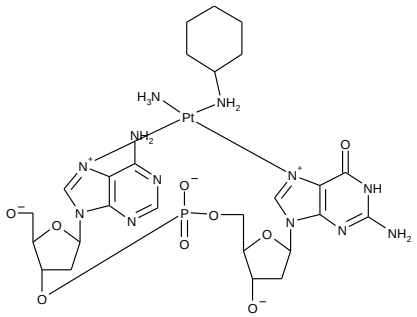
1,2-d(GpG)-JM118



1,2-d(ApG)-Cisplatine



1,2-d(ApG)-Oxaliplatine



1,2-d(ApG)-JM118

Figure 39 : Structures des dinucléosides monophosphate d(GpG) et d(ApG) pontés par chacun des dérivés considérés.

Dérivé	Adduit	Transitions	Remarque
Cisplatine	1,2-d(GpG)	821 → 804	Perte d'un substituant amine
		822 → 805	
		823 → 806	
		821 → 493	Perte d'un nucléoside entier
		822 → 494	
		823 → 495	
	1,2-d(ApG)	805 → 788	Perte d'un substituant amine
		806 → 789	
		807 → 790	
		805 → 477	Perte de l'adénosine
		806 → 478	
		807 → 479	
Oxaliplatine	1,2-d(GpG)	901 → 787	Perte du substituant DACH
		902 → 788	
		903 → 789	
		901 → 493	Perte d'une chaîne de masse moléculaire 408
		902 → 494	
		903 → 495	
	1,2-d(ApG)	885 → 771	Perte du substituant DACH
		886 → 772	
		887 → 773	
		885 → 477	Perte d'une chaîne de masse moléculaire 408
		886 → 478	
		887 → 479	
JM118	1,2-d(GpG)	904 → 887	Perte du substituant amine
		904 → 805	Perte du substituant cyclohexylamine
		904 → 788	Perte des substituants amine et cyclohexylamine
	1,2-d(ApG)	887 → 870	Perte du substituant amine
		888 → 871	
		889 → 872	
		887 → 788	Perte du substituant cyclohexylamine
		888 → 789	
		889 → 790	
		887 → 771	Perte des substituants amine et cyclohexylamine
		888 → 772	
		889 → 773	

Tableau 9 : Transitions recherchées lors de l'analyse CLHP-SM/SM des adduits du platine.

II. Résultats

A) Optimisations du système de ligand fishing

La mise au point de notre piège a demandé la prise en considération de différents aspects techniques : méthode d'introduction des lésions platinées sur l'ADN ; méthode de dosage de ces lésions ; conditions de fixation de l'ADN sur les billes magnétiques ; détermination de conditions physico-chimiques favorisant l'interaction des protéines avec les adduits du platine ; méthode de relargage des protéines capturées ; identification de celles-ci. Tous ces aspects vont être maintenant abordés lors d'un résumé des optimisations et contrôles réalisés sur le piège.

1. Préparation des sondes plasmidiques

Trois molécules ont été sélectionnées pour notre étude de l'interactome des adduits des dérivés du platine : le cisplatine, l'oxaliplatine, et le JM118, métabolite actif du satraplatine. En premier lieu, l'introduction de lésions sur les plasmides par les dérivés du platine qui nous intéressent a fait l'objet de tests portant sur la réactivité de ces derniers sur l'ADN nu afin de déterminer les conditions optimales permettant de contrôler la quantité de lésions par plasmide.

- Influence du DMSO

Les premiers essais de platination de l'ADN faisaient appel à une exposition de plasmides après fixation sur les billes magnétiques, à une concentration de 33µM cisplatine durant 02h00 à 37°C. Ce protocole utilisait une solution de cisplatine dilué dans le DMSO. Il suivait en cela une méthode couramment utilisée en laboratoire depuis plusieurs années, et notamment recommandée par le *National Cancer Institute* américain pour les études sur la toxicité du cisplatine. Cette molécule, dont la capacité de dissolution en solvant aqueux n'est pas optimale, est alors diluée dans une solution de DMSO pour utilisation sur des lignées cellulaires. Le taux de lésions 1,2-d(GpG) initialement mesuré lors de la préparation d'ADN lésé directement sur billes était de 8,7 adduits par plasmide. Bien que ce protocole ait tout de même permis de réaliser les premiers essais de capture de protéines, les taux de lésions mesurés après vieillissement de la solution cisplatine-DMSO (cinq mois) se sont avérés quasi nuls.

Or, peu après nos expériences préliminaires de *ligand fishing*, il a été démontré que le cisplatine est capable de réagir rapidement avec le DMSO pour former un composé (Figure 40) capable de pénétrer à l'intérieur de la cellule mais qui a perdu son aptitude à réagir avec l'ADN double-brin (Fischer *et al.*, 2008), réduisant considérablement la cytotoxicité du cisplatine dès avant son entrée dans la cellule. Nous avons dès lors directement utilisé des préparations thérapeutiques de cisplatine sans DMSO pour traiter notre ADN, ce qui a garanti la production d'un nombre plus élevé de lésions (30-40 adduits 1,2-d(GpG) par plasmide).

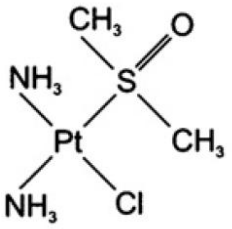


Figure 40 : Structure de l'adduit DMSO sur la molécule de cisplatine (adapté de Fischer *et al*., 2008).

- Optimisation de la concentration et de la durée d'exposition aux agents platinés

Comme il n'était pas possible de conserver durablement l'ADN fixé (impossibilité de congeler les billes), cela impliquait de réaliser la réaction de platination avant chaque test, introduisant par là une variabilité du nombre de lésions d'une expérience à l'autre. Ceci devenait d'autant plus critique que nous souhaitions introduire dans nos expériences l'oxaliplatine et le satraplatine, pour lesquels on pouvait envisager une variabilité similaire. Nous avons donc décidé de préparer des lots de plasmides lésés, ce qui permettait de disposer de quantités importantes d'ADN présentant des taux de lésions similaires, favorisant la reproductibilité de nos expériences. Ainsi, afin de contourner cet obstacle nous avons décidé de déterminer les conditions d'exposition les plus favorables à l'obtention d'une quantité prévisible et similaire d'adduits spécifiques (1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG)) pour chacun des trois agents. Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience de platination d'ADN plasmidique circulaire en utilisant cinq concentrations et trois temps d'exposition, et au cours de laquelle les deux types de lésions majoritaires ont été recherchés par CLHP-SM/SM.

Précisons que, si des méthodes de quantification des adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine et de l'oxaliplatine avaient déjà été mises au point dans notre laboratoire, il a été nécessaire de préparer des solutions calibrées et mettre au point les méthodes de dosage pour les adduits manquants, à savoir 1,2-d(GpG)-JM118 et les adduits 1,2-d(ApG) générés par chacun des trois dérivés du platine. Les résultats de ces cinétiques sont présentés sur les Figures 41, 42 et 43.

En accord avec la littérature, l'adduit 1,2-d(ApG) est généré en plus faible quantité que l'adduit 1,2-d(GpG) pour les trois agents testés. Indépendamment du temps d'exposition, des plateaux de formation des lésions sont systématiquement observables pour le cisplatine et le JM118.

Dans le cas du cisplatine, ce plateau est atteint à partir de 132µM, se situant autour de 65 adduits 1,2-d(GpG) par plasmide. Le plateau de formations des dommages 1,2-d(ApG) se situe à la même concentration au temps d'exposition long (06h00), alors qu'il est observé à plus forte concentration (264µM) pour les temps d'exposition court (02h00) et moyen (04h00).

Dans le cas du JM118, le plateau est atteint autour de 264µM pour les deux types d'adduit, et les valeurs oscillent selon les temps d'exposition entre 96-120 pontages 1,2-d(GpG) et 26-45 pontages 1,2-d(ApG).

Dans le cas de l'oxaliplatine, on observe des courbes de platination tout à fait différentes. On remarquera leur forme linéaire, qui ne suit pas du tout celles observées pour les deux autres dérivés. Aucun plateau n'est cette fois atteint.

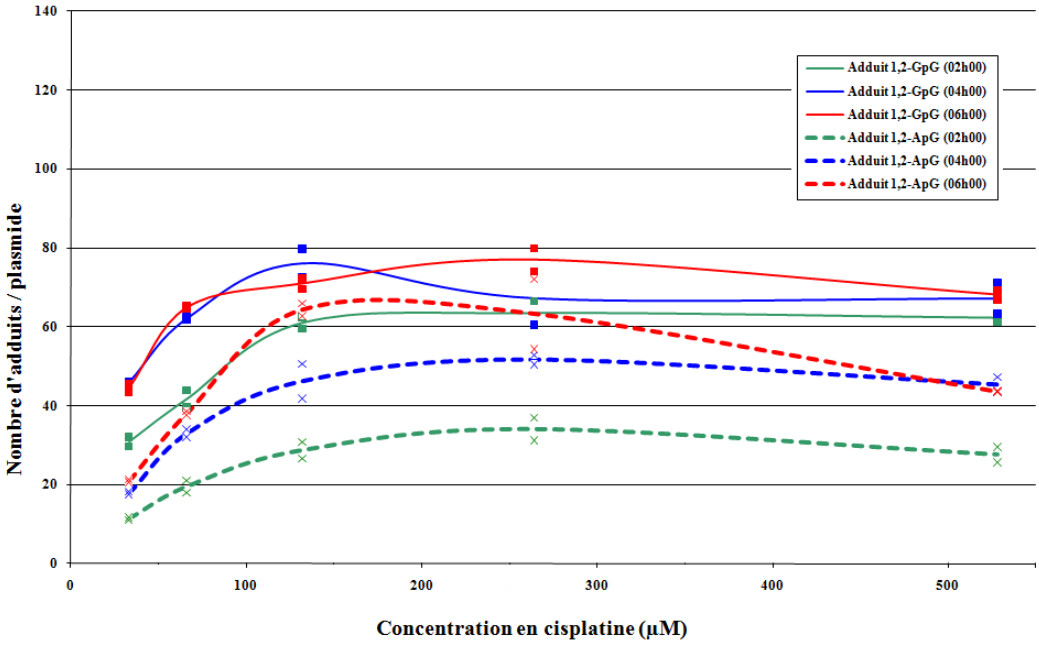


Figure 41 : Cinétique de formation des adduits majoritaires (1,2-d(GpG) et 1,2d(ApG)) du cisplatine sur plasmides non fixés (cinq concentrations et trois temps d'exposition).

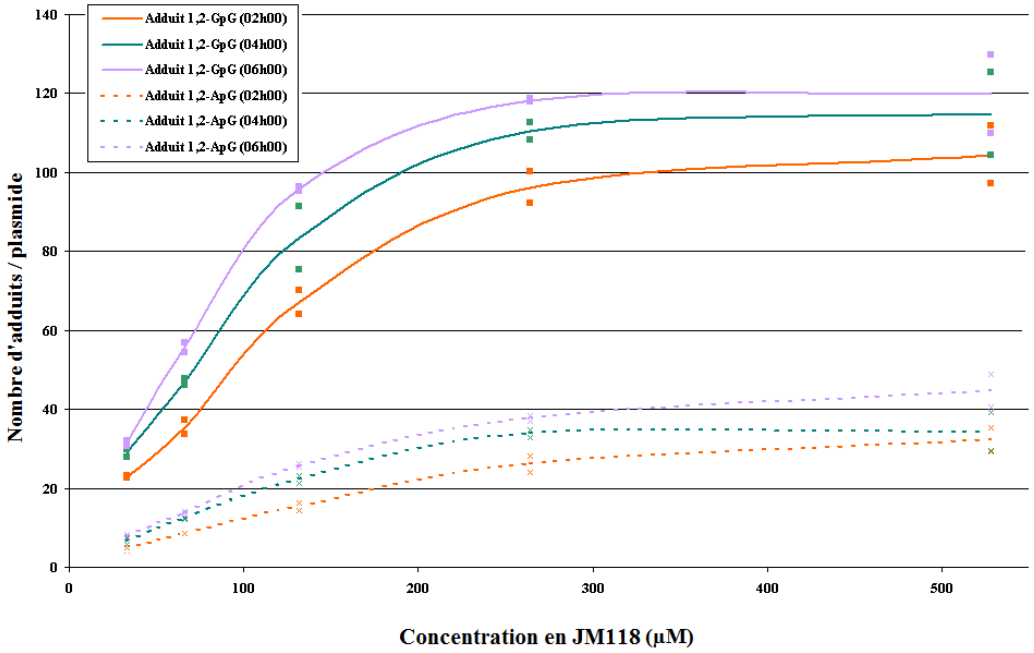


Figure 42 : Cinétique de formation des adduits majoritaires (1,2-d(GpG) et 1,2d(ApG)) du JM118 sur plasmides non fixés (cinq concentrations et trois temps d'exposition).

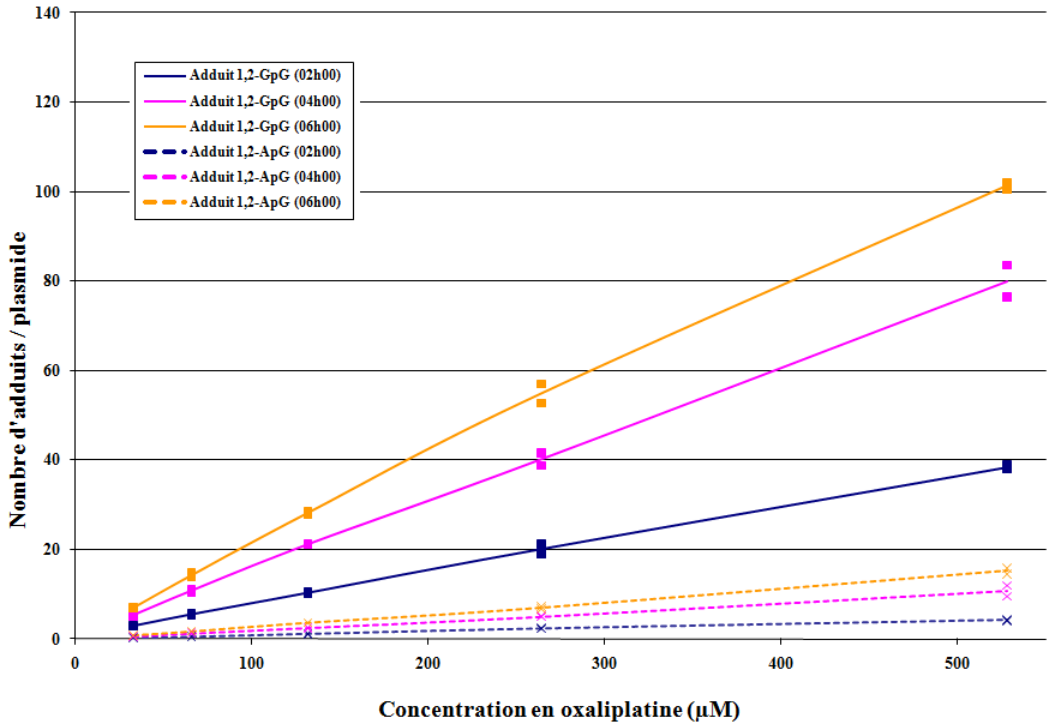


Figure 43 : Cinétique de formation des adduits majoritaires (1,2-d(GpG) et 1,2d(ApG)) de l'oxaliplatine sur plasmides non fixés (cinq concentrations et trois temps d'exposition).

Le protocole d'exposition des plasmides destinés à la construction du piège a été établi en conséquence, avec l'objectif de produire un taux homogène d'adduits 1,2-d(GpG) par plasmide. Les concentrations et temps sélectionnés en conséquence sont les suivants : cisplatine = 67µM pendant 02h00 ; oxaliplatine = 200µM pendant 04h00 ; JM118 = 67µM pendant 02h00. La proportion relative théorique des deux adduits majoritaires pour ces conditions, d'après nos cinétiques de platination, sont visibles dans le Tableau 10.

	Cisplatine		**Oxaliplatine**		**JM118**	
Type d'adduit	*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*	*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*	*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*
Pourcentage moyen de répartition	68%	32%	89%	11%	63%	37%

Tableau 10 : Pourcentage moyen relatif de la répartition des deux adduits majoritaires dans les conditions de platination retenues.

Les valeurs obtenues pour le cisplatine peuvent être mises en parallèle avec celles présentées dans le Tableau 2 de la partie introductive, qui donne pour pourcentage relatif de ces deux lésions majoritaires 72% d'adduits 1,2-d(GpG) contre 28% d'adduits 1,2-d(ApG). Ces proportions sont donc comparables à celles obtenues dans nos plasmides (68% / 32%). Dans nos conditions expérimentales, c'est le JM118 qui génère proportionnellement le plus de pontages 1,2-d(ApG) (37%) alors que l'oxaliplatine en engendre seulement 11%, soit moins

que les proportions décrites dans la partie bibliographique. Rappelons ici que ces deux adduits ne sont pas ceux produits majoritairement par l'oxaliplatine.

Le Tableau 11 présente les résultats des dosages de lésions sur les stocks de plasmides préparés, montrant que l'objectif fixé en termes de taux de lésion a pu être atteint sur tous nos lots.

		Cisplatine		**Oxaliplatine**		**JM118**	
Type d'adduit		*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*	*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*	*1,2-d(GpG)*	*1,2-d(ApG)*
Nombre de lésions / plasmide	**lot n°1**	34,6	Non mesuré	22,3	2,8	30,6	5,6
	lot n°2	47,2	11,3	-	-	47,1	7,5

Tableau 11 : Nombre de lésions par plasmide générées pour chacun des lots utilisés lors de nos expériences.

- Agrégation des billes

En plus de l'influence du DMSO, un second problème technique est apparu lors de la construction du piège. Après le simple greffage de plasmides non lésés, il nous était aisé de mettre la suspension de billes magnétiques en solution. Cependant, lors de l'exposition des plasmides aux dérivés du platine après fixation sur les billes, nous avons observé que celles-ci acquéraient une forte propension à s'agréger rapidement. Ce phénomène était encore visible après élimination du platine, ainsi que durant l'utilisation du piège (exposition aux extraits nucléaires). Il fut contourné par une augmentation de l'agitation à laquelle les échantillons étaient soumis afin d'éviter la sédimentation du piège et conserver l'accessibilité des sondes lésées. Cette agrégation a été également observée après modification de notre protocole et utilisation de stocks d'ADN lésé. Néanmoins, elle n'a jamais été notée pour les sondes plasmidiques UVC, dont la mise au point sera décrite dans le paragraphe suivant. Nous avons conclu qu'elle n'est pas due à l'action directe du platine sur les billes, mais plutôt à l'ADN lésé lui-même. Il a récemment été suggéré (Hou *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009) qu'en plus d'induire des déformations locales de la double hélice, le cisplatine et l'oxaliplatine génèrent l'apparition de micro-boucles sur les séquences d'ADN, puis une condensation de celui-ci. Ce mécanisme serait dû à la réactivité de monoadduits, capables de former des pontages entre molécules se trouvant à proximité dans le cas où le temps d'exposition à l'agent anticancéreux et la concentration de ce dernier sont suffisamment élevés. Ce modèle pourrait expliquer nos observations répétées : les billes se trouveraient liées entre elles par certaines molécules d'ADN pontées par l'un des dérivés du platine, ce qui cause leur agrégation.

2. Tests de capture de protéines choisies

L'étape de validation de notre sytème de piégeage a fait appel à la détection (au sein des échantillons isolés à l'aide des sondes plasmidiques portant les adduits du cisplatine) de protéines sélectionnées sur la base des informations disponibles dans la littérature. Ces candidats pertinents, possédant des capacités connues d'interaction avec les lésions dues aux agents platinés sont : HMGB1, XPC, hUBF et PARP-1. Après relargage directement dans le tampon de Laemmli, leur présence a été vérifiée par *Western blotting*. Les résultats des détections pratiquées sont présentés sur la Figure 44.

HMGB1, protéine nucléaire abondante et possédant une bonne affinité pour les adduits du cisplatine, a été effectivement piégée par notre système, et sa présence n'est pas abolie par l'utilisation d'un tampon plus salin pour le rinçage (pistes 2 et 5). hUBF, facteur possédant la plus forte affinité connue pour les adduits du cisplatine, est lui aussi efficacement piégé par notre système. Cependant, on peut constater qu'un rinçage plus stringent permet d'éliminer un signal non spécifique présent sur les contrôles, ainsi que de diminuer le signal obtenu sur l'oligonucléotide lésé. Le facteur du système NER XPC, quant à lui, n'a pas été détecté par notre système. PARP-1, enfin, s'est trouvée fixée sur les sondes lésées et les contrôles (billes + ADN non lésé et billes seules).

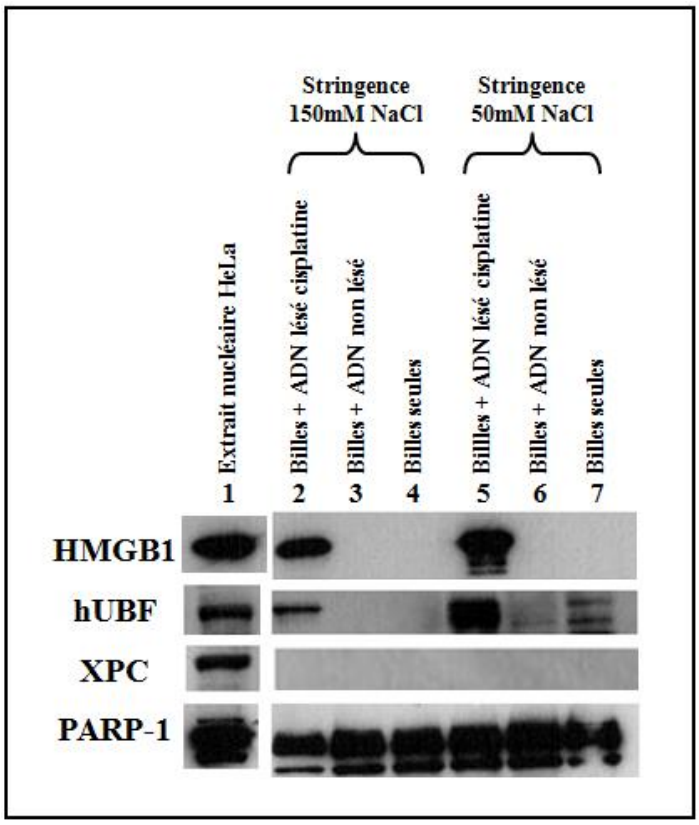


Figure 44 : Le piège mis au point assure la capture spécifique de protéines abondantes à haute affinité pour les adduits du cisplatine (HMGB1, hUBF). Cependant, il ne permet pas de retenir un facteur de réparation spécialisé (XPC) et ne s'avère pas spécifique pour un senseur de lésion (PARP-1).

Nos sondes plasmidiques sont donc capables de piéger efficacement des protéines attendues sur les adduits du cisplatine. La dernière étape d'optimisation consistait en la détermination du meilleur protocole d'élution des protéines tout en minimisant la présence des protéines fixées de façon aspécifique, ce qui va faire l'objet des paragraphes qui suivent.

3. Évaluation de deux méthodes de relargage des protéines piégées

La construction du piège implique la sélection d'un support pour fixer les sondes, appliquer l'extrait biologique, effectuer les éapes de rinçage, et récupérer les protéines. Nous avons vu lors de l'analyse bibliographique que les billes magnétiques constituent un support très populaire pour les approches de ce type, ce qui a guidé notre choix. Il s'agit d'un système micrométrique mais facile à mettre en œuvre à toutes les étapes de la création du piège et de son utilisation. Malgré tout, un tel système implique la fixation non spécifique de protéines sur la surface des billes magnétiques. Ceci a pour effet de prélever un certain nombre de protéines d'intérêt de la population disponible et, surtout, d'introduire dans les échantillons isolés une grande quantité de protéines non pertinentes susceptibles de générer un bruit de fond important. Pour une simple immunodétection cela est généralement peu gênant. En revanche, pour une analyse protéomique par spectrométrie de masse, identifiant simultanément des centaines de protéines, c'est un problème qu'il est nécessaire de contourner. L'ampleur de ce bruit de fond peut être constatée sur la Figure 45, qui présente une coloration au nitrate d'argent d'échantillons protéiques issus de la capture sur la sonde lésée et ses deux contrôles.

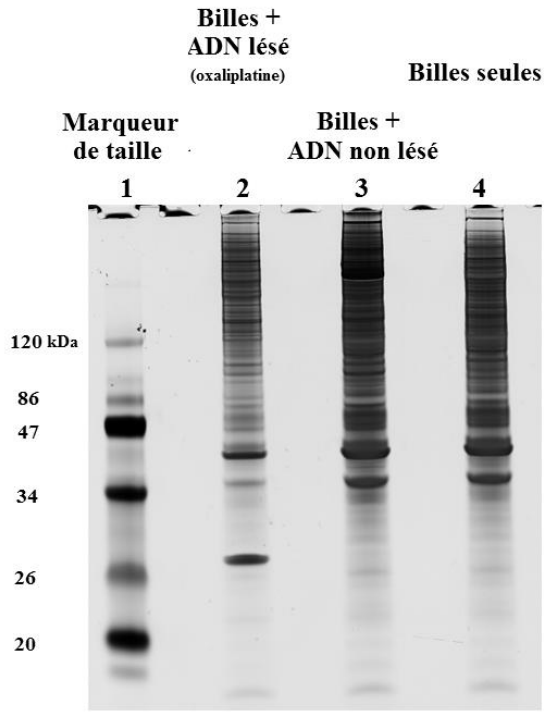


Figure 45 : L'ensemble des protéines présentes dans chaque condition expérimentale après piégeage au sein d'extraits nucléaires HeLa visualisées par coloration au nitrate d'argent après migration sur gel.

Deux approches, l'une dite « totale », et l'autre utilisant des nucléases censées limiter la récupération de protéines non pertinentes, ont été testées. L'élution totale utilise directement un tampon de type Laemmli, employé pour les migrations sur gel qui suivent la récupération des protéines. En raison de la présence d'un détergent (SDS) et d'un agent réducteur (β-mercaptoéthanol), les protéines sont dénaturées et détachées du piège. Cette méthode présente l'avantage de n'exclure, théoriquement, aucune des protéines capturées, mais son revers est évidemment d'augmenter le bruit de fond dans l'échantillon obtenu par la libération des protéines fixées sur le support et les parties non lésées de nos sondes. Ainsi, afin de récupérer les protéines fixées tout en minimisant la présence des contaminants non spécifiques issus des billes, nous avons envisagé d'utiliser une enzyme à activité nucléase pour digérer l'ADN du piège et ne relarguer que les protéines présentes sur l'ADN.

À cet effet, deux endonucléases ont été évaluées sur le piège nu, c'est-à-dire l'ADN lésé fixé sur les billes magnétiques (sans protéine piégée) : la nucléase P1 et la DNase I. La nucléase P1 possède une double activité phosphodiestérase et 3'-phosphomonoestérase, sans spécificité de base. Elle est couramment utilisée pour hydrolyser l'ADN simple-brin et l'ARN, mais les observations de notre laboratoire (Frelon *et al.*, 2000) prouvent qu'elle fonctionne également très bien sur l'ADN double-brin. Dans un premier temps, notre choix s'est porté sur cette enzyme car le tampon utilisé (30mM acétate d'ammonium 0,1mM sulfate de zinc) est adapté à la lyophilisation, ce qui présente l'avantage de pouvoir concentrer les échantillons à l'issu des étapes de capture et relargage. La DNase I, quant à elle, coupe l'ADN de façon non spécifique et génère des oligonucléotides possédant une extrémité 5' phosphorylée et une extrémité 3' hydroxylée. Elle fonctionne sur l'ADN simple- et double-brin.

Une première évaluation a été réalisée avec la nucléase P1 seule, en employant des dilutions de l'enzyme allant de 1:1 (2 unités) à 1:100 afin de digérer l'ADN lésé par le cisplatine et fixé sur billes magnétiques (1,2µg d'ADN fixés sur 60µg de billes par échantillon – quantités égales à celles utilisées dans la version finale du protocole de *ligand fishing* –). Le but de tester ces dilutions est de trouver la concentration idéale d'enzyme : celle-ci doit être suffisante pour digérer l'ADN efficacement, mais la plus basse possible pour éviter au maximum les interférences avec l'analyse protéomique. L'hydrolyse a été mesurée par un dosage d'ADN (absorbance à 260nm) dans le surnageant, révélant que jusqu'à la dilution 1:50, une proportion très importante de l'ADN lésé (≥ 75%) se trouve effectivement libéré (Figure 46). Cette série d'expériences a montré que l'hydrolyse de l'ADN nu fixé sur les billes magnétiques est envisageable et, surtout, se fait de façon efficace avec une faible quantité d'enzyme. Une seconde évaluation de la digestion enzymatique des sondes a été réalisée, mettant en parallèle nucléase P1 et DNaseI, mais cette dernière ne s'est pas montrée plus peformante que la nucléase P1, qui a donc été conservée pour la suite de l'évaluation de cette approche (dilution 1:50).

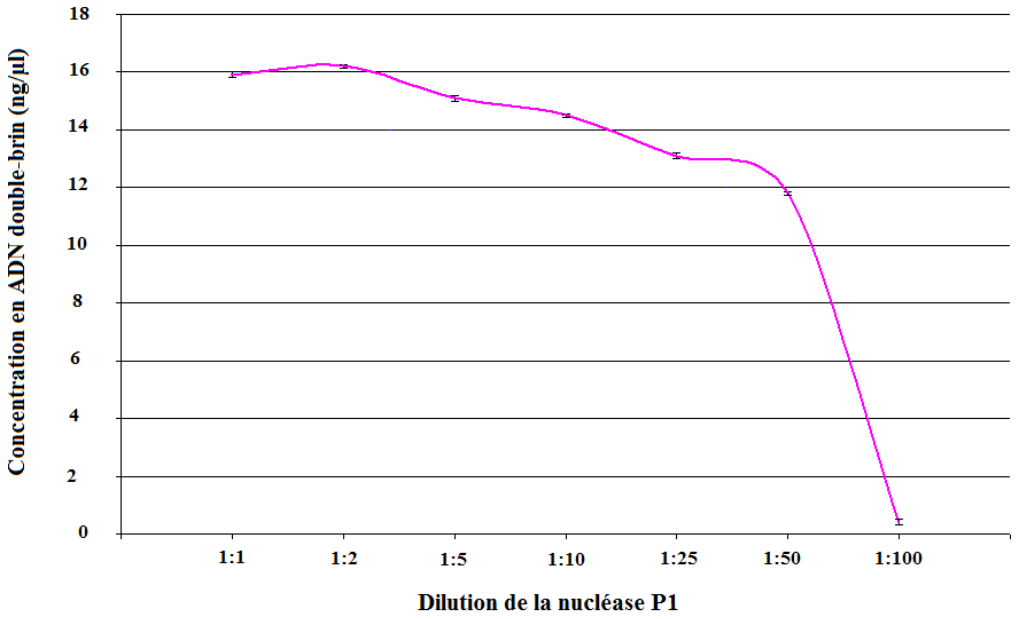


Figure 46 : Mesure par absorbance UV du relargage d'ADN plasmidique lésé fixé sur billes magnétiques par différentes concentrations de nucléase P1 (concentration maximale en nucléase P1 = 2U).

Pour ces tests en présence de nucléase, nous avons travaillé sur l'établissement de l'interactome des lésions du cisplatine uniquement (avec les deux contrôles classiques : billes + ADN non lésé et billes seules). Trois expérimentations successives ont été effectuées, celles-ci se sont avérées décevantes pour plusieurs raisons :

- manque de reproductibilité dans le nombre et la nature des protéines identifiées ;
- présence de protéines peu pertinentes parmi celles piégées spécifiquement sur les sondes platinées ; en effet, seule HMGB1 (5 peptides, score 177) a été identifiée comme membre déjà connu de l'interactome ; de plus, plusieurs des protéines détectées (GRP78, diverses *heat shock proteins*) font partie des protéines récurrentes observées lors d'analyses protéomiques différentielles (sur- ou sous-expression par les cellules lors d'un stress) (Petrak *et al.*, 2008).

Bien que les nucléases soient capables de digérer le piège nu, ce que nous avons eu l'occasion de vérifier, nous supposons que la présence de nombreuses protéines liées à l'ADN empêche ces enzymes d'agir aussi efficacement. Ainsi, les précautions que nous avions prises apportaient plus d'inconvénients que de bénéfices puisque, diminuant la complexité de nos échantillons et limitant le bruit de fond, elle occasionnait aussi la perte des candidats potentiellement intéressants, restés sur l'ADN imparfaitement digéré du piège. Disposant de contrôles *a priori* sûrs (ADN non lésé et billes magnétiques seules) permettant d'exclure les protéines récupérées de façon non spécifique sur le piège, nous avons finalement décidé de ne réaliser que l'élution « totale » à l'aide du tampon dénaturant. Cette optimisation fut la dernière réalisée, et a permis de disposer d'un protocole de *ligand fishing* à partir duquel nous avons obtenu les résultats qui vont maintenant être présentés.

4. Test préliminaire utilisant le mode de relargage total des protéines

Précisons avant d'aller plus avant dans nos résultats que tous les tableaux de protéomique cités dans la suite de ce travail sont consultables sur le disque compact joint.

L'utilisation d'une méthode radicale d'élution des protéines, à l'aide du tampon dénaturant a immédiatement donné des résultats bien plus encourageants. En effet, un premier test mené uniquement avec la sonde plasmidique portant les adduits du cisplatine et les contrôles appropriés (Tableau Excel nommé Analyse_1) a montré que l'identification de protéines significatives était réalisable. Soixante et une protéines étaient spécifiques des sondes lésées (toutes conditions de rinçage confondues), et 21% des 47 annotées ont des capacités connues d'interaction avec l'ADN. Dix protéines restaient communes aux deux stringences. Celles dont l'identité a bien été établie dans la base UniProt sont : HMGB1 (11-13 peptides, scores 436-454), hUBF (9-12 peptides, scores 410-642), SSRP1 (3-7 peptides, scores 145-366), HMGB2 (3-4 peptides, scores 143-163), ATP-binding cassette sub-family 2 (2 peptides, score 91), la sous-unité β de la pyruvate déshydroénase E1 (2 peptides, scores 91-112), la protéine de liaison à l'ARN 27 ou 47 (2-4 peptides, scores 107-210) et la protéine chromosomale non-histone Q16466 (2 peptides, scores 77-80). Parmi les protéines spcifiques à l'une ou l'autre stringence, citons Ku70 (5 peptides, score 228), l'histone désacétylase 1 (2 peptides, score 78-85), la TAR DNA binding protein 43 (impliquée dans la régulation de la transcription et de l'épissage alternatif ; 5 peptides, score 292), PPP1R10/PNUTS (3 peptides, score 80).

La présence de plusieurs membres connus de l'interactome des adduits du cisplatine nous a confortés dans l'efficacité de notre protocole à piéger des protéines pertinentes, et nous avons donc cherché à établir l'interactome des adduits générés par les trois dérivés du platine qui nous intéressent.

B) Détermination de l'interactome des lésions platinées

À partir du nouveau protocole mis au point, nous avons préparé deux séries d'échantillons identiques incluant de l'ADN lésé par chacun des trois dérivés du platine (cisplatine, oxaliplatine, JM118), et obtenu lors de deux analyses indépendantes de nouvelles listes des protéines capturées (Tableau Excel nommé Analyse_2&3). La Tableau 12 présente le nombre de protéines identifiées (application de notre filtre de sélection : nombre de peptides ≥ 2, score ≥ 70) dans chacun des échantillons analysés.

Type d'échantillon	Rinçage plus stringent					Rinçage moins stringent				
	Cis-platine	*Oxali-platine*	*JM118*	*ADN non lésé*	*Billes*	*Cis-platine*	*Oxali-platine*	*JM118*	*ADN non lésé*	*Billes*
Analyse n°1	171	140	149	140	171	126	92	108	108	128
Analyse n°2	170	194	183	132	157	135	135	142	158	102

Tableau 12 : Nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon analysé au lors de l'établissement de l'interactome des lésions platinées.

Ces listes comportent 92 à 194 protéines identifiées. De façon tout à fait intéressante, pour l'ensemble de ces échantillons l'influence de la stringence ne va pas dans le sens envisagé au départ : un nombre plus important de protéines a été identifié dans les échantillons ayant subi un rinçage plus stringent. Il est cependant possible d'émettre l'hypothèse qu'ayant restreint la complexité des échantillons et donc leur gamme dynamique par la stringence des lavages, un nombre plus important de protéines ait été identifié par le spectromètre de masse.

Afin d'asseoir nos conclusions finales sur des résultats solides concernant l'interactome recherché, nous n'avons retenu que les protéines vues lors des deux analyses, toutes stringences confondues. Elles sont au nombre de 196, et leur répartition en fonction des conditions est présentée par la Figure 47. Le volet A de cette figure permet de se rendre compte de l'importance du bruit de fond. Près d'un tiers du total des protéines ont été observées sur les trois types d'échantillons, et 19% étaient spécifiques à l'ADN lésé, toutes lésions confondues. Le volet B de la Figure 47 montre qu'un tiers des protéines spécifiques aux lésions sont communes aux trois dérivés du platine. Ce sont les adduits de l'oxaliplatine qui ont retenu le plus de protéines uniques, au nombre de 11, contre cinq pour le cisplatine et trois pour le JM118. Sept protéines sont communes à deux lésions sur trois.

Les 38 protéines identifiées spécifiquement grâce à l'ADN lésé sont présentées dans le Tableau 13, ainsi que les informations (nombre de peptides, score) récoltées lors de l'analyse protéomique. Un examen de cette liste fait ressortir que le nombre de peptides et les scores obtenus sont généralement plus élevés que pour les candidats potentiels des analyses antérieures. On remarquera notamment le nombre important de peptides reconnus pour HMGB1 et hUBF (jusqu'à 16 et 22, respectivement).

La Figure 48 montre que cette double analyse a permis de récupérer une proportion de protéines (l'ensemble de celles-ci étant annotées) capables de se lier à l'ADN bien plus forte que les expériences menées précédemment (47,3%). La proportion des candidats capables d'établir un contact avec d'autres protéines est aussi importante (73,7%), et on notera également une proportion significative de protéines impliquées dans la régulation de la transcription (23,7%), et possédant une activité catalytique (36,8%).

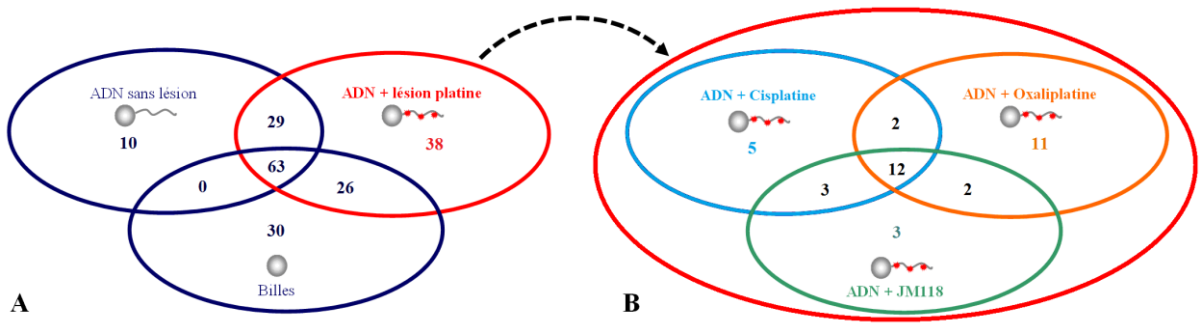


Figure 47 : Répartition des populations de protéines de l'interactome des lésions platinées en fonction de : (A) la nature du piège (ADN lésé ; ADN non lésé ; billes sans ADN) ; (B) le type de lésion (paramètres de tri : nombre de peptides ≥ 2 ; score ≥ 70 ; stringences élevée et faible regroupées).

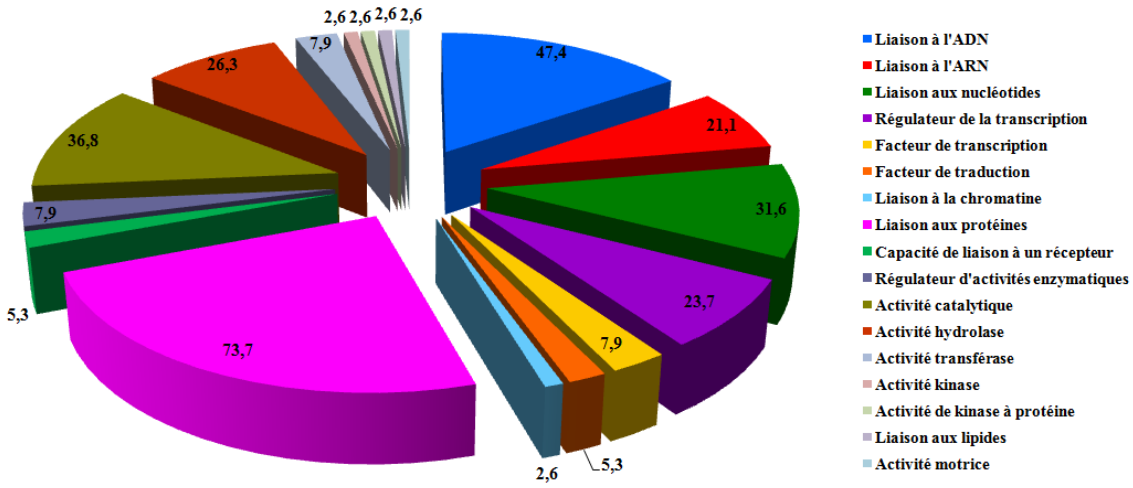


Figure 48 : Classification fonctionnelle de l'interactome des lésions du platine établi à l'aide de nos sondes plasmidiques. Les pourcentages mentionnés indiquent la part de chaque catégorie par rapport au total de protéines annotées. Une protéine peut être présente dans plusieurs catégories.

Nos résultats contiennent 29 nouvelles protéines dont la capacité à reconnaître les adduits platinés sur l'ADN n'avait jamais été mise en évidence. La détection de TOX4, PNUTS et TRF2 a fait l'objet d'une vérification par *Western blotting*, HMGB1 servant de contrôle positif ainsi que de contrôle de charge avec la β-actine (Figure 49). Nous avons utilisé cette dernière car elle se trouve dans tous les éluats en raison de son adsorption sur les billes. Si la présence de TOX4 et PNUTS a pu être confirmée par ce moyen, cela n'a pas été le cas pour la capture spécifique de TRF2 sur nos différents adduits platinés. L'utilisation d'anticorps pour identifier TRF2 par immunodétection produit deux bandes. Les différences exacte entre les deux formes à l'origine des deux bandes ne paraissent cependant pas avoir été déterminées (Okabe *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2004). Si la bande représentant la forme de plus haute masse moléculaire (69kDa) n'était observée qu'au sein de nos échantillons isolés grâce à l'ADN lésé, la bande représentant la forme de plus faible masse moléculaire (65kDa) était quant à elle détectée dans tous les échantillons, y compris les contrôles ADN fixé et billes seules. Ceci nous a empêchés de conclure définitivement concernant la présence spécifique de cette protéine sur les adduits platinés.

Signalons également que le profil de migration de TOX4 (masse moléculaire théorique = 66kDa), montrait que la protéine présente dans nos échantillons avait une masse moléculaire plus élevée (proche de 115kDa). Après avoir utilisé sans succès plusieurs traitements (augmentation de la température et du temps de dénaturation par chauffage, augmentation de la concentration en détergent du tampon de dépôt sur gel) destinés à casser la présence d'un éventuel complexe multimérique, nous avons procédé à une analyse protéomique de la zone contenant la bande spécifique. Cette analyse a permis de confirmer que TOX4 est bien la protéine détectée.

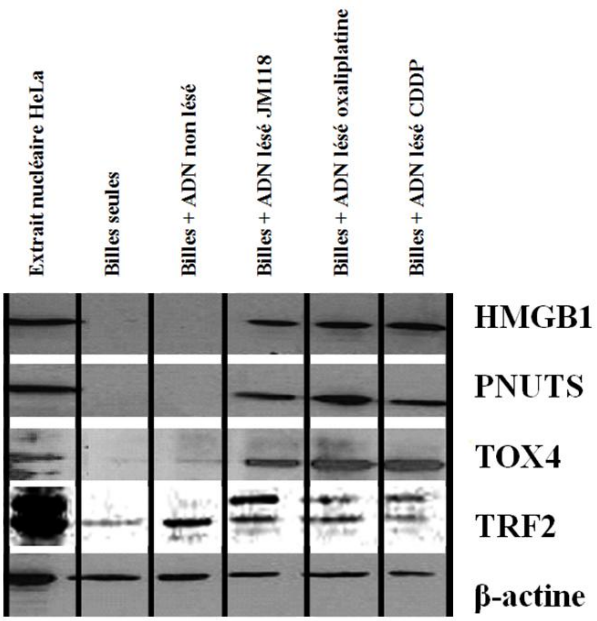


Figure 49 : La présence de quatre membres de l'interactome des adduits platinés sur nos sondes plasmidiques est confirmée par *Western blotting*. La présence spécifique de TRF2 ne peut pas être validée en considération du signal difficile à interpréter.

Nous sommes ainsi parvenus à mettre au point une nouvelle approche de *ligand fishing* destinée à la capture spécifique de membres de l'interactome des lésions générées par trois dérivés du platine à potentiel thérapeutique avéré ou présumé. Vingt-neuf nouveaux membres de l'interactome ont été identifiés.

Nom générique (Uniprot)	Entrée (Uniprot)	Nombre de peptides (extrêmes)	Score (extrêmes)	Cisplatine S+	Cisplatine S-	Oxali-platine S+	Oxali-platine S-	JM118 S+	JM118 S-
*Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus ACIN1	ACINU_HUMAN	2 - 3	103 - 156	X	-	-	-	-	-
*ADP-ribosylation factor 6 ARF6	ARF6_HUMAN	2 - 3	97 - 181	X	-	-	-	-	-
*60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	CH60_HUMAN	3 - 4	144 - 264	-	-	X	-	-	-
*Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	DDX46_HUMAN	2	77 - 121	X	X	-	-	-	-
DNA ligase 3	DNLI3_HUMAN	2 - 7	96 - 436	-	-	X	-	X	X
*HEATR1	HEAT1_HUMAN	2 - 12	75 - 710	X	-	-	-	-	X
High mobility group box 1 HMGB1	HMGB1_HUMAN	11 - 16	472 - 1168	X	X	X	X	X	X
HMGB2	HMGB2_HUMAN	3 - 11	137 - 611	X	X	X	X	X	X
HMGB3	HMGB3_HUMAN	2 - 6	92 - 389	X	X	X	-	-	-
*Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 IF2a	IF2A_HUMAN	2 - 3	83 - 120	-	-	-	X	X	-
*Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 IF2b	IF2B_HUMAN	2 - 3	96 - 178	-	-	X	-	-	-
*Ras GTPase-activating-like protein IQGA1	IQGA1_HUMAN	2 - 4	95 - 246	X	-	-	-	-	-
*Leucine-rich repeat-containing protein 40 LRRC40	LRC40_HUMAN	2	87 - 95	-	-	X	-	-	-
*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 MDC1	MDC1_HUMAN	2 - 4	99 - 208	-	-	X	-	-	-
*Metastasis-associated protein MTA2	MTA2_HUMAN	2	80 - 136	-	-	X	-	-	-
*Nucleolar protein 11 NOL11	NOL11_HUMAN	2 - 4	99 - 176	-	-	X	-	-	-
*Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2/NOL1	NOP2_HUMAN	2 - 3	90 - 226	-	-	-	-	X	-
*Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein PICALM	PICAL_HUMAN	2 - 5	93 - 253	X	-	X	-	X	-
*Pinin	PININ_HUMAN	2	80 - 92	-	-	X	-	-	-
* Serine/threonine-protein phosphatase 1 subunit 10 PNUTS	PP1RA_HUMAN	2 - 12	90 - 653	X	X	X	X	X	X
*PC4 and SFRS1-interacting protein PSIP1	PSIP1_HUMAN	2 - 3	120 -162	-	-	X	-	-	-
*Telomere-associated protein RIF1	RIF1_HUMAN	2 - 8	103 - 583	X	-	-	-	X	X
*U2 small nuclear ribonucleoprotein A' SNRPA1	RU2A_HUMAN	2	89 - 96	-	-	X	-	-	-

***RuvB-like 2 RUVBL2**	**RUVB2_HUMAN**	**2 - 4**	**83 - 260**	**-**	**-**	**-**	**-**	**X**	**-**
***Septin-2**	**SEPT2_HUMAN**	**2 - 5**	**98 - 281**	**-**	**X**	**-**	**X**	**-**	**X**
***Structural maintenance of chromosomes protein 3 SMC3**	**SMC3_HUMAN**	**2 - 7**	**92 - 397**	**X**	**-**	**-**	**X**	**X**	**X**
Transcription activator BRG1	**SMCA4_HUMAN**	**2**	**76 - 157**	**X**	**-**	**-**	**-**	**X**	**-**
***SMARCA5**	**SMCA5_HUMAN**	**2 - 3**	**106 - 140**	**-**	**-**	**-**	**-**	**X**	**-**
Chromatin-specific transcription elongation factor SPT16	**SP16H_HUMAN**	**6 - 18**	**403 - 1292**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
***Signal recognition particle 68 kDa protein SRP68**	**SRP68_HUMAN**	**2 - 5**	**85 - 278**	**X**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**
Structure-specific recognition protein 1 SSRP1	**SSRP1_HUMAN**	**5 - 12**	**254 - 625**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
***Telomeric repeat-binding factor 2 TRF2**	**TERF2_HUMAN**	**2 - 5**	**129 - 254**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**-**
***Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1 TLK1**	**TLK1_HUMAN**	**2**	**92 - 113**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**
***TOX high mobility group box family member 4 TOX4**	**TOX4_HUMAN**	**2 - 6**	**111 - 381**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**-**
Human upstream binding factor hUBF	**UBF1_HUMAN**	**6 - 22**	**340 - 1264**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**
***WD repeat-containing protein 82 WDR82**	**WDR82_HUMAN**	**2 - 7**	**140 - 430**	**X**	**-**	**X**	**-**	**-**	**X**
X-ray repair cross-complementing protein 6 / Ku70	**XRCC6_HUMAN**	**2**	**73 - 92**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
***Zinc finger protein 638 ZN638**	**ZN638_HUMAN**	**2 - 3**	**104 - 153**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**

Tableau 13 : Bilan des analyses protéomiques sur extraits nucléaires HeLa – Ensemble des protéines capturées par le piège contenant un panel d'adduits des dérivés du platine. Les protéines qui n'ont jamais été associées à ces lésions dans la littérature sont marquées d'une *.

III. Discussion

D'une manière générale, la compréhension des processus déclenchés par la présence des lésions (inhibition de la réplication et de la transcription, réparation de l'ADN, initiation de l'apoptotose, etc.) est grandement facilitée par la connaissance des protéines qui vont venir reconnaître ces dommages. Malgré les efforts engagés depuis plus de quatre décennies, de nombreuses zones d'ombre subsistent concernant les répercussions biologiques des lésions de l'ADN engendrées par les dérivés du platine. Pour preuve, de nouveaux membres de l'interactome des adduits du cisplatine ont été découverts récemment (Guggenheim *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010). Partant de ce constat, nous avons souhaité apporter notre contribution à la détermination de cet interactome en mettant au point notre propre système de capture de protéines.

Isoler et identifier les acteurs protéiques d'un mécanisme cellulaire particulier ne sont pas des tâches aisées. Depuis un peu plus de 10 ans, plusieurs approches de *ligand fishing* ont été mises en œuvre avec l'objectif d'identifier les protéines interagissant avec les lésions de l'ADN, chacune reproduisant des résultats antérieurs et/ou apportant de nouveaux candidats.

Tout ceci a constitué une excellente source d'inspiration, et nous a permis d'établir un protocole original, qui a été utilisé pour piéger les protéines et complexes protéiques interagissant avec les adduits de trois dérivés du platine (cisplatine, oxaliplatine, satraplatine). Nous allons revenir plus en détail sur les caractéristiques de notre piège, nous basant sur les résultats que nous avons obtenus et en effectuant des comparaisons avec les autres approches publiées. Ensuite, nous reviendrons sur les protéines identifiées au cours de nos travaux, en insistant sur les candidats originaux.

A) Considérations sur le protocole de piégeage des protéines

L'idée directrice de la première partie du présent travail de thèse a été la mise au point d'un outil de détection des interactions ADN lésé/protéines. Ce système de capture de protéines utilise un appât moléculaire, constitué de séquences d'ADN lésé immobilisées sur des billes superparamagnétiques, un support qui facilite l'isolement du piège après la phase d'interaction. Notre protocole de *ligand fishing* peut être mis en parallèle avec les approches similaires les plus récentes, et plus particulièrement celles que nous avons mises en avant dans le Tableau 4 clôturant notre analyse bibliographique.

1. Structure de la sonde et nature des lésions

Notre méthode possède deux propriétés originales. Tout d'abord, elle s'appuie sur une sonde plasmidique. Les pièges décrits dans la littérature font généralement appel à des sondes oligonucléotidiques dont la taille ne dépasse pas quelques dizaines de paires de base, et sur lesquelles n'est présente qu'une lésion unique. Nos sondes, à l'inverse, présentent l'avantage

de contenir, grâce à la longueur du plasmide (près de 3 000pb), plusieurs dizaines de lésions. Nous avons également développé un moyen de contrôle du taux de lésions grâce à une technique de chimie analytique (CLHP-SM/SM) permettant la détection des deux principaux adduits du cisplatine (1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG)) et leurs équivalents pour les deux autres dérivés.

Nous n'avons pas évalué le taux de platination global de nos plasmides. Ceci pourrait être contrôlé par l'intermédiaire de méthodes telles que l'ICP-MS. Précisons également que notre piège comprend un spectre étendu d'adduits, ce qui ne permet pas d'identifier le ou les dommages précis sur lesquels chaque protéine s'est fixée. Pour cela, il est préférable de se tourner, après identification de l'interactome global, vers une validation individuelle de chaque candidat, par exemple par EMSA ou SPR, en employant des ODN contenant un adduit unique. En procurant un panel d'adduits plutôt qu'une seule lésion, notre piège se rapproche de la situation de cellules traitées, à l'exception de deux caractéristiques : notre ADN nu s'éloigne du contexte chromatinien physiologique, et les taux de lésions obtenus sont très supérieurs à ceux observés *in cellulo*. Une autre particularité de la sonde réside dans la présence de cinq thio-dNTP susceptibles de réagir avec les dérivés du platine et d'être à l'origine d'interactions ADN/protéine artéfactuelles. Ces caractéristiques montrent bien la nécessité de valider les interactions découvertes à l'aide de systèmes complémentaires tels que la SPRi.

Au final, ces caractéristiques nous permettent d'augmenter la quantité de protéines retenues par le piège, améliorant ainsi la sensibilité globale de la méthode. De plus, nos sondes sont capables de piéger des protéines individuelles mais aussi des complexes protéiques.

2. Exhaustivité de la liste de protéines identifiées

Notre protocole possède bien sûr ses limitations intrinsèques. Tout d'abord, il favorise particulièrement les interactions fortes et non transitoires, puisqu'il ne fait appel à aucune méthode pour immobiliser définitivement les protéines sur les sondes après l'interaction. La possibilité de détecter des protéines s'étant associées au piège durant les premiers temps de l'exposition (et ayant par la suite laissé la place à d'autres facteurs, par exemple) est donc limitée, alors que le risque de perdre des candidats pertinents au cours des phases de rinçage est augmenté. Nous avons essayé de remédier à ce second problème par l'utilisation de tampons peu stringents (faible salinité). Ces conditions évitent la perte des candidats d'intérêt, mais elles ne permettent pas d'éliminer les protéines non spécifiques adsorbées sur le piège. Ces dernières se retrouvent ensuite dans nos échantillons, ce qui a des implications négatives sur la sensibilité globale de l'analyse protéomique au cours de laquelle les contaminants vont générer un important bruit de fond.

Nous devons remarquer l'absence de facteurs de la réparation de l'ADN parmi les protéines constituant la liste de l'interactome des adduits du platine, hormis Ku70, présente sur les sondes cisplatine. Dans la cellule, de telles protéines sont présentes en plus faibles quantités que d'autres protéines nucléaires, et notamment celles de la chromatine. En outre, leur expression puis leur translocation nucléaire est généralement favorisée par un traitement génotoxique préalable. Pour ces raisons, leurs possibilités d'interaction avec les sondes sont réduites par rapport à celles d'autres protéines nucléaires plus abondantes, ce qui explique peut-être cette absence.

D'autres systèmes de *ligand fishing* se sont avérés capables de capturer certaines de ces protéines. C'est ainsi le cas de XPC, sur un piège constitué d'un long fragment (288pb) possédant un adduit unique 1,3-d(GpTpG)-cisplatine excentré et immobilisé sur les mêmes billes magnétiques (Riedl *et al*., 2003). Les caractéristiques de ces sondes, comme les nôtres, sont en accord avec la longueur minimale de l'oligonucléotide requise (60bp) pour permettre une bonne l'interaction de XPC-HR23B avec la lésion (Trego & Turchi, 2006). Le temps d'exposition (40min) utilisé par Riedl *et al*. est comparable à celui fixé pour notre protocole. En revanche, les résultats de leur étude montrent que le facteur senseur des lésions déformantes est piégé en plus grande quantité lorsque l'exposition a lieu à 4°C plutôt qu'à 30°C. Remarquons que nous ne pouvons exclure que les conditions physico-chimiques de notre protocole autorisent les premières étapes de cette voie de réparation sur nos sondes et nous privent ainsi de la détection de certains acteurs de la réparation.

Le groupe de Lippard a également réussi à piéger PARP-1 de façon spécifique. Si cette protéine a aussi été effectivement retenue par notre piège, elle s'est retrouvée comme élément du bruit de fond au cours de chacune de nos analyses. Sa présence sur les sondes lésées mais aussi sur les sondes contrôles (y compris les billes seules) l'a de fait exclue de notre liste de protéines réagissant spécifiquement avec les lésions de l'ADN. Cette observation a également été confirmée par immunodétection. Nous pouvons toutefois remarquer que PARP-1 n'a été retenue, lors d'expériences de *ligand fishing*, que grâce à un seul type de sonde nucléique. Il s'agit de celle portant le dérivé benzophénone, utilisée dans le laboratoire de Lippard (Zhang *et al.*, 2004; Guggenheim *et al.*, 2008; Guggenheim *et al.*, 2009; Zhu & Lippard, 2009; Zhu *et al.*, 2010). La sonde benzophénone a été testée avec trois types d'adduits du cisplatine, 1,2-d(GpG), 1,3-d(GpG), les adduits interbrins entre deux guanines, ainsi que l'adduit 1,2-d(GpG)-oxaliplatine. Toutes ces sondes ont systématiquement permis d'identifier la protéine.

Son rôle dans la reconnaissance des cassures de l'ADN est bien documenté, et on peut émettre l'hypothèse que les extrémités de nos plasmides, qui s'apparentent à des telles lésions, ont été reconnues comme cela est le cas pour les sondes oligonucléotidiques à bras photoclivable (Hegarat *et al*., 2007). Ce phénomène n'est pas à exclure, mais il n'est probablement pas le seul responsable de la présence de PARP-1 sur les sondes. Guggenheim *et al*. ont effectivement confirmé cela en utilisant une sonde oligonucléotidique plus longue

(90 bases contre 25 pour la première employée) et fermée à ses extrémités (*dumbbell probe*). PARP-1, capable de se lier aux séquences en épingle à cheveu mais se trouvant alors trop loin des bases supportant le platine, a donc peu de chance d'être photopontée à la lésion et sa présence, là encore observée, ne peut donc qu'être due à l'adduit.

Nous avons déjà dit que, lors de nos expériences, PARP-1 avait une forte propension à se coller sur les billes magnétiques. Au cours de leurs expériences, Lippard et ses collaborateurs réalisent le photopontage ADN lésé/protéines avant d'introduire les billes magnétiques pour y fixer les sondes. Surtout, ils tirent avantage de cette fixation covalente des protéines sur les adduits modifiés pour réaliser un lavage très stringent, ce qui peut expliquer l'élimination d'un grand nombre de contributeurs au bruit de fond des billes, dont PARP-1.

Ainsi, certaines protéines ayant interagi avec les contrôle mais possédant tout de même une affinité pour l'ADN lésé peuvent être supprimées de nos listes. En outre, les contaminants, n'étant pas éliminés, sont donc toujours susceptibles d'altérer la sensibilité de l'analyse protéomique. Notre méthode n'évite pas complètement les risques de faux positifs et faux négatifs.

3. Limitation des protéines non pertinentes

Ceci nous amène à évoquer l'une des optimisations que nous avons testées afin de limiter ce bruit de fond. La présence des protéines non spécifiques est principalement due au support solide que nous avons choisi, en raison de la taille et des propriétés physico-chimiques des billes magnétiques. Elle peut également être (dans une moindre mesure) une conséquence de l'utilisation de la sonde plasmidique. En effet, ce type de séquence, là encore en raison de sa longueur, est susceptible de favoriser la récupération de protéines interagissant d'une façon ou d'une autre avec l'ADN, indépendamment de la présence de lésions. Le bruit de fond du à l'ADN ne peut être atténué qu'à l'aide des rinçages précédant la récupération de l'échantillon, dont on a vu que cela pouvait être préjudiciable à la récupération de candidats pertinents.

Afin de minimiser la présence de contaminants apportés par le support solide, plusieurs améliorations sont envisageables. Nous avons évalué une méthode de récupération faisant appel à la dégradation des sondes d'ADN par une nucléase non spécifique. Quoiqu'élégante et ayant déjà été utilisée (Rieger *et al.*, 2006), cette méthode n'a pas produit les résultats escomptés. En effet, une protéine attendue telle que hUBF était observée par immunodétection au sein d'échantillons recueillis selon un tel protocole, mais pas à travers les analyses protéomiques menées sur ces mêmes échantillons. Les listes de protéines acquises lors de ces analyses contenaient en outre une faible proportion de protéines capables d'interagir avec l'ADN, en comparaison de ceux obtenus plus tard à partir d'échantillons produit par un relargage total des protéines piégées. De plus, cette technique apporte un désavantage de taille, à savoir l'introduction d'une protéine supplémentaire (la nucléase P1),

en quantité largement supérieure à celle des facteurs piégés et qui s'ajoute donc fatalement au bruit de fond.

Les récents travaux menés au sein du laboratoire de Lippard sont ceux qui se rapprochent le plus de nos propres investigations, en termes d'objectifs et de techniques expérimentales. Ils utilisent un dérivé du cisplatine contenant un groupement benzophénone qui permet de réaliser un photopontage des protéines venant en contact avec les adduits. Des rinçages très stringents (1M NaCl) éliminent ensuite une grande partie des protéines adsorbées sur le piège en lui-même (ADN ou support solide). Des conditions analogues (haute salinité, forte concentration en urée) sont d'ailleurs généralement utilisées avec les autres méthodes de *ligand fishing* décrites dans la littérature et au cours desquelles les protéines sont pontées sur les sondes (Loeber *et al*., 2009; Winnacker *et al*., 2010). Ceci permet de réaliser ensuite un relargage total des protéines présentes à l'aide d'un tampon dénaturant sans crainte du bruit de fond. De telles approches sont séduisantes, et dans le cas de l'équipe de Lippard cela a d'ailleurs permis de récupérer un grand nombre de protéines spécifiques des lésions, qu'elles soient déjà connues ou nouveaux membres de l'interactome.

Pourtant, quelques inconvénients nous semblent inhérents à ce type d'approche. En premier lieu, les lésions formées ne sont pas structurellement identiques à celles du cisplatine. Nous avons vu que les déformations causées par la présence des adduits du platine sur l'ADN sont proches pour nos trois dérivés, et qu'elles peuvent en conséquence être reconnues par des protéines communes, telle que HMGB1. Cependant, nous avons aussi vu que ce principe ne s'applique pas systématiquement et que l'interactome peut donc varier selon la nature de l'agent platinant utilisé (exemple : les lésions engendrées par l'oxaliplatine ne sont pas reconnues par les protéines de la voie MMR). Ce fait est d'ailleurs abordé par les auteurs, lorsqu'ils suggèrent une similarité de structure entre leur dérivé modifié et le satraplatine. La sonde photoactivable n'est donc pas totalement représentative de l'ADN cellulaire lésé par le cisplatine.

Le deuxième point sensible de la sonde photoactivable (cela s'applique à toutes les autres approches similaires) est la possibilité de récupérer des candidats « faux positifs », correspondant aux protéines aléatoirement venues au contact de la lésion mais ne possédant pas d'affinité pour celle-ci. En outre, le principe de ces pièges reposant sur une fixation covalente suivie de rinçages stringents, l'approche n'est adaptée qu'à l'identification des facteurs se liant aux adduits, mais pas à celle de leurs partenaires (complexes protéiques) éventuellement présents puisque ceux-ci ont de grandes chances d'être éliminés lors des rinçages du système. S'ils rapportent la présence des deux membres des complexes MutSα et β, Guggenheim *et al*. et Zhu *et al*. ont identifié d'autres protéines sans leurs partenaires connus. C'est ainsi le cas pour Spt16, piégée car elle serait en contact plus proche avec l'adduit, contrairement à SSRP1 qui reconnait la déformation en s'associant avec le brin non endommagé plutôt que directement avec la lésion. Ils signalent aussi la capture de DDB1, mais pas de DDB2 (Scrima *et al*., 2008). Notre piège, au contraire, est plus à même de

préserver les assemblages protéiques fonctionnels, comme nous avons pu le démontrer par la capture de FACT (hétérodimère) et PTW/PP (complexe de quatre protéines).

Un relargage spécifique comme celui permis par l'introduction d'un groupement labile entre le support solide et la sonde affranchit la procédure d'une grande partie du bruit de fond. Des méthodes chimiques sont envisageables, par exemple en utilisant un pont disulfure entre la biotine et l'ADN qui sera efficacement rompu en augmentant la concentration d'un agent réducteur (Shimkus *et al*., 1985). De telles techniques impliquent une modification de l'environnement chimique du piège et des protéines retenues, ce qui peut avoir des conséquences sur l'interaction lorsque les facteurs ne sont pas immobilisés. Parce qu'il n'implique pas l'introduction d'un quelconque agent pour la phase de récupération des protéines, la présence d'un bras photoclivable (décrit lors de notre analyse bibliographique) placé entre la biotine et la sonde semble une alternative plus efficace (Hegarat *et al*., 2007).

Malgré la pertinence de ces adaptations expérimentales, nous avons prouvé, à travers nos résultats (38 protéines piégées au total avec les trois dérivés du platine, dont 29 sont de nouveaux membres de leur interactome) que l'utilisation de contrôles appropriés permettait de déterminer en grande partie la composition du bruit de fond et de le retrancher ensuite des listes de protéines pour ne conserver que celles spécifiquement présentes sur les lésions. De tels contrôles sont bien sûr utilisés par les autres équipes, mais nous avons vu que leurs procédures ont moins à souffrir du bruit de fond.

La récupération de protéines non pertinentes pourrait aussi être évitée en utilisant l'approche « puces à protéines ». En effet, n'oublions pas que ces outils, illustrés lors de notre analyses bibliographiques par plusieurs exemples, dont un appliqué aux dérivés du platine (Stansfield *et al*., 2009), représentent une approche très puissante pour la détection d'interactions. Elles sont encore fortement dépendantes de la qualité des protéines utilisées pour leur construction qui est, elle, très variable. Il est en effet toujours difficile d'obtenir des protéines pures et fonctionnelles (modifications post-traductionnelles et repliement) afin de les déposer sur un support de format puce. Le fait d'immobiliser des protéines peut également perturber leurs capacités de reconnaissance. Notre piège et la plupart des approches de *ligand fishing* font directement appel à des extraits cellulaires, ce qui permet de disposer de protéines dont les capacités fonctionnelles sont moins altérées. Les puces à protéines ont cependant l'avantage d'éliminer les possibilités d'interférence entre candidats. Par contre, il n'est peu envisageable, avec un système de type puce à protéines, d'étudier directement les interactions mettant en jeu des complexes multimériques.

4. Aspect quantitatif

Notre méthode présente une robustesse suffisante pour une analyse qualitative, mais est encore trop limitée pour réaliser des analyses quantitatives qui permettraient une meilleure discrimination de l'affinité de chaque protéine et d'identifier d'éventuels faux négatifs en se basant sur une comparaison de leur abondance entre sondes et conditions contrôles.

Deux indices permettant d'estimer sans marquage préalable les abondances relatives entre les échantillons pourraient être déterminés à partir de nos analyses protéomiques :

- entre échantillons, le *spectral count* (nombre cumulé des spectres enregistrés pour tous les peptides appartenant à une protéine)
- à l'intérieur d'un échantillon, l'*exponentially modified protein abundance index* ($\text{emPAI} = 10^{(\text{peptides observés/peptides observables})} - 1$) (Ishihama *et al.*, 2005).

L'exploitation de ces indices n'est dans notre cas pas envisageable. Nous avons en effet déjà souligné le fait qu'il ne nous avait pas été possible de normaliser la quantité de protéines analysée par échantillon. De ce fait, notre protocole n'autorise pas encore l'utilisation du *spectral count* afin de raisonner précisément en termes quantitatifs comparatifs et affirmer une différence d'affinité réelle sur leur unique base. Le changement d'échelle, c'est-à-dire l'emploi d'une plus grande quantité de sondes et d'extraits nucléaires pour obtenir une plus grande concentration de candidats potentiels pourrait permette de remédier à cette limitation.

5. Bilan

Les principales caractéristiques de notre piège, ainsi que les avantages et inconvénients associés, sont résumés dans le Tableau 14.

Nous avons pu mettre au point un piège à protéines efficace et dont la mise en œuvre est simple. Ce piège n'est pas exhaustif, et des améliorations peuvent être encore apportées. Malgré tout, il a confirmé les propriétés de membres déjà connus de l'interactome des dérivés du platine, tout en permettant d'en découvrir de nouveaux.

La multiplicité des déclinaisons expérimentales, les données obtenues à travers ces approches, et nos propres résultats suggèrent qu'il n'existe pas de méthode idéale, pour un groupe de lésions donné et/ou pour un modèle cellulaire particulier. Ce sont plutôt la complémentarité de chacune des approches et les compromis expérimentaux concédés (autour du principe « favoriser la présence de candidats / diminuer les interactions non spécifiques ») qui permettent progressivement de compléter la cartographie des protéines interagissant avec les lésions de l'ADN. Nous estimons donc que notre protocole s'inscrit tout à fait dans la lignée des méthodes déjà publiées.

CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES	AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
Taille de la sonde	Fournit un support pour plusieurs lésions (d'où le piégeage de plusieurs protéines et une amélioration de la sensibilité) Permet l'assemblage de grosses protéines/complexes	Augmentation du bruit de fond
Introduction des lésions par exposition directe à l'agent génotoxique (cas des dérivés du platine)	Obtention d'un panel de lésions différentes	Nécessité d'une seconde méthode pour tester individuellement l'interaction avec chaque type de lésion
Contrôle de la quantité de lésions par CLHP-SM/SM	Connaissance précise du taux de pontages 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG)	Pas d'appréciation du taux global de platination des plasmides
Support solide : billes magnétiques	Facilité d'isolement des sondes après interaction	Augmentation du bruit de fond
Tampons peu stringents	Préservation des interactions	Augmentation du bruit de fond
Pas de méthode de pontage des protéines sur la sonde	Favorise les interactions pertinentes sur le plan biologique	Défavorise les interactions faibles et/ou transitoires
Relargage directement dans le tampon de Laemmli	Dans notre cas : meilleure reproductibilité et protéines piégées plus pertinentes (par rapport à une relargage des protéines par l'action de nucléases)	Récupération des protéines associées à l'ADN non lésé et aux billes Difficultés pour identifier des protéines pertinentes qui ont quand même une affinité pour les contrôles.
Analyses protéomiques	Identification de protéines déjà connues et de nouveaux candidats Haut débit	Non exhaustivité Protéines relarguées en quantités trop faibles pour une quantification préalable à l'analyse protéomique ; aspect quantitatif des données protéomiques non exploitable

Tableau 14 : Caractéristiques de notre système de *ligand fishing* : principaux avantages et inconvénients.

B) L'interactome des lésions platinées : protéines connues et candidats originaux

L'intérêt de notre méthode de capture est démontré par deux aspects : la présence de protéines attendues, et la présence de protéines originales, jamais associées aux adduits du platine jusqu'à présent. Douze protéines sur les 38 identifiées sont communes aux lésions générées par les trois types de dérivés. Nous allons maintenant discuter, pour celles qui nous ont paru les plus pertinentes, les rôles biologiques connus ainsi que les implications potentielles de leur interaction avec les adduits du platine.

1. Membres de l'interactome déjà connus

Les membres connus de l'interactome sont très majoritairement représentés, au sein de nos résultats, par les protéines à boîte HMG. Plusieurs d'entre elles ont été piégées par nos sondes. HMGB1 est un facteur couramment utilisé lors d'études d'interaction ADN platiné/protéines. Il s'agit d'une protéine nucléaire abondante qui possède une excellente affinité pour les adduits du cisplatine. Tout au long de nos étapes d'optimisation, nous avons constamment cherché à favoriser son interaction puis sa détection, puisqu'elle nous fournissait un témoin fiable de l'efficacité de nos sondes. L'affinité variable d'HMGB1 pour les lésions créées par nos trois dérivés a déjà été décrite (Vaisman *et al*., 1999) lors d'expériences d'EMSA qui ont révélé les préférences suivantes : cisplatine > oxaliplatine = JM118. Cette différence serait due à une déformation plus importante du petit sillon, dans le cas des deux derniers dérivés. Notre approche de protéomique n'ayant qu'un caractère qualitatif, nous n'avons pu mettre en évidence une telle différence entre les trois dérivés testés.

HMGB2, hUBF et SSRP1 sont d'autres protéines à boîte HMG qui reconnaissent les adduits générés par les trois dérivés qui nous intéressent, et que nous avons pu identifier. Spt16, partenaire de SSRP1 au sein du complexe FACT, a été également retenu par les sondes, contrairement au piège développé par Guggenheim *et al*., mais contrairement à ces auteurs nous n'avons pas observé YB-1. Ces mêmes travaux ont montré une spécificité de reconnaissance pour HMGB2 et hUBF, qui ne reconnaissent pas les adduits 1,3-d(GpNpG). Ce n'est pas le cas d'HMGB1 et HMGB3, qui reconnaissent aussi ces adduits mais avec une affinité plus faible que pour l'adduit 1,2-d(GpG). À propos d'HMGB3, ce sont encore les résultats de Guggenheim *et al*. qui ont mis pour la première fois en évidence ses capacités d'interaction avec les adduits du cisplatine. Ici, nous confirmons ces observations et, en parallèle, montrons pour la première fois que HMGB3 est capable de reconnaître les lésions de l'oxaliplatine, mais pas du satraplatine.

L'ADN ligase III a été isolée avec les sondes oxaliplatine et JM118, mais pas avec la sonde cisplatine. Guggenheim *et al*. et Zhu *et al*. sont les premiers à être parvenus à piéger cette enzyme à l'aide de leurs sondes photoactivables. L'ADN ligase III est habituellement recrutée par PARP-1 sur le site des cassures de l'ADN. Guggenheim *et al*. suggèrent que c'est

la présence de PARP-1 qui induit celle de l'ADN ligase III, ce qui est confirmé par Zhu *et al*. qui identifient sur l'adduit interbrin PARP-1, l'ADN ligase III et XRCC1. Cependant, Guggenheim *et al*. soulignent le fait que leur sonde est potentiellement similaire aux adduits du satraplatine, en raison de l'encombrement stérique apporté par le groupement benzophénone. L'absence de l'ADN ligase III sur nos sondes cisplatine paraît aller dans le sens de cette constatation, ce qui montrerait le problème de représentativité de ces sondes photoactivables. Afin de trancher définitivement, il serait donc intéressant de confirmer les capacités exactes de reconnaissance du complexe PARP-1/XRCC1/ADN ligase III.

2. Nouveaux membres de l'interactome

Les 29 protéines jamais décrites auparavant en association avec les adduits des dérivés du platine sont de natures diverses. Trois (TOX4, PNUTS, WDR82) sont regroupées au sein du complexe PTW/PP. Deux sont associées aux télomères (TRF2 et RIF1). Cinq autres (RuvBL2, SMARCA5, TLK1, MTA2, SMC3) ont des fonctions biologiques liées au remodelage de la chromatine. Enfin, deux (MDC1 et ZRF6) semblent directement impliquées dans la réponse aux dommages. Les paragraphes qui suivent résument, pour toutes ces protéines, leurs fonctions biologiques ainsi que l'état des connaissances de leurs liens avec la réparation de l'ADN.

- Le complexe PTW/PP

L'un des résultats les plus significatifs de notre étude protéomique est la capture des membres d'un complexe très récemment décrit, et nommé PTW/PP. Nous allons tout d'abord aborder individuellement chacun des membres de ce complexe, puis l'historique de la découverte de ce dernier. Enfin, nous discuterons les implications biologiques potentielles de son interaction avec les adduits du platine.

TOX4/LCP1 (*TOX HMGB family member protein 4* / *Langerhans cell protein 1*), tout d'abord, est une protéine nucléaire à boîte HMG dont la famille a été découverte relativement récemment (O'Flaherty & Kaye, 2003). La présence d'un domaine HMG séquence-indépendant la rapproche bien sûr d'un grand nombre de protéines déjà évoquées dans ce document. Il ne nous paraît donc pas surprenant de la rencontrer lors de nos expériences de piégeage à l'aide d'adduits du platine. Elle possède également un signal d'adressage nucléaire, et son extrémité N-terminale acide lui confère une activité de transactivation, négativement régulée par la boîte HMG, et potentiellement impliquée dans le recrutement d'autres facteurs (Lee *et al*., 2009). Sa ou ses cibles ne sont actuellement pas connues. L'expression de cette protéine est ubiquitaire mais plus importante dans les testicules et dans les tissus cutanés.

PNUTS (*phosphatase 1 nuclear targeting subunit*) est également une protéine ubiquitaire, à localisation nucléaire. L'un de ses principaux rôles est de se lier à la phosphatase à sérine/thréonine PP1 pour en inhiber l'activité (Kreivi *et al*., 1997), mais également rediriger celle-ci vers le noyau (Allen *et al*., 1998). Elle possède un domaine TFS2N, impliquée dans l'initiation de la transcription (Booth *et al*., 2000). PNUTS se trouve associée avec la chromatine durant l'interphase, exclue des chromosomes condensés au début de la mitose, et réassociée avec ceux-ci en fin de télophase afin de promouvoir leur décondensation (Landsverk *et al*., 2005). La perte de PNUTS, au sein de cellules cancéreuses permet à PP1 d'induire la déphosphorylation de la protéine pRb, ce qui a pour effet de rompre l'association de celle-ci avec E2F1, qui va à son tour stimuler l'activité de la caspase 8 pour induire l'apoptose (De Leon *et al*., 2008).

PP1 n'a pas été spécifiquement retenue sur nos sondes, mais en raison de son implication dans le complexe qui nous intéresse, il nous paraît indispensable d'en dire quelques mots. Sa qualité de phosphatase permet à cette protéine d'intervenir dans la régulation de processus aussi variés que la régulation de la transcription, l'épissage alternatif, la synthèse de protéines, la contraction musculaire, l'influx nerveux, etc. Elle est surtout impliquée dans la progression du cycle cellulaire, notamment la sortie de la mitose, et fait partie des structures chromosomiques. Il existe trois isoformes (α, β, γ) de PP1, qui ne sont pas présentes pas à l'état libre mais forment plutôt des complexes multimériques. PP1 appartenant à une famille de phosphatases à large spectre de substrats, la spécificité de substrat est généralement conférée par le partenaire d'interaction, dont plus de 50 ont été identifiés (Trinkle-Mulcahy & Lamond, 2006).

WDR82 (*WD repeat domain 82*), enfin, fait notamment partie du complexe Setd1A. Après fixation de l'ARN polymérase II sur le site d'initiation de la transcription, Setd1A est recruté suite à une étape de reconnaissance de la polymérase réalisée par WDR82 grâce à ses domaines WD40, utiles pour la détection de modifications post-traductionnelles telles que la Ser5 phosphorylée de la polymérase. Ensuite, Setd1A catalyse la triméthylation de l'histone H3 (en Lys4) sur le site d'initiation de la transcription, ce qui permet une ouverture de la chromatine, puis l'étape d'élongation de la transcription (Lee *et al.*, 2007; Lee & Skalnik, 2008).

Le complexe PTW/PP – Les premiers indices de l'existence du complexe PTW/PP ont été obtenus au cours d'une étude visant à identifier de nouveaux partenaires pour les isoformes α et γ de PP1. Ces travaux faisaient appel à l'immuno-coprécipitation pour isoler les protéines liées aux PP1, identifiées ensuite par protéomique. PNUTS faisait bien sûr partie de cet interactome, mais aussi TOX4 et WDR82 (WD40). Cette présence concomitante ne laissait cependant pas soupçonner l'existence d'un complexe les réunissant, et les auteurs ne

paraissent pas avoir approfondi cette observation, se concentrant sur le facteur Repo-man qui contribue au recrutement de PP1 sur la chromatine (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2006).

C'est lors d'investigations menées sur les partenaires potentiels de PNUTS à l'aide de la méthode du double hybride que l'existence du complexe a été établie (Lee *et al.*, 2009). Les deux protéines présentent une co-localisation nucléaire, formant de nombreux foyers au sein du noyau. La partie C-terminale de TOX4 sert de site de fixation sur la partie N-terminale de PNUTS. Le site d'interaction de cette dernière avec PP1 n'est cependant pas masqué, ce qui permet d'envisager la formation d'un complexe ternaire. L'activité de transactivation de TOX4 est négativement régulée par son interaction avec PNUTS, indépendamment de la présence de PP1. Les structures et sites d'interaction de PNUTS et DDB1 sont visibles sur la Figure 50.

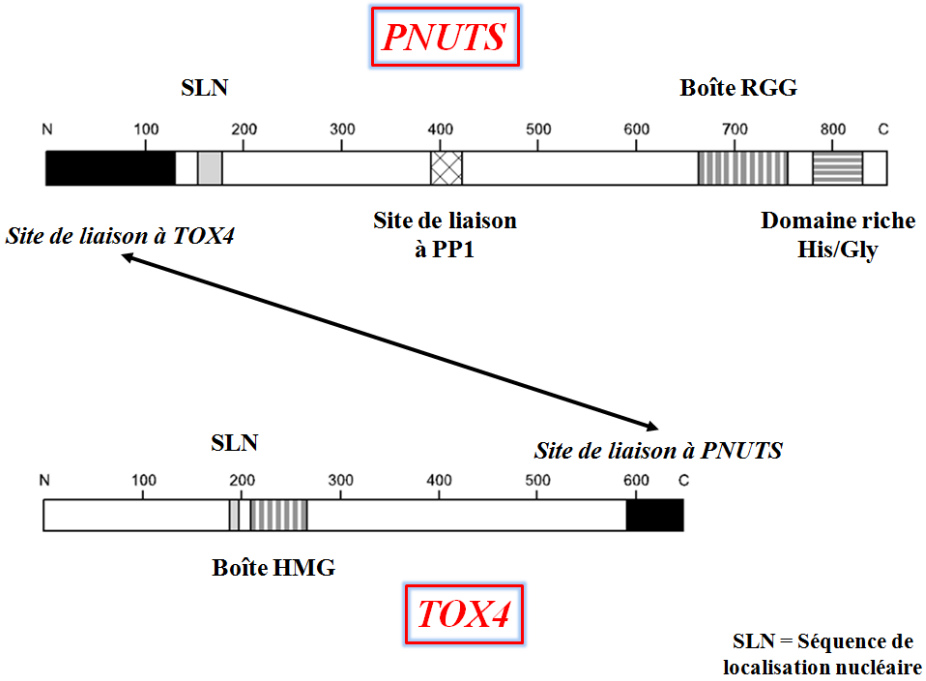


Figure 50 : Les structures et sites d'interaction de TOX4 et PNUTS, membres du complexe PTW/PP (adapté de Lee *et al.*, 2009).

Enfin, la contribution de WDR82 au complexe a été clairement établie lors d'expériences portant sur l'identification de nouveaux partenaires de cette protéine (Lee *et al.*, 2010). L'immunoprécipitation et la spectrométrie de masse ont été employées pour identifier 29 protéines, parmi lesquelles PNUTS, TOX4 et l'une ou l'autre des isoformes de PP1. En revanche, le complexe formé par ces trois facteurs et WDR82 ne contient pas Setd1A, et constitue donc une entité totalement différente du complexe précédemment identifiée pour WDR82. C'est PNUTS qui sert de plate-forme d'assemblage, étant capable de lier chacun des trois autres acteurs du complexe. WDR82, capable de reconnaître des résidus sérine phosphorylés, pourrait contribuer à la reconnaissance de protéines possédant de tels acides

aminés modifiés (sérine/thréonine) pour PP1. TOX4, grâce à sa boîte HMG, servirait de module de reconnaissance de structures particulières de l'ADN.

Le complexe PTW/PP possède une activité phosphatase *in vitro*, et il reste intact à travers toutes les étapes du cycle cellulaire, bien que son association avec les chromosomes ne soit pas constante, et suit celle évoquée plus haut pour la simple PNUTS. L'abolition de l'expression de PNUTS a des effets négatifs sur l'expression de TOX4 et WDR82. Cette déstabilisation du complexe provoque un arrêt du cycle en phase G_2/M et empêche les cellules de progresser vers la phase S, tout en entraînant une proportion de la population vers l'apoptose.

Le complexe PTW/PP et les lésions de l'ADN – Dans l'attente de futurs travaux, le rôle biologique du complexe PTW/PP en lien avec la présence d'adduits platinés sur l'ADN ne peut faire l'objet que d'hypothèses. Bien sûr, il est possible que tout ou partie du complexe soit détourné de ses fonctions naturelles, selon le modèle développé pour les facteurs de transcription mais certainement applicables à d'autres protéines. Un tel mécanisme perturbant la division cellulaire est susceptible de contribuer à la toxicité des dérivés du platine.

Le complexe, de par son activité phosphatase, pourrait également être impliqué dans les voies de signalisation déclenchées par la présence de dommages sur l'ADN. L'influence de PP1 a principalement été étudiée dans le cadre de dommages générés par le rayonnement ionisant (cassures double-brin). Cette protéine joue ainsi un rôle dans le redémarrage du cycle cellulaire vers la mitose après la vérification de l'intégrité de l'ADN. En effet, le point de contrôle en G_2/M est régulé par la kinase ATM, qui bloque la transition d'une phase à l'autre. Plusieurs travaux ont montré que PP1 est elle-même déphosphorylée suite à l'exposition de cellules au rayonnement ionisant. Ce phénomène induit à son tour l'activation de la kinase ATM, et le blocage en G_2/M. Une fois réactivée, PP1 est capable, par une déphosphorylation d'ATM (Guo *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2008), mais aussi de la kinase Chk1 (den Elzen & O'Connell, 2004), d'enclencher une cascade d'événements aboutissant à la phosphorylation de CDC2 et la disparition du blocage. C'est Repo-man, déjà citée plus haut, qui met en contact PP1 et ATM et permet à la première de réguler la seconde (Peng *et al.*, 2010). Ces voies de signalisation sont sans doute plus complexes et enchevêtrées. ATM serait elle-même capable de réguler PP1 par la phosphorylation de sa sous-unité régulatrice I-2, qui en se détachant de PP1 contribue à son activation (Tang *et al.*, 2008).

D'autres facteurs interagissant avec PP1 sont impliqués dans la signalisation des dommages de l'ADN. BRCA1, par exemple, est un facteur suppresseur de tumeur couramment muté dans les cancers mammaires. Cette protéine se trouve activée par ATM qui en catalyse l'hyperphosphorylation après induction de lésions (rayonnement ionisant). Afin de désactiver BRCA1 une fois les dommages réparés, PP1 est capable d'agir sur ATM, on l'a vu, mais aussi d'intervenir directement sur cette protéine (Liu *et al.*, 2002). L'influence de PP1 sur la réparation de l'ADN dépasse probablement la seule prise en charge des cassures

double-brin, car BRCA1 est capable d'induire l'expression des facteur de la voie NER XPC, DDB2 et GADD45 (Hartman & Ford, 2002).

Ces données font état de l'influence de PP1 dans la régulation de mécanismes qui entourent la réparation de l'ADN. Il est également possible de supposer l'existence d'un rôle plus direct dans la signalisation des dommages et leur réparation. Le complexe, assemblé autour de PNUTS, possèderait d'après nos travaux un module de reconnaissance de la lésion (TOX4, grâce à sa boîte HMG), un module de recrutement de facteurs annexes (WDR82, grâce à sa capacité d'interaction avec certaines modifications post-traductionnelles), et un module effecteur (PP1, capable de transmettre un signal ou de réguler l'activité de certaines protéines). Ce modèle, illustré par la Figure 51, requiert un intense travail de recherche pour le valider et identifier les autres facteurs susceptibles d'intervenir en aval de l'interaction du complexe et de la lésion, et ainsi mieux comprendre les conséquences biologiques.

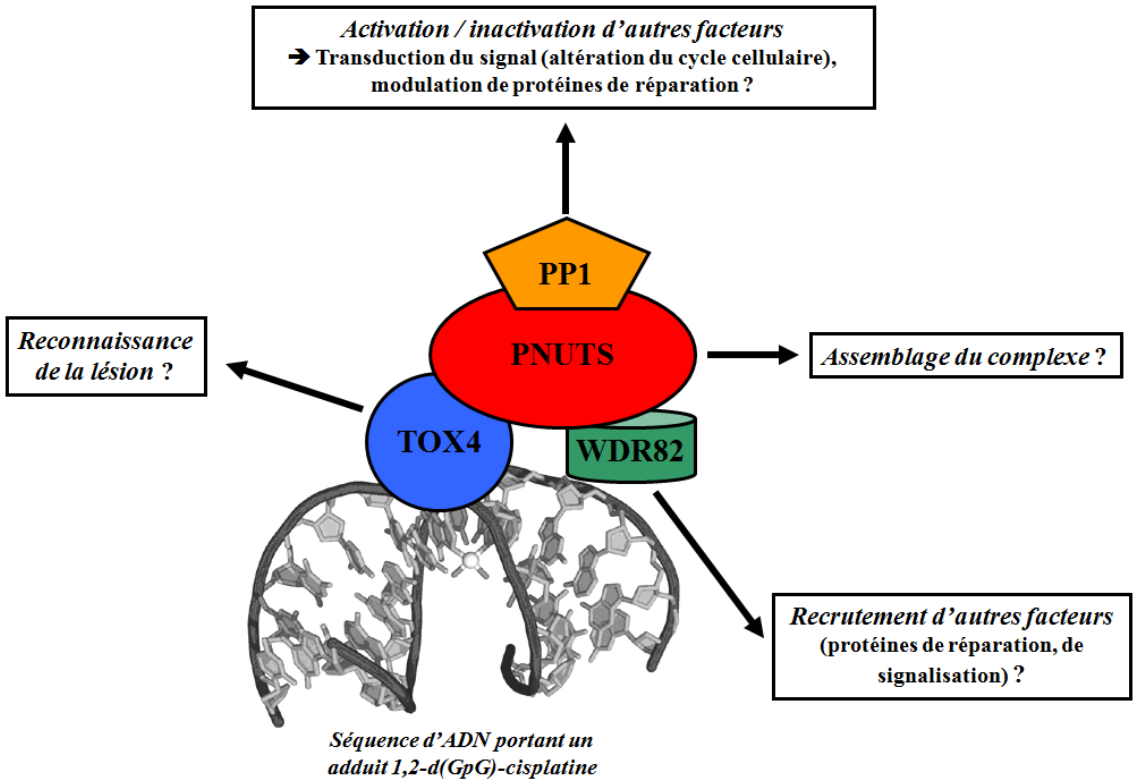


Figure 51 : Modèle proposé pour la reconnaissance des lésions du platine par le complexe PTW/PP, le recrutement de facteurs annexes et leur activation ou la transmission d'un signal.

- TRF2 et RIF1, protéines télomériques

TRF2 fait partie des candidats identifiés avec peu de peptides mais présents sur les sondes portant les adduits de l'un ou l'autre des trois dérivés du platine. *In cellulo*, cette protéine se retrouve au niveau des télomères, complexes nucléoprotéiques localisés aux extrémités des chromosomes. Chez les vertébrés cette extrémité est constituée par des

répétitions en tandem du motif TTAGGG (Broccoli *et al.*, 1997), et s'achève par une section simple-brin de 50 à 200pb de long. Cette séquence sert de substrat aux télomérases pour l'élongation du télomère (Bodnar *et al.*, 1998), ce qui contribue au ralentissement de sa dégradation (perte de séquence lors de la réplication). Le complexe télosome/shelterine régule cette élongation du télomère, et empêche les phénomènes de recombinaison (réarrangements chromosomiques, fusion de chromosomes) pouvant se produire lorsque ces extrémités sont assimilées à des cassures de l'ADN par les mécanismes de réparation (Griffith *et al.*, 1999).

Trois protéines sont capables de reconnaître les répétitions de séquences situées aux extrémités télomériques. Il s'agit de POT1, TRF1 et TRF2 (Xin *et al.*, 2008). Ces trois facteurs font partie, avec d'autres, du complexe télosome/shelterine. TRF2 possède un domaine central TRFH, médiateur de l'homodimérisation de cette protéine, ainsi qu'un domaine C-terminal myb, qui lui permet de se lier directement à l'ADN télomérique double-brin. Alors que TRF1 participe au contrôle de la longueur du télomère, TF2 paraît plutôt jouer un rôle de protection des extrémités ainsi que dans la stabilisation de la boucle t, une structure propre aux télomères qui résulte de l'invasion par l'extrémité simple-brin de séquences double-brin situées en amont (Figure 52). Lors de la perte d'une TRF2 fonctionnelle, les télomères sont assimilés à des cassures double-brin et la voie apoptotique ATM/p53-dépendante est enclenchée. La surexpression de la protéine a été constatée chez certaines lignées tumorales (Ourliac-Garnier *et al.*, 2009). TRF2 est capable de contribuer au recrutement de plusieurs protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, telles qu'ERCC1/XPF (Zhu *et al.*, 2003), les sous-unités Ku de DNA-PK (Song *et al.*, 2000), et PARP-1 (Gomez *et al.*, 2006). Des indices expérimentaux montrent que TRF1 et TRF2 interagissent avec l'ADN télomérique grâce aux N7 des deux premières guanines du motif reconnu : des liaisons hydrogènes sont engagées entre ces atomes et certains acides aminés du domaine myb (Nishikawa *et al.*, 2001; Ourliac-Garnier *et al.*, 2010).

La présence majoritaire de guanines au sein du motif répété du télomère fait de cette structure une cible potentiellement privilégiée pour le cisplatine. En outre, les boucles t des extrémités télomériques paraissent capables de former des structures tridimensionnelles complexes de type quadruplexe G (Figure 52, encadré) au niveau desquelles la formation de mono-adduits est favorisée (Ourliac Garnier & Bombard, 2007).

Cette particularité a inspiré des travaux portant sur les capacités d'interaction de TRF2 avec l'adduit majoritaire du cisplatine, et dont les résultats ont été très récemment publiés (Ourliac-Garnier *et al.*, 2010). Il en ressort que l'affinité de TRF2 pour le motif TTAGGG est très significativement diminuée, *in vitro* et *in cellulo*, par la présence d'adduits du cisplatine. Cette inhibition serait due à l'impossibilité pour TRF2 d'établir avec les N7 des guanines (occupés par l'adduit platiné) les contacts nécessaires à sa fixation sur la séquence. Une telle hypothèse est renforcée par le fait que des lésions touchant une autre position de la guanine, telle que la 8-oxo-dG, ont un effet inhibiteur bien plus faible (Opresko *et al.*, 2005). Ce blocage de la liaison de TRF2 a pour conséquence de limiter les capacités d'invasion par la séquence simple-brin terminale, et donc la formation de la boucle t. Cette limitation est

cependant nuancée par la présence des adduits au sein des motifs répétés, qui vont au contraire stimuler l'invasion grâce aux capacités de déformation des adduits. En parallèle, ces travaux ont montré que l'effet d'inhibition était moins prononcé pour TRF1, probablement car la protéine est plus flexible et capable d'interagir avec des motifs d'ADN séparés par une séquence non liée.

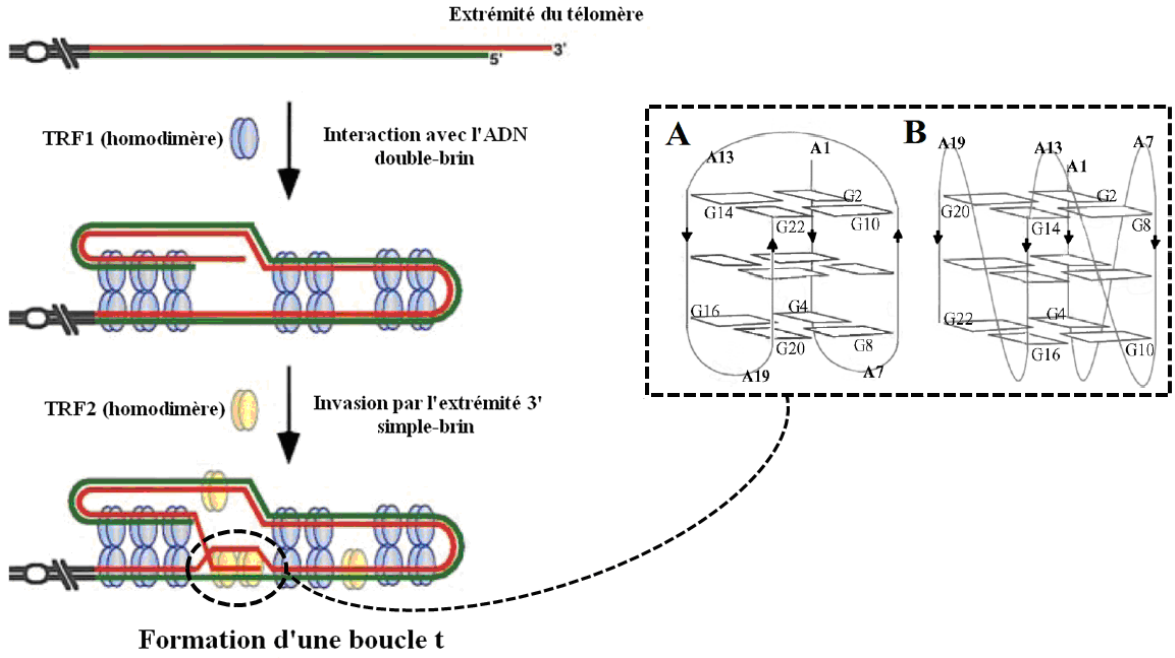


Figure 52 : Modèle proposé pour la formation d'une boucle t à l'extrémité du télomère (adapté de Griffith *et al*., 1999). En encadré : les structures parallèles (A) et antiparallèles (B) du quadruplexe G potentiellement formé par la séquence AGGGTTAGGG (adapté de Ourliac-Garnier & Bombard, 2007).

Les résultats d'Ourliac-Garnier *et al*. sont en contradiction avec nos propres observations, qui ont montré le piégeage de TRF2 sur les adduits à partir d'extraits HeLa. Cette différence pourrait s'expliquer par les hypothèses suivantes. Tout d'abord, rappelons que la validation du piégeage de TRF2 par immunodétection s'est avérée délicate à interpréter. D'autres tests seraient nécessaires pour être certain que son identification n'est pas artéfactuelle. Les différences pourraient également être liées à la nature des séquences d'ADN : ADN plasmidique *versus* sondes mimant l'ADN télomérique. Nous pouvons également formuler une hypothèse plus biologique. La présence de TRF2 sur les lésions platinées peut s'envisager de façon indirecte, à travers son interaction avec un partenaire protéique qui serait lui vraiment en contact direct avec l'ADN lésé. De façon tout à fait intéressante, la capacité de TRF2 à interagir avec PNUTS a été récemment montrée (Kim *et al.*, 2009). Le domaine TRFH, capable de reconnaître certains motifs peptidiques, participerait à la reconnaissance de certains facteurs et permettrait à TRF2 (et TRF1) de servir de plate-forme d'assemblage moléculaire au niveau des télomères. Ainsi, quatre protéines possédant un motif [Y/F]XL ont pu être recrutées grâce au domaine TRFH : TIN2, Apollo, MCPH1 et

PNUTS. L'interaction de TRF2 avec TIN2 participe à la formation du télosome et le recrutement des télomérases, tandis que les interactions de TRF2 avec Apollo et MCPH1 contribuent à la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN. PNUTS, quant à elle, contribue à la modulation de la longueur des télomères lorsqu'elle est associée à la plate-forme TRF2. Cette dernière étant présente à l'état d'homodimère, elle possède deux domaines TRFH et donc la capacité de lier deux cibles identiques ou différentes parmi celles évoquées plus haut (et sans doute d'autres). Ainsi, PNUTS pourrait avoir servi d'intermédiaire à la fixation de TRF2 sur l'ADN, indépendamment ou en conjonction avec le complexe PTW/PP.

Nos analyses ont permis la capture d'une seconde protéine télomérique, RIF1 (*Rap-1 interacting factor 1*). Sa capture n'a pas été réalisée dans toutes les conditions expérimentales, mais elle se retrouve tout de même sur les adduits du cisplatine et du JM118. Le rôle exact de cette protéine n'est pas connu. Cependant, l'homologue de cette protéine chez la levure est associé à une régulation négative de l'élongation des télomères (Hardy *et al.*, 1992), par un processus d'inhibition de la télomérase (Hirano *et al.*, 2009). Chez l'homme, RIF1 s'associe plutôt avec les séquences télomériques altérées, un mécanisme dépendant d'ATM. RIF1 exerce alors un rôle dans les points de contrôle lors de la phase S, inhibant la réplication en présence de cassures double-brin (Silverman *et al.*, 2004). Des observations plus récentes montrent une régulation par cette protéine de la voie HR dépendante de Rad51 (Buonomo *et al.*, 2009). RIF1 est donc impliquée dans des processus de réparation de l'ADN potentiellement liés à l'action des dérivés du platine puisque ceux-ci sont susceptibles de générer des cassures de l'ADN. En raison de la nature de nos sondes nous ne pouvons actuellement exclure le fait que RIF1 se soit associée avec les extrémités de nos sondes, bien qu'elle n'ait pas été retrouvée sur les sondes contrôles. Sa capture suggère cependant une implication potentielle, et restant à vérifier, dans la réparation d'autres dommages que les cassures, même si RIF1 ne paraît pas s'associer directement avec les lésions UV-induites (Silverman *et al.*, 2004). À l'instar de TRF2, il est nécessaire de poursuivre les recherches afin de clarifier le rôle de ces facteurs.

Enfin, nous pouvons achever notre discussion sur l'interactome des adduits du platine par quelques précisions sur d'autres protéines isolées lors de notre analyse.

- Facteurs du remodelage de la chromatine

En plus des protéines à boîte HMG, plusieurs autres facteurs possédant un rôle dans le remodelage de la chromatine ont été retenus par nos sondes. La chromatine est une structure dynamique qui contrôle l'accès aux gènes, et dont l'ouverture nécessite l'action de facteurs spécialisés. En raison de ces fonctions, de telles protéines constituent généralement des régulateurs de la réparation, puisqu'ils contrôlent aussi l'accès à l'ADN lésé. Les protéines concernées identifiées lors de notre analyse vont maintenant être évoquées.

RuvBL2 (*RuvB-like 2*) – Aussi connue sous le nom de reptine, ce facteur n'a été piégé de façon reproductible que dans un seul de nos échantillons, contenant les adduits du JM118. Cette protéine entre en jeu avec la pontine dans plusieurs complexes multimériques dont les fonctions cellulaires sont très variées (Huber *et al.*, 2008). Plus particulièrement, les deux protéines sont des composants du complexe TIP60/NuA4. Celui-ci intervient dans les différentes étapes de la réponse aux dommages de l'ADN, où il joue notamment un rôle d'activateur de ATM (senseur des dommages et activateur des points de contrôle de l'ADN) ainsi que dans le remodelage de la chromatine au niveau du site de la lésion, rendant celle-ci accessible et contribuant au recrutement des facteurs de la réparation (Jha & Dutta, 2009). Un haut niveau d'expression de reptine a été observé au sein de cellules provenant de tumeurs hépatiques. Elle pourrait être responsable de l'apparition du caractère invasif des tumeurs de la prostate (Huber *et al.*, 2008). De plus, cette protéine voit son niveau augmenter au sein du noyau de cellules HeLa suite au traitement de celles-ci avec le cisplatine (Wu *et al.*, 2010). Remarquons enfin que la reptine est également capable de s'associer avec TBP (Bauer *et al.*, 2000), dont les capacités d'interaction avec les adduits du cisplatine ont déjà été évoquées.

SMARCA5 (*SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5*) – Cette protéine, retenue par la sonde JM118, n'avait jamais été associée aux dérivés du platine. Cependant, les travaux de Guggenheim *et al.* (Guggenheim *et al.*, 2009)ont déjà mis en évidence, grâce à la sonde photoactivable portant l'adduit platine-benzophénone, la présence d'autres protéines de la même famille (SMARCA3, SMARCA4 – aussi présente sur nos sondes portants les adduits du cisplatine et du JM118 – SMARCC2, PB-1). Il s'agit de régulateurs connus de la chromatine, qui interviennent particulièrement dans l'activation de l'ARN polymérase II, l'élongation de la transcription, la réparation des cassures double-brin, ainsi que d'autres processus liés au cycle cellulaire (Saha *et al.*, 2006). Remarquons que CSB, qui intervient lors de la mise en place des facteurs de réparation lorsque l'ARN polymérase II est bloquée par une lésion (sous-voie TCR), appartient également à cette famille (Citterio *et al.*, 2000).

TLK1 (*Tousled-like kinase 1*) – Il s'agit d'une kinase à sérine/thréonine qui n'a été observée, au sein de nos échantillons, que sur les adduits de l'oxaliplatine. Ses cibles sont l'histone H3, la protéine chaperonne Asf1, ainsi que la kinase Aurora B (Sunavala-Dossabhoy & De Benedetti, 2009). La surexpression de TLK1 a été associée à une résistance aux rayonnements ionisant (Sunavala-Dossabhoy *et al.*, 2005) et UV (Sen & De Benedetti, 2006) ainsi qu'au cisplatine (Takayama *et al.*, 2010), corrélée à une augmentation de la réparation des dommages induits. Le mécanisme proposé pour les cassures double-brin, dont on sait qu'elles sont formées en tant que dommages secondaires après traitement au cisplatine, implique tout d'abord le recrutement de Asf1 sur le site de la lésion. Cette dernière contribue directement à la déstabilisation du nucléosome, mais recrute également TLK1, dont l'expression augmente en réponse aux dommages. TLK1 promeut alors le détachement de

Asf1 en même temps que le déplacement du nucléosome, afin de permettre aux facteurs de réparation de s'assembler (Sunavala-Dossabhoy & De Benedetti, 2009).

MTA2 (*metastasis-associated protein MTA2*) – Les membres de la famille MTA sont impliqués dans un complexe nommé NuRD régulateur négatif de la transcription grâce à ses capacités de désacétylation des histones, et de remodelage de la chromatine, ce qui est susceptible de les mettre directement en contact avec les adduits du platine. Elles ne réalisent cependant pas l'étape de désacétylation. MTA2 est également un régulateur de p53 qu'elle désactive, toujours par un processus de désacétylation (Toh & Nicolson, 2009). La surexpression de cette protéine a été associée au caractère malin de lignées cancéreuses ovariennes (Ji *et al.*, 2006).

SMC3 (*structural maintenance of chromosome protein 3*) – Au cours de nos analyses, SMC3 a été identifiée sur les lésions générées par les trois dérivés. Les protéines de la famille SMC sont connues pour intervenir dans la maintenance des chromosomes, et notamment leur condensation, ainsi qu'au cours de la réparation de l'ADN. Plus particulièrement, SMC3 constitue avec SMC1 l'une des sous-unités du complexe cohésine, qui participe à la cohésion des chromatides sœurs avant leur ségrégation durant la mitose et la méiose. Ce complexe est également impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN par la voie HR, et sa déstabilisation contribue à sensibiliser des cellules de levure au cisplatine (Schar *et al.*, 2004). Ainsi, la présence de SMC3 sur nos sondes pourrait être due à une interaction avec l'ADN déformé par les adduits, mais aussi avec les extrémités des plasmides linéarisés, reconnues comme des cassures double-brin.

- MDC1

MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) n'a été identifiée que sur notre sonde oxaliplatine. Il s'agit cependant d'une protéine impliquée dans la médiation de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, intervenant notamment dans les points de contrôle en phase S et en transition G_2/M. Elle est recrutée au niveau des cassures double-brin et contribue à l'activation d'ATM pour permettre une pause dans la cycle cellulaire et la réparation de ces dommages (Mochan *et al.*, 2003). La déplétion de cette protéine est d'ailleurs associée à une sensibilisation de lignées cellulaires cancéreuses au cisplatine (Yang *et al.*, 2010).

- ARF6

ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) est une GTPase impliquée dans la mobilité cellulaire (recyclage endosomal de la E-cadhérine, élément des jonctions adhérentes) mais aussi dans la régulation de la division (interaction avec le cytosquelette), notamment lors de la

cytodiérèse pour laquelle elle se révèle essentielle. Parmi les protéines qui interagissent avec ARF6 se trouve Ku70. Les deux facteurs forment un complexe observable durant la mitose (Schweitzer & D'Souza-Schorey, 2005). Nous avons retrouvé l'une et l'autre dans le même échantillon (sondes cisplatine ayant subi un rinçage plus stringent), ce qui pourrait effectivement résulter de ce partenariat. Les conséquences de cette interaction ne paraissent pas encore avoir été identifiées.

Les protéines restantes (ACIN1, DDX46, HSPD1, HEATR1, IQGA1, IF2a et IF2b, LRRC40, NOL11, NOP2/NOL1, PICALM, Pinin, PSIP1, SNRPA1, septine 2, SRP68, ZN638) n'ont pour l'instant par été associées à la réparation de l'ADN. Il ne nous est donc pour l'instant pas possible de trancher sur la pertinence de leur présence sur les adduits du platine, qui reste à éclaircir.

Nos propres investigations mises en parallèle avec les différentes méthodes décrites dans la littérature ont montré qu'il n'existe pas de méthode de *ligand fishing* universelle. Chaque paramètre doit être pesé et évalué, selon que l'on cherche à capturer une protéine ou une famille de protéines spécifiques, ou que l'on souhaite effectuer une prospection en aveugle, identifiant tout ce que l'on peut récupérer grâce au piège. Il est alors crucial de disposer des bons contrôles qui permettront d'éliminer tout faux positif éventuel. Cependant, il apparaît comme également nécessaire de disposer de méthodes protéomiques qui autorisent des comparaisons quantitatives. En effet, on ne peut exclure que des protéines mises de côté lors de nos expériences car présentes sur les sondes contrôles ne présentent en réalité une affinité pour les lésions du platine. On a ainsi vu que des membres directs (PARP-1) ou indirects (PP1) de l'interactome avaient été écartés.

Nous avons pu formuler des hypothèses biologiques liées à l'identification de quelques candidats. Pour certains (TOX4, PNUTS), l'identification protéomique a pu être validée par immunodétection, toujours à partir des échantillons obtenus par *ligand fishing*. Il est clair que ce premier niveau de validation n'est pas suffisant, et doit être complété par d'autres méthodes. L'un des candidats les plus intéressants nous a semblé être TOX4. Nous l'avons donc sélectionné pour valider l'interaction identifiée à l'aide d'une autre approche originale : la SPRi.

VALIDATION DES CAPACITÉS D'INTERACTION DE TOX4 PAR SPRI

I. Matériel et Méthodes

A) Description générale du dispositif

Le principe physique de la SPR a déjà été évoqué au cours de notre analyse bibliographique. Nous allons décrire ici les deux outils nécessaires à la réalisation d'une expérience d'interaction par SPRi : la biopuce, c'est-à-dire le prisme fonctionnalisé avec des sondes oligonucléotidiques, et l'appareil de détection spectroscopique.

1. La biopuce SPRi

La biopuce SPRi se compose de prismes sur lesquels sont greffées des séquences oligonucléotidiques qui font office de sonde. Cette immobilisation est effectuée selon une méthode d'électropolymérisation de séquences d'ADN pyrrolées, mise au point par le laboratoire *Chimie pour la Reconnaissance et l'Étude d'Assemblages Biologiques* (CREAB, SPrAM, CEA Grenoble).

Les prismes de verre sont recouverts d'une mince couche d'or. Ce métal s'avère être un élément de choix pour la SPRi, possédant un minimum de réflectance bien défini lors de la génération des plasmons de surface, autorisant le greffage covalent de molécule à sa surface, et étant relativement inerte face à un tampon physiologique. Plusieurs chimies d'immobilisation des sondes sur la surface d'or sont disponibles (Scarano *et al.*, 2010). Notre méthode de greffage fait appel à une immobilisation directe par chemisorption utilisant le pyrrole (Livache *et al.*, 1994). La surface du prisme est rendue hydrophobe par l'exposition à une solution de thiols, qui forment spontanément une monocouche sur la surface d'or grâce à la forte affinité de ce métal pour ce type de molécule. Ceci permet de confiner les dépôts d'ADN sonde, appelées séquences Zip, sur une faible surface et d'obtenir des plots dont le diamètre est d'environ 400 µm. Le dépôt des sondes (pyrrolées à leur extrémité 5') est effectué de manière semi-automatique à l'aide d'un appareil mis au point au sein du laboratoire CREAB (*Polypotter*) qui positionne automatiquement le cône de dépôt sur la zone cible du quadrillage. L'application d'un potentiel électrique lors de ce dépôt engendre la polymérisation des unités de pyrroles présentes dans la solution de dépôt et sur les séquences sondes, ce qui a pour effet de greffer celles-ci sur la surface. Ainsi fonctionnalisé, le prisme devient une biopuce comportant des zones adressables sur lesquelles on peut fixer des cibles choisies.

L'interaction ADN/protéine est mesurée à l'aide d'une construction [sonde simple-brin greffée/ cible partiellement double-brin portant la lésion]. La séquence cible se compose

elle-même d'un oligonucléotide long (ZipXc, X désignant le numéro de la séquence Zip), complémentaire de la séquence sonde et d'un oligonucléotide supportant l'adduit platiné. Cette cible est hybridée sur la sonde au début de chaque série d'expérience. Ce concept de « code Zip » a été mis au point pour la construction de puces à ADN utilisant la fluorescence pour méthode de détection (Gerry *et al.*, 1999). La forme finale et fonctionnelle de la construction [sonde/cible] est représentée par la Figure 53. Par commodité de lecture, les plots ne seront désignés, sur les figures présentant les résultats, que par le nom de l'agent platiné dont les constructions portent la lésion.

L'oligonucléotide choisi pour supporter les lésions 1,2-d(GpG) du cisplatine, de l'oxaliplatine et du JM118 a déjà été employé pour étudier l'affinité des deux boîtes HMG d'HMGB1 pour ce même adduit généré par le cisplatine (He *et al.*, 2000b). Il possède un site TGGA qui, après exposition de la séquence à un dérivé du platine, permet d'obtenir un site de platination unique et ainsi sélectionner le pontage qui sera produit.

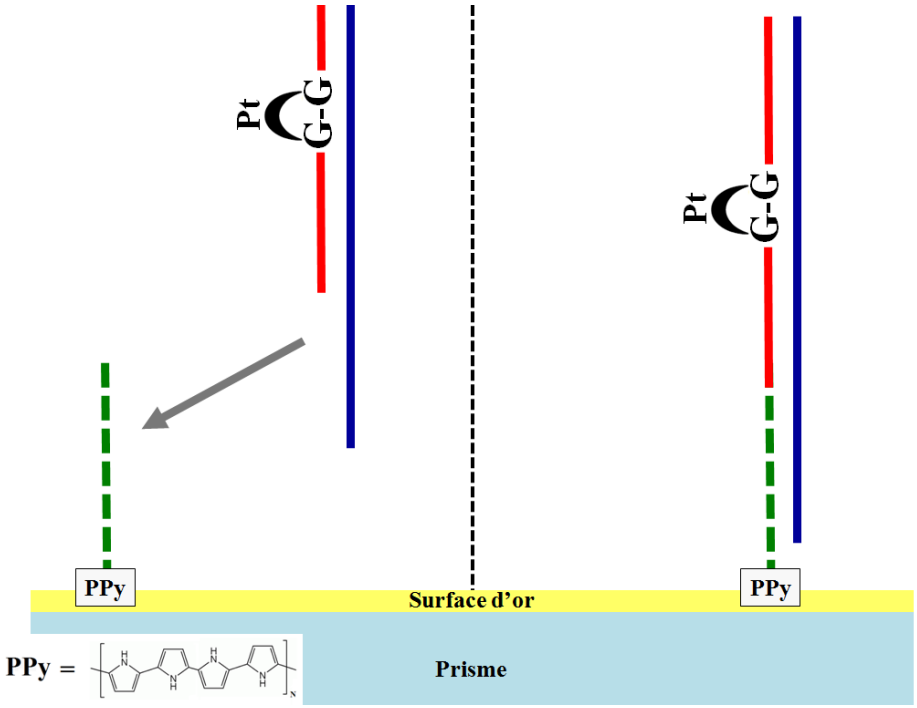


Figure 53 : Assemblage de la séquence [sonde-cible lésée] à la surface du prisme SPRi. La séquence portant la lésion (rouge) est préalablement hybridée avec sa séquence complémentaire (bleue). Cet oligonucléotide partiellement double-brin est ensuite hybridé avec la sonde greffée sur le prisme (verte discontinue) grâce à une chimie polypyrrole (PPy).

La Figure 54 représente les plans de dépôt utilisés au cours de ce travail de thèse. Le plan de dépôt A (5 x 5) a été utilisé afin de déterminer les conditions expérimentales les plus propices à la construction de la biopuce puis à l'étude de l'interaction de protéines. Il comprend trois séquences sondes Zip différentes : Zip7, permettant d'hybrider la cible portant l'adduit 1,2-d(GpG)-cisplatine ; Zip9, permettant d'hybrider la cible portant l'adduit 1,2-d(GpG)-oxaliplatine ; Zip6, permettant d'hybrider la cible non lésée, et les plots contrôles

(ADN simple-brin, pyrroles). À ces séquences Zip s'ajoute une séquence simple brin sans rapport avec nos sondes (ASO-A-24), ainsi que des dépôts contrôle (polypyrrole sans ADN, PPy). Toutes ces sondes ont été déposées sur la puce à une concentration unique dans la solution de dépôt (10µM), un paramètre qui influe sur la densité du greffage. Il est en effet possible d'adapter la densité de greffage des sondes Zip en faisant varier leur concentration dans la solution de dépôt. C'est ce que nous avons effectué sur le plan de dépôt B (7 x 7), en ajoutant une quatrième séquence Zip afin d'inclure l'oligonucléotide portant un adduit 1,2-d(GpG)-JM118 et en réalisant des greffages à concentration croissante.

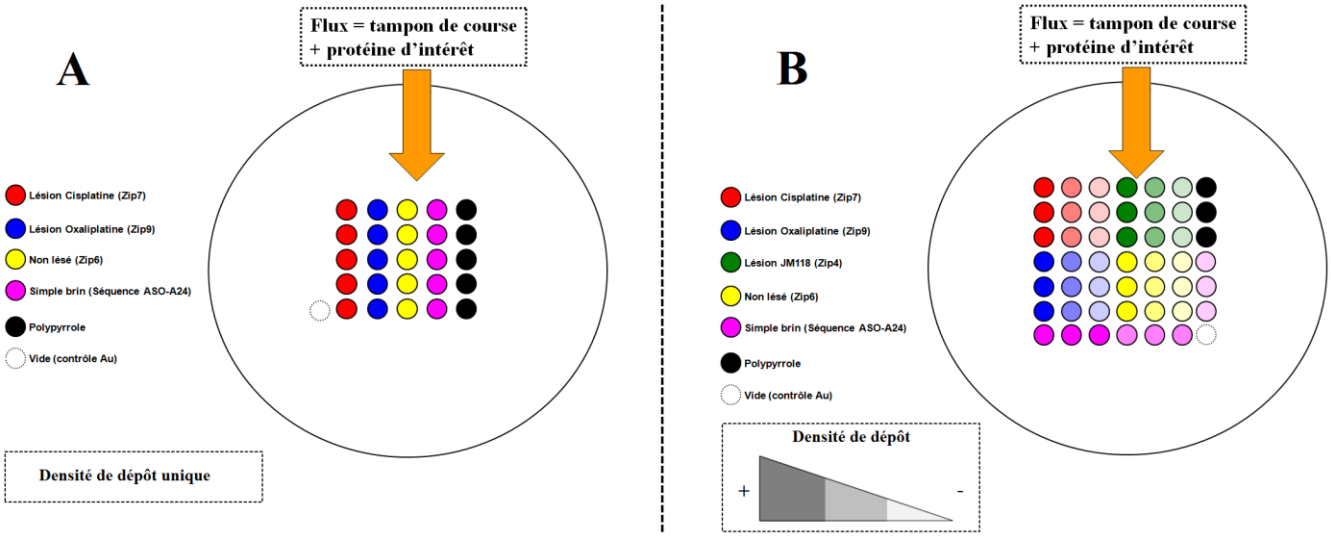


Figure 54 : Plans de dépôt des prismes utilisés. Les expériences de mise au point ont été réalisées sur des prismes simples (A) comportant deux lésions (cisplatine et oxaliplatine) ainsi que les contrôles appropriés, et sur lesquelles les sondes ont été greffées à une densité unique. Les expériences de validation d'interaction ont été réalisées sur des prismes plus complexes (B) comportant en plus la lésion JM118 et sur lesquels les densités de greffage des sondes ont été variées (le degradé de couleur représente ces densités variables).

2. Dispositif expérimental

Le système de détection a été intégralement mis au point par Jean-Bernard Fiche, ancien doctorant du CREAB. À l'instar d'un grand nombre de systèmes « faits maison » ou commerciaux, il utilise la configuration géométrique de Kretschmann (Scarano *et al.*, 2010) décrite par la Figure 55. Plus précisément, il se compose d'une source de type LED qui émet un rayon lumineux (λ = 635nm), parallélisée par une première lentille, puis polarisée avant d'arriver sur l'une des faces du prisme. La lumière réfléchie est ensuite focalisée par une seconde lentille avant d'arriver sur une caméra CCD qui en mesure l'intensité. Le prisme, quant à lui, est disposé dans une cellule dont la température peut être précisément contrôlée par un appareil de régulation ITC temperature controler (Oxford Instruments) couplé au programme Regulation6 Labview (GenOptics), ce qui constitue l'un des principaux avantages de ce système face aux appareils commerciaux. Un anneau métallique déposé sur le prisme et

la présence d'un joint sur le haut de la cellule permettent de créer un volume imperméable qui sert de chambre de travail, centrée sur la zone fonctionnalisée du prisme.

Le tampon de course est injecté dans le système à l'aide d'une pompe à seringue Cavro XLP 6000 (Cavro Scientific Instruments) et passe à travers la membrane d'un dégazeur Elite degassing system (Alltech) avant d'arriver à une valve à six voies, qui permet d'injecter les échantillons. Sur celle-ci peut être placée une boucle choisie en fonction du volume que l'on souhaite injecter : nos expériences ont tout d'abord utilisé une boucle PEEK 500µl, puis une boucle PEEK 1ml (Interchim). L'ensemble de l'appareillage est placé dans un incubateur West 6100+ (West Instruments) qui permet de contrôler la température de l'environnement du système (fixée à 25°C). Le tout est contrôlé par le logiciel LabView (GenOptics). La Figure 55 représente le système utilisé avec tous ses éléments.

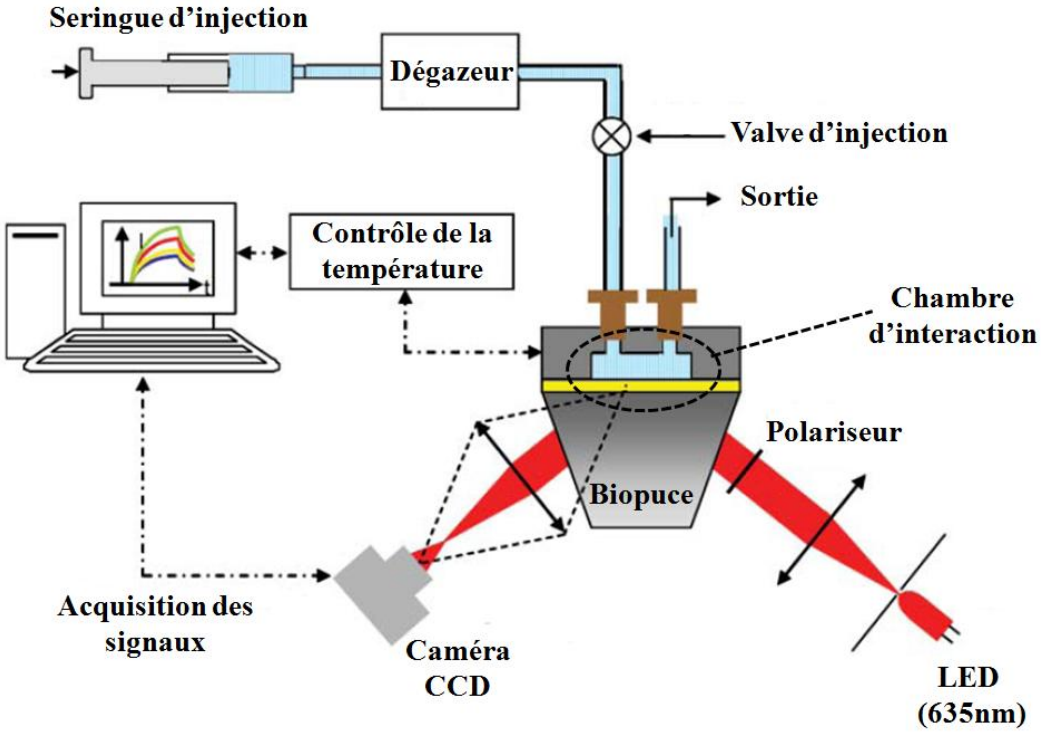


Figure 55 : Représentation schématique du système mis au point au sein du laboratoire CREAB (adapté de Corne *et al*., 2008).

La SPRi diffère des systèmes traditionnels par le fait que les mesures sont réalisées à angle fixe (Scarano *et al.*, 2010). Sur le système que nous avons utilisé, et contrairement aux systèmes automatisés vendus par les sociétés spécialisées, il n'est pas possible au logiciel de déterminer seul l'angle θ_r. Une définition manuelle de l'angle de travail optimal (2° au dessus du minimum de réflectivité déterminé visuellement par l'utilisateur) est donc effectuée. Cet angle restera fixe tout au long de chaque expérience. Remarquons d'ailleurs que lorsque l'on travaille à angle fixe, la relation entre réflectivité et changement de masse n'est linéaire que dans la partie linéaire de la courbe plasmon. Ceci limite la détection à une variation d'environ 5% (Scarano *et al.*, 2010).

Avant de définir la zone de travail sur la puce, une référence correspondant au bruit de fond est mesurée, ainsi que des références pour chaque polarité de la lumière (p et s). Une microstructuration de la surface peut ensuite être accomplie afin de définir la zone de travail. Il s'agit de sélectionner à l'écran des régions d'intérêt (ROI), *i.e.* les zones qui, pour chaque dépôt, permettent d'obtenir la meilleure qualité de signal. Généralement, ces zones sont circulaires et se trouvent au centre du dépôt, et la sélection se fait sur un diamètre de 300 à 350µm. Une étiquette correspondant au type de sonde est attribuée à chaque ROI pour laquelle un sensorgramme unique sera généré, dont le signal est une moyenne de l'ensemble des mesures effectuées au sein de la zone définie. Des contrôles négatifs correspondant à un dépôt de pyrrole sans ADN ainsi qu'à la surface d'or nue sont aussi compris dans les zones d'intérêt.

La variation de l'intensité de la lumière réfléchie est mesurée lors de l'interaction sonde/analyte, et les signaux sont traités par le logiciel pour fournir une image de la surface montrant l'évolution de l'interaction, ainsi qu'un sensorgramme chiffrant la variation observée pour chacune des régions d'intérêt définies.

Les étapes majeures d'une expérience courante de SPRi utilisant le système que nous venons de décrire sont résumées sur la Figure 56. L'étape d'interaction, quant à elle, est décrite par la Figure 57.

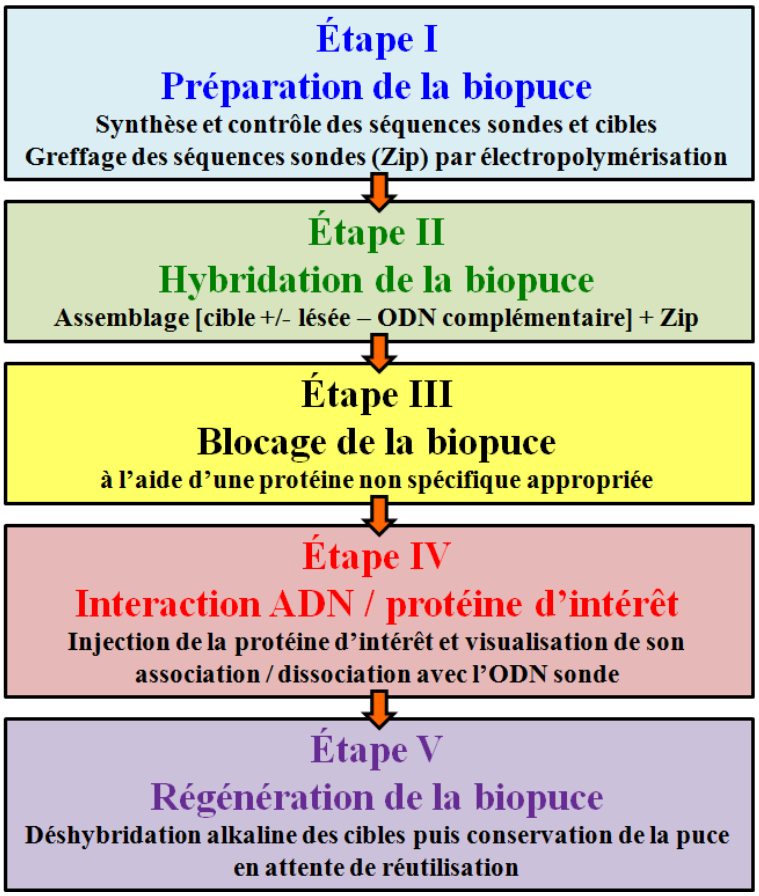


Figure 56 : Les différentes étapes d'une expérience de SPRi.

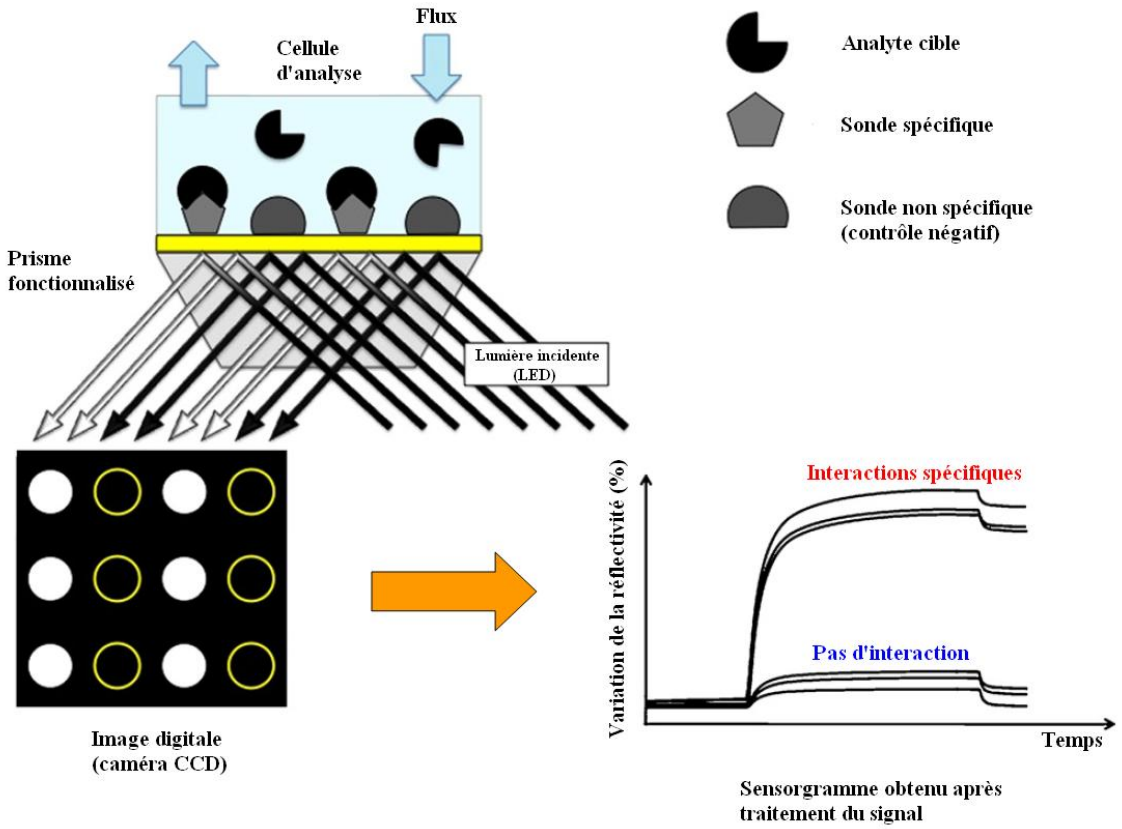


Figure 57 : Aperçu de l'analyse SPRi. Les analytes cibles sont injectés dans la cellule d'analyse et interagissent spécifiquement avec certaines des sondes greffées sur le prisme. Cela produit une variation de la réflectivité de la lumière incidente, mesurée par la caméra CCD. Les signaux sont enregistrés et convertis pour produire des sensorgrammes représentatifs des événements se produisant à la surface de la biopuce (adapté de Scarano *et al.*, 2010).

Les expériences précédemment menées dans notre laboratoire ont fait appel à ce protocole avec des objectifs variés. Par exemple, les différences d'affinité de p53 pour diverses séquences identifiées au sein de promoteurs ont pu être analysées. Les constantes de dissociation ont été déterminées pour chacune des séquences, confirmant des résultats obtenus par d'autres approches (Maillart *et al.*, 2004). Plus récemment, Corne *et al.* ont étudié l'affinité et les capacités d'excision de la glycosylase Fpg sur deux lésions, la 8-oxo-dG et la cyclo-adénine (Corne *et al.*, 2008).

B) Protocoles détaillés

1. Prismes

Nous disposons de prismes SPRi (GenOptics, Orsay) dont la taille est de 1,25 x 2,4 cm et dont l'angle formé entre la surface d'or et les côtes est de 60°. Ils sont recouverts d'une fine (50 nm) couche d'or, dont l'adhésion sur le verre est assurée par la présence d'une couche de chrome (2 nm). L'indice de réfraction du verre est n = 1,7.

2. Synthèse des séquences sondes et cibles

La construction de la puce à ADN fait appel à l'utilisation de différentes séquences oligonucléotidiques, dont la description suit (Tableau 15).

Cible		5'-CCT CTC T***GG*** ACC TTC C-3'
Séquences Zip	Zip4	5'-Py-(5T)-TGC GGG TAC AGC ACC TAC CTT GCG-3'
	Zip6	5'-Py-(5T)-GAC CGG TAT GCG ACC TGG TAT GCG-3'
	Zip7	5'-Py-(5T)-TGC GAT CGC AGC GGT AAC CTG ACC-3'
	Zip9	5'-Py-(5T)-GAC CAT CGT GCG GGT AGG TAG ACC-3'
Séquences complémentaires	Zip4c	5'-GGA AGG TCC AGA GAG GCG CAA GGT AGG TGC TGT ACC CGC A-3'
	Zip6c	5'-GGA AGG TCC AGA GAG GCG CAT ACC AGG TCG CAT ACC GGT C-3'
	Zip7c	5'-GGA AGG TCC AGA GAG GGG TCA GGT TAC CGC TGC GAT CGC A-3'
	Zip9c	5'-GGA AGG TCC AGA GAG GGG TCT ACC TAC CCG CAC GAT GGT C-3'

Tableau 15 : Séquences utilisées lors de la construction de la biopuce SPRi.

Longues de 24 bases, les séquences Zip se composent de six tétramères qui doivent permettre d'éviter toute hybridation croisée, et dont les températures de fusion sont similaires. À cela s'ajoute, en 5', une queue poly-T (cinq bases supplémentaires) ainsi qu'une chaîne de six carbones, qui éloigne la séquence de la surface d'or et la rendent plus accessible. La molécule est terminée par une fonction amine qui sert au couplage pyrrole. Ces oligonucléotides aminés sont obtenus auprès d'un fournisseur extérieur (Eurogentec France, Angers) et le couplage réalisé au laboratoire. La fonction amine présente sur les oligonucléotides-C_6-NH_2 permet d'effectuer un couplage avec la molécule pyrrolée Py-C_{11}-NHS (conservée dans le DMSO). Quatre-vingts équivalents (1 820nmol) de la molécule pyrrolée sont mis en présence de l'oligonucléotide Zip aminé (22,7nmol) dans une solution 50mM $NaHCO_3$ pH8 (volume final = 1ml) durant 01h00 à température ambiante à l'abri de la lumière. L'oligonucléotide Zip pyrrolé est ensuite lyophilisé, repris dans 200µl de tampon 25mM TEAA 5% ACN puis purifié par un gradient CLHP (Tableau 16) sur une colonne LiChrospher 100 RP C_{18} endcapped 5µm (Agilent Technologies) avec un débit d'1ml/min.

La séquence cible, longue de 16 bases et comportant un site GG unique destiné à porter la lésion, a été synthétisée au laboratoire par Didier Gasparutto en utilisant une chimie phosphoramidite. Après filtration, le produit a été dilué dans une solution 10mM TEAA et purifié par CLHP sur une colonne C_{18} Hypersil 5µ (Thermo) avec un gradient dont les étapes sont résumées dans le Tableau 17, sur un système CLPHP Agilent 1100 (Agilent Technologies).

Temps (min)	**% A** (25mM TEAA, 5% ACN)	**% B** (25mM TEAA, 50% ACN)
0	90	10
25	60	40
30	25	75
35	0	100
40	90	10

Tableau 16 : Gradient utilisé pour la purification des oligonucléotides pyrrolés.

Temps (min)	**% A** (10mM TEAA)	**% B** (ACN)	**% C** (1% Acide trifluoroacétique)	**Étape**
0	100	0	0	Élimination des arrêts de synthèse
15	91	9	0	
17	100	0	0	Équilibre
27	100	0	0	Détrytilation acide
37	0	0	100	
39	100	0	0	Équilibre
49	100	0	0	Élution de l'oligonucléotide
69	85	15	0	
75	40	60	0	Rinçage de la colonne
77	100	0	0	Équilibre

Tableau 17 : Gradient utilisé pour la purification de l'oligonucléotide cible.

Le pic correspondant à l'oligonucléotide (t = 65min ; %B = 12) a été collecté puis lyophilisé et repris dans de l'eau, et la masse contrôlée par MALDI-TOF (mode négatif, voir plus bas).

3. Platination des cibles

La réaction de platination de la cible se fait dans un volume total de 200µl contenant 40nmol de l'oligonucléotide et 300nmol de la solution platinée (cisplatine ; oxaliplatine ; JM118). Une incubation de 24h00 à 37°C sous agitation légère et à l'abri de la lumière est réalisée. Remarquons que la cinétique de formation de l'adduit 1,2-d(GpA) est lente en comparaison des adduits majoritaires (Hambley T.W. & E.M., 1998; Hambley *et al.*, 1998), ce qui explique la très faible proportion de cette lésion dans l'ADN exposé aux dérivés du platine (Todd & Lippard, 2009). Unique lésion « parasite » susceptible de se former sur la séquence que nous avons choisie, nous la considérons ici comme négligeable en raison de cette faible réactivité du site AG.

La purification du produit se fait par CLHP en utilisant un matériel strictement identique à la purification des standards de lésions platinées. Après mise en condition initiale

(10mM TEAA) de l'échantillon, 20nmol sont injectées et subissent un gradient de purification dont les conditions sont présentées dans le Tableau 18.

A

Temps (min)	**% A** 10mM TEAA	**% B** ACN
0	96	4
3	96	4
45	85	15
47	10	90
49	10	90
50	96	4

B

Temps (min)	**% A** 10mM TEAA	**% B** ACN
0	93	7
3	93	7
45	86	14
47	90	90
49	90	90
50	93	7

Tableau 18 : Gradients utilisés pour la purification des oligonucléotides lésés par le cisplatine et le JM118 (A) et l'oxaliplatine (B).

Les profils chromatographiques pour chaque type d'oligonucléotide lésé sont présentés sur la Figure 58.

Le ou les pics majoritaires sont collectés, séchés puis repris dans de l'eau, dosés et contrôlés par MALDI-TOF (mode négatif, Figure 59 ; Christine Saint-Pierre) sur un système Biflex (Bruker). La concentration de tous les stocks d'oligonucléotides Zip, cible non lésée/lésée est ajustée à 100µM, et chacun d'entre eux est conservé à -20°C. On remarque de plus sur la Figure 58-D que la platination de l'oligonucléotide avec le JM118 conduit à la formation de deux espèces. Après collecte des deux pics correspondants, le contrôle MALDI-TOF a montré que les deux espèces possèdent une masse identique.

À l'instar de l'observation faite lors de la préparation de l'adduit standard 1,2-d(GpG)-JM118, nous sommes en présence des deux isomères qu'il est possible d'obtenir lors d'une telle synthèse. Le pic n°2, contenant l'adduit au rendement plus élevé, a été retenu. Ceci a permis de travailler avec une cible homogène plus proche de la réalité biologique.

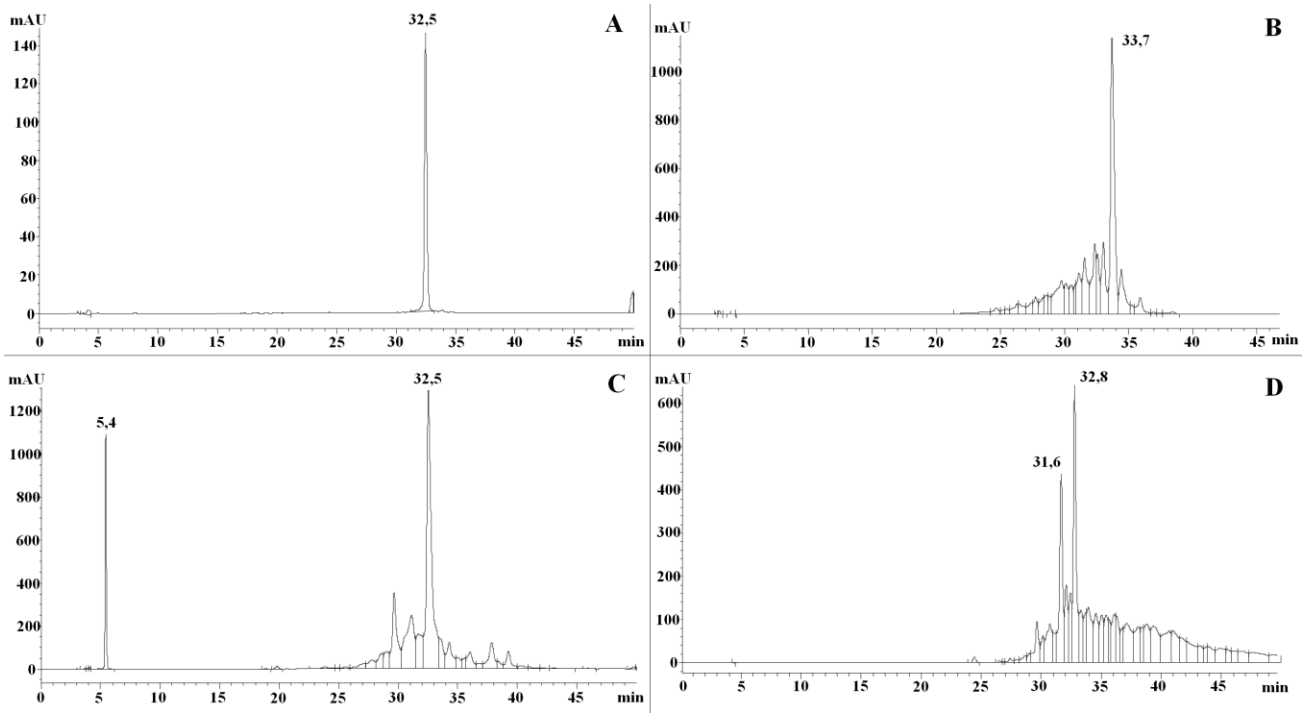


Figure 58 : Purification de l'oligonucléotide SPRi (chromatogrammes de CLHP) : non lésé (A) ; portant un adduit cisplatine (B) ; portant un adduit oxaliplatine (C) ; portant un adduit JM118 (D).

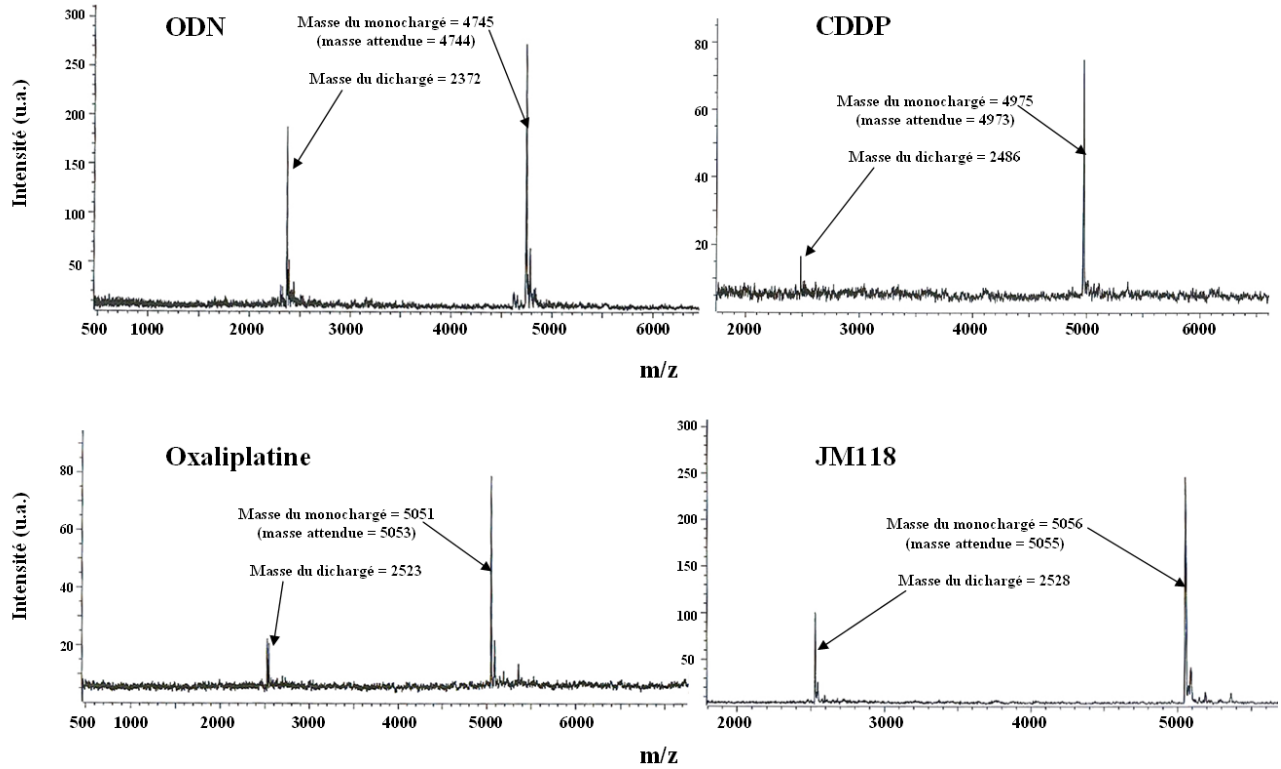


Figure 59 : Les spectres de vérification de masse obtenus par MALDI-TOF pour chacun des oligonucléotides obtenus : (A) non lésé ; (B) portant un adduit 1,2-d(GpG)-cisplatine ; (C) portant un adduit 1,2-d(GpG)-oxaliplatine ; (D) portant un adduit 1,2-d(GpG)-JM118.

4. Dépôt des sondes sur le prisme par électropolymérisation

L'immobilisation des sondes oligonucléotidiques sur le prisme suit une méthode d'électropolymérisation de séquences poly-pyrroles couplés à l'ADN, mise au point par le laboratoire CREAB (Fiche *et al.*, 2008). La surface du prisme est rendue hydrophobe par un bain de 15min dans une solution d'EtOH 0,5% 1-dodécanethiol (Honeywell Riedl-de Haën). Les propriétés hydrophobes sont contrôlées visuellement à l'aide d'une goutte d'eau, puis l'excès de thiols est éliminé par rinçage EtOH et séchage à l'argon.

Une solution de dépôt GDALi-PPy est préparée, contenant 100mM $LiClO_4$ 20% DMSO 30% ACN 0,5% glycérol et 20mM final (après ajout de l'ADN) polypyrrole (PPy). Les sondes oligonucléotidiques pyrrolées (séquences Zip, [stock] = 100µM) sont diluées aux concentrations souhaitées (ont été testées : 0,5, 2, 5 et 10µM) dans cette solution de dépôt. L'appareil de dépôt *Polypotter* contrôle les distances de quadrillage de la zone de dépôt et place automatiquement le cône sur la ROI. Chaque point est réalisé en prélevant 3µl de la solution Zip-pyrrole à l'aide d'un cône modifié contenant une électrode de platine, puis en plaçant automatiquement le cône-électrode en contact avec la surface d'or, sur la ROI désirée. L'électropolymérisation est effectuée par application d'un courant électrique de 2,4V durant 0,1sec à l'aide d'un potentiostat galvanostat PG 263 (Princeton Applied Research). Cet appareil a ensuite été remplacé par un Autolab Stat30 (Echo Chemie Metrohm) sous le contrôle du programme GPES Manager (Autolab). La solution est ensuite éliminée et remplacée par un autre volume (solution identique pour réplicat ou solution contenant une autre séquence Zip). Trois rinçages à l'aide de la solution GDALi-PPy sont réalisés entre les dépôts des différentes sondes Zip. À l'issue de la phase de dépôt le prisme est rincé à l'eau, séché avec de l'argon et conservé à 4°C sous atmosphère d'argon. L'électrode de platine est rincée puis conservée dans des conditions identiques. L'aspect de la surface fonctionnalisée (plan de prisme B) est visible sur la Figure 60.

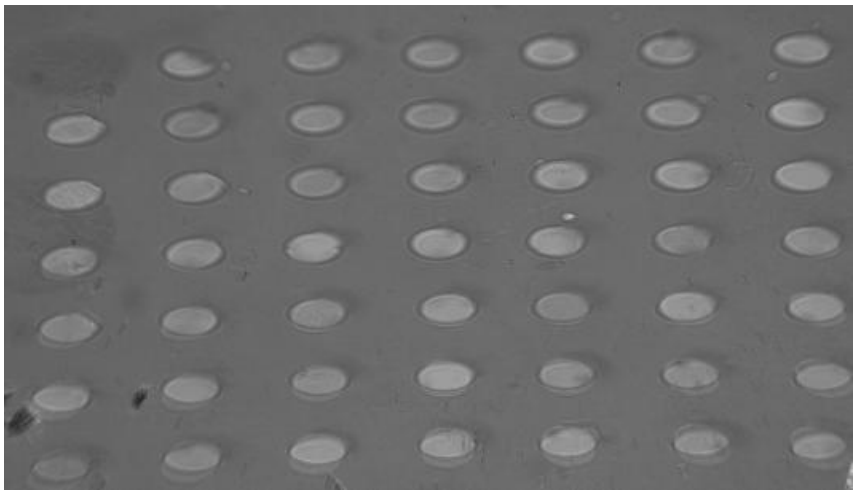


Figure 60 : Surface du prisme après greffage des séquences sondes Zip (image enregistrée par la caméra du système de détection).

5. Analyse SPRi

Chaque analyse SPRi nécessite de placer le prisme dans la cuve d'analyse et d'effectuer les réglages indiqués lors de la description du système. Le tampon de course est identique à celui utilisé pour le *ligand fishing*. Des lots (1L) sont préparés, aliquotés en tubes 50ml et conservés à -20°C afin de garantir une meilleure reproductibilité des expérimentations. Le DTT est ajouté extemporanément. Le débit choisi pour le tampon de course est 2,5ml/h (41,6µl/min), les injections de protéines et de cibles lésées sont faites durant 20min (V < 1ml).

Une fois le matériel en place, la température est fixée à 37°C, et un temps est laissé afin que les sensorgrammes se stabilisent. Ensuite, la surface de la puce est bloquée en réalisant 2 ou 3 injections d'1ml de tampon de course contenant 1% de la protéine non spécifique adaptée. Ici c'est l'albumine de sérum bovin BSA (Sigma) qui est choisie en raison de son point isoélectrique (pI = 5,6) proche de celui de la protéine testée. Ceci permet d'éviter que les deux protéines présentent des charges opposées dans les conditions imposées par le tampon de course (pH = 7,8), et donc soient potentiellement amenées à interagir l'un avec l'autre. Cette étape de blocage est réalisée en premier, mais il faut savoir que dans nos conditions elle n'influe ni sur l'hybridation des cibles sur les sondes greffées, ni sur l'interaction de la protéine d'intérêt avec les constructions oligonucléotidiques.

Les séquences cibles lésées (275nM) et leurs séquences complémentaires (40pb, 250nM) sont mélangées dans 1,4ml de tampon de course. Chaque solution est chauffée à 95°C durant 5min puis placée à température ambiante afin de réaliser l'hybridation. Les cibles double-brin sont ensuite séquentiellement injectées sur le système afin de réaliser l'hybridation des sondes et des cibles. Avant l'injection des protéines, la température de la cuve est abaissée à 25°C et un temps est là encore laissé afin que les courbes se stabilisent.

La détection SPRi est extrêmement sensible à toute variation de composition du tampon, notamment sa salinité, susceptibles de générer des sauts d'indice masquant le signal d'intérêt. Afin d'améliorer la qualité de ce dernier, il a été nécessaire de réaliser des coupures franches lors des injections pour éviter les zones où le tampon de course et son contenu (ADN ou protéine) sont dilués (extrémité de la boucle). De ce fait, l'injection est systématiquement interrompue avant que le volume de la boucle soit totalement injecté.

Les protéines testées sur nos sondes SPRi sont des protéines recombinantes commerciales :

- HMGB1 (complète, tag GST – Abnova) ; pI (protéine + tag) = 5,8
- TOX4 (complète, tag GST – Abnova) ; pI (protéine + tag) = 5,2

Les points isoélectriques ont été calculés à l'aide de l'outil Compute pI/MW (SIB Expasy ; url : expasy.org/tools/pi_tool.html). Des lots identiques de ces protéines ont été utilisés afin d'assurer la reproductibilité des expériences successives.

Les lots de protéines commerciales présentent des concentrations différentes (270nM - 5µM), ce qui implique, lors de la préparation de l'échantillon à injecter, une dilution du

tampon variable du tampon de course, dont on a vu qu'elle risquait d'engendrer un saut d'indice préjudiciable au suivi de l'interaction. Afin d'éviter cela, les protéines sont reprises extemporanément dans le tampon de course grâce aux colonnes VivaSpin (Sartorius), selon le protocole du fabricant en ajoutant une étape préalable de bloquage de leur surface à l'aide d'une solution 5% Tween-20 durant 02h00. Les protéines sont ensuite conservées sur glace en attente d'injection dans des tubes à faible capacité d'adsorption LoBind.

Après observation de l'éventuelle dissociation de la protéine lors de la phase de rinçage, les protéines fixées restantes peuvent être décrochées par l'injection brève (1,5min) d'une solution 1,5M NaCl, ce qui a pour effet de rompre l'interaction ADN lésé/protéine et restaurer le niveau basal du sensorgramme. En fin d'expérience, une régénération alcaline est effectuée par l'injection brève (1,5min) d'une solution 0,1M NaOH, ce qui a pour effet d'éliminer la construction ODN/ZipC de la surface de la biopuce. Après un rinçage abondant à l'eau, celle-ci peut-être stockée à sec sous argon et à 4°C. Cette méthode de conservation doit permettre de réutiliser la puce jusqu'à un mois après le greffage sans diminution trop importante du signal.

Les signaux sont traités à l'aide du programme Excel. Au sein d'un groupe de plots identiques, le signal est moyenné en éliminant si nécessaire les ROI ayant produit des données trop différentes, par exemple lors d'un greffage imparfait. Les données correspondant à la phase d'hybridation des séquences cibles lésées sur les sondes greffées sont normalisées en retranchant le signal observé sur les sondes PPy. Les signaux mesurés lors des phases d'interaction ADN/protéine ont fait l'objet d'une normalisation à partir du signal enregistré pour chaque type de sonde lors de l'hybridation des séquences cibles. Les coefficients de normalisation appliqués à chaque sonde sont obtenus de la façon suivante : le signal moyen final de chaque groupe de plots représentatifs d'une condition est calculé ; le coefficient est ensuite déterminé de façon à ajuster tous les signaux d'hybridation au niveau de celui observé pour l'oligonucléotide non lésé, qui sert ici de référence ; enfin, chaque coefficient est appliqué à l'ensemble des mesures enregistrées pour chaque groupe de sondes.

6. Régénération totale de la biopuce

Une régénération totale du prisme, *i.e.* nettoyage complet de la surface d'or, est possible. Elle est réalisée en deux étapes : une incubation sur la nuit dans une solution à 10% d'eau de Javel, puis un traitement avec une solution de *piranha* (70% acide sulfurique, 30% H_2O_2) durant 5min (le prisme étant disposé verticalement dans le récipient en verre afin que les bulles balayent la surface) suivi de plusieurs rinçages à l'eau. L'efficacité de cette régénération est vérifiée en visualisant le prisme sur le système SPRi : les plots ne doivent avoir laissé aucune trace. Cette procédure peut être effectuée une à deux fois par prisme avec un minimum de risque d'altération.

II. Résultats

En parallèle de l'établissement de l'interactome des lésions platinées par un piège à large spectre, nous avons souhaité mettre au point un second système permettant de valider individuellement les interactions observées, à partir de protéines purifiées. Nous nous sommes donc tournés vers la SPR, à l'origine de plusieurs microsystèmes déjà utilisés pour de telles applications. L'objectif était de construire une puce portant plusieurs types de lésions, afin de paralléliser les observations et comparer les affinités. Deux protéines ont été choisies pour ces expériences de SPR. Il s'agit d'HMGB1, membre bien connu de l'interactome des lésions du platine, et de TOX4, nouveau membre de cette catégorie mais aussi protéine à boîte HMG. Cette particularité fait de TOX4, au sein du complexe PTW/PP, l'élément potentiellement responsable de l'interaction avec les adduits. Les lésions sélectionnées sont les adduits 1,2-d(GpG) générés par les trois dérivés du platine déjà employés tout au long de ce travail.

Suite aux étapes d'optimisation et de validation, dont les paramètres vont être présentés, deux séries d'expériences ont été menées. La première visait à confirmer les capacités d'interaction d'HMGB1 pour les trois adduits. La seconde série a permis d'étudier en parallèle les capacités d'interaction d'HMGB1 et de TOX4 sur ces mêmes sondes.

A) Optimisation des paramètres expérimentaux

Les tests préalables ont permis d'ajuster plusieurs paramètres afin de définir les conditions expérimentales les plus propices à l'obtention de signaux fiables. Nos conditions initiales s'inspiraient des travaux réalisés par notre laboratoire, portant sur les capacités d'interaction et de coupure d'une glycosylase sur deux substrats oligonucléotidiques lésés (Corne *et al.*, 2008). Nous allons résumer dans les paragraphes qui suivent les principaux résultats de nos optimisations et les conclusions que nous en avons tirées.

1. Favoriser l'hybridation des sondes

Lors des premiers essais d'hybridation, nous avons observé que la solution contenant la construction [ODN cible-ZipC] injectée sur le prisme produisait un signal d'hybridation différent selon le couple sonde/cible : cisplatine (signal maximum = 0,30% de variation de réflectivité) > ODN non lésé > oxaliplatine. Si l'on peut s'attendre à un certain degré d'hétérogénéité avec ce type de constructions, les expériences précédentes de Corne *et al.* montrent une population de signaux centrée autour de 0,50% de variation de réflectivité et n'en déviant pas de plus de 1/10 (Fuchs, 2009). Point également critique, ce signal n'atteignait pas de plateau de saturation, laissant des sondes libres sous leur forme simple-brin sur le prisme.

Trois paramètres ont donc été considérés afin de favoriser l'hybridation de nos séquences cibles sur les sondes. Tout d'abord, il a été décidé d'accroître le volume injecté

(1ml) de l'échantillon contenant les cibles afin d'augmenter la quantité totale de cibles hybridées sur le prisme. Le second paramètre est la salinité du tampon de course. Nous souhaitions utiliser un tampon identique pour nos deux microsystèmes (*ligand fishing* et SPRi). Or, la composition initiale du tampon servant à la capture de l'interactome (tout en étant fonctionnel pour cette approche) présentait une salinité faible (5mM $MgCl_2$) susceptible d'être complétée par l'apport d'extraits nucléaires lors d'expériences de *ligand fishing*, ce qui ne peut se produire ici. L'hybridation d'oligonucléotides, *a fortiori* de faible taille (24 bases pour la séquence libre permettant l'hybridation) requiert la présence d'ions en solution. L'utilisation de concentrations croissantes de KCl (0 à 300mM) a montré qu'il était possible d'augmenter progressivement le signal d'hybridation et donc d'obtenir des plots cibles de plus en plus saturés, approchant le plateau. Enfin, la troisième variable considérée est la température de l'hybridation. Les premières expériences furent réalisées à une température constante (hybridation des cibles puis interaction ADN/protéine) de 25°C. Nous avons montré qu'en passant à 37°C il était possible d'améliorer le signal d'hybridation des cibles. Ceci est très certainement dû à la possibilité de déstabiliser les structures secondaires formées à plus basse température par les séquences Zip, rendant ces dernières plus accessibles à la partie complémentaire des cibles. En prenant en compte l'ensemble de ces paramètres, nous avons défini les conditions suivantes pour l'interaction de nos protéines sur la biopuce SPRi : injection d'un volume d'1ml de cibles complémentaires ; hybridation réalisée à 37°C, interaction avec la protéine réalisée à 25°C ; salinité du tampon portée à 50mM KCl, 5mM $MgCl_2$.

La Figure 61 montre un exemple typique de signaux enregistrés lors de l'hybridation des cibles sur le premier modèle de prisme avec ces conditions optimisés. Les mesures brutes sont traitées tout d'abord par la soustraction du signal à t = 0, puis par soustraction du signal enregistré sur les plots de PPy. Ces derniers ne devant théoriquement pas réagir avec la construction oligonucléotidique, tout signal produit sur ces ROI correspond à un bruit de fond dont l'élimination permet de lisser les courbes. La construction [ODN cisplatine-Zip7c] a produit le plus fort signal (0,55% de variation de la réflectivité), suivi par l'oligonucléotide non lésé (0,40%) et enfin l'oligonucléotide lésé par l'oxaliplatine (0,18%). Pour les trois couples sonde/cible, le plateau n'est pas atteint, mais les signaux pour le cisplatine et l'ODN non lésé se rapprochaient des valeurs obtenues par Corne et Fuchs.

On peut aussi constater que, malgré les optimisations apportées, l'amplitude des signaux est toujours variable, et ce alors que les sondes sont greffées à densités équivalentes (concentration de la solution de dépôt = 10µM) et qu'il en est de même pour l'injection des cibles (concentration de la solution injectée = 250nM). Cette variabilité due à une différence d'efficacité d'hybridation sur chaque séquence Zip (dépendante de la séquence de ces derniers) n'est donc pas négligeable et risque de fausser les signaux enregistrés lors de la fixation de protéine sur les sondes. Ceci justifie l'utilisation, pour traiter les signaux d'interaction sondes/protéine, de coefficients de normalisation dont la méthode de calcul a été décrite dans la section Matériels et Méthodes.

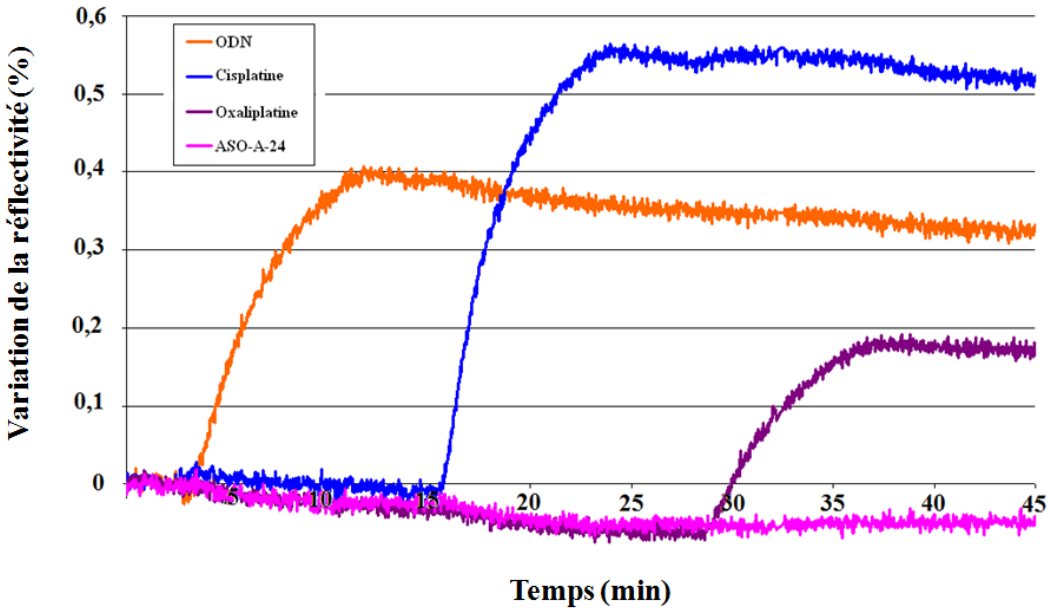


Figure 61 : Hybridation des constructions [ODN cible-ZipC] sur la biopuce SPRi. L'amplitude des signaux varie selon les couples sonde/cible.

2. Analyse de l'interaction sondes/protéine

Suite aux optimisations portant sur la construction de la biopuce, nous avons travaillé avec la protéine HMGB1 pour déterminer le protocole optimal permettant son interaction avec les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine et de l'oxaliplatine. La Figure 62 présente les mesures enregistrées à l'aide de nos constructions sonde/cible portant une lésion 1,2-d(GpG)-cisplatine ou -oxaliplatine lors de l'injection de 0,5ml d'une solution à 20nM d'HMGB1. L'approche consiste, après préparation de la puce (blocage puis hybridation séquentielle de chaque couple sonde/cible), en une injection unique de la protéine d'intérêt à débit constant durant 10min, puis à une phase de rinçage au cours de laquelle seul le tampon de course circule sur le prisme fonctionnalisé, ce qui permet de suivre l'éventuelle dissociation de la protéine. La température optimale d'interaction a été maintenue à 25°C, et les résultats ont été normalisés.

Ces mesures (Figure 62-A) montrent d'une part que la version recombinante commerciale de la protéine conservait tout ou partie des capacités d'association naturelles avec les adduits portés par nos sondes. D'autre part, on observe que la variation de réflectivité est fonction de la cible considérée : atteignant à peine 0,3% pour la cible non lésée, elle approche les 0,6% pour la cible simple-brin, et est maximale pour les sondes cisplatine et oxaliplatine (0,7%). De plus, une cassure nette dans la pente d'association avec la sonde cisplatine est clairement visible à t = 10min, montrant que le plateau de saturation n'est pas atteint pour celle-ci. Ceci laisse présager la possibilité d'obtenir un signal plus fort et indique qu'une quantité insuffisante de protéine est injectée sur la biopuce. À l'inverse, le plateau semble atteint pour les sondes oxaliplatine, simple-brin et ODN non lésé.

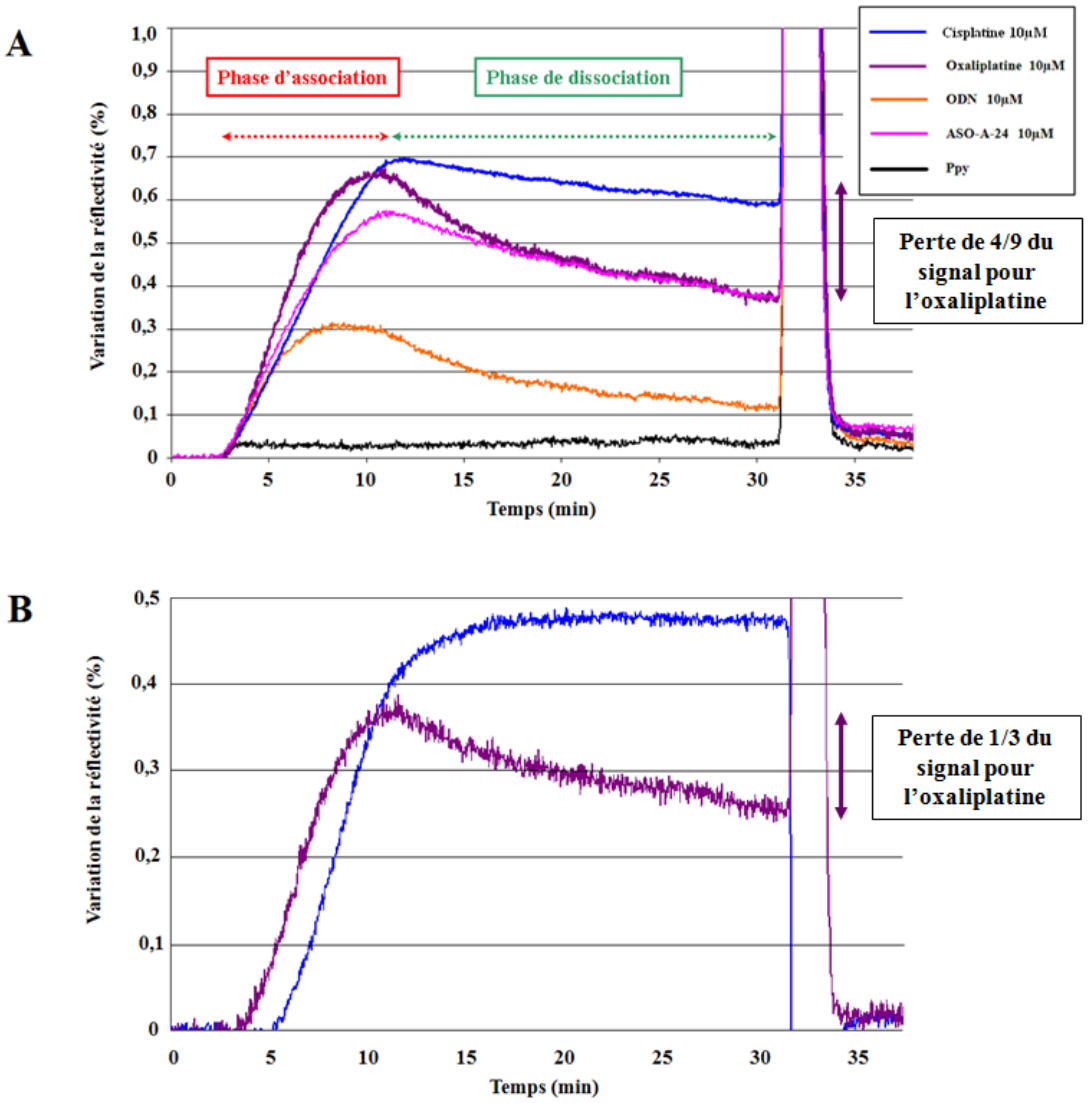


Figure 62 : HMGB1 possède une affinité variable selon les sondes. (A) La protéine (20nM) interagit plus spécifiquement avec les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine et de l'oxaliplatine, mais la dissociation est plus marquée pour l'oxaliplatine. L'ADN simple-brin produit un signal inférieur aux sondes lésées mais largement supérieur à celui obtenu pour l'ADN non lésé. (B) Après soustraction du signal enregistré pour l'ODN non lésé, on observe que la protéine ne se dissocie pas de la sonde cisplatine, au contraire de la sonde oxaliplatine.

Lors de la phase de rinçage, on observe un comportement différent de la protéine selon l'adduit platiné : la dissociation de la sonde cisplatine est régulière et conduit au bout de 20min à la perte de 1/7 du signal ; la dissociation de la sonde oxaliplatine est plus rapide lors des cinq premières minutes (pente plus forte), avant de ralentir et se stabiliser jusqu'à la fin du rinçage (perte de 4/9 du signal). À l'instar de la sonde cisplatine, la sonde simple-brin montre une dissociation régulière aboutissant à la perte de 1/3 du signal d'association. La sonde double-brin, quant à elle, connait une dissociation rapide du complexe ADN/protéine et la perte de 2/3 du signal à la fin de cette période. La soustraction du signal mesuré pour la sonde non lésée aux signaux des sondes lésées (Figure 62-B) abolit, pour le cisplatine, la perte de

signal. Cela pourrait indiquer que la dissociation observée est en réalité causée par la perte des protéines ayant interagit avec les parties non lésées de la sonde portant l'adduit. Pour l'oxaliplatine, au contraire, la dissociation est toujours visible après soustraction du signal mesuré par la sonde non lésée, mais son amplitude est réduite : 1/3 au lieu des 4/9 observés précédemment, ce qui confirme là aussi l'existence d'interactions non spécifiques dues à un « effet » ADN double-brin non lésé. À l'issue de la phase de rinçage, l'injection d'une solution 1,5M NaCl cause un changement brutal de la réflectivité et la séparation de tous les complexes ADN/protéine. Le retour de la ligne de base au niveau pré-injection de la protéine montre en effet que les interactions entre celle-ci et l'ADN ont été rompues, alors que les constructions sondes/cibles n'ont pas été affectées.

Les amplitudes de signal enregistrées ici confirment que la protéine s'associe préférentiellement avec les lésions cisplatine et oxaliplatine. Cependant, la nature de nos différentes sondes (ADN double-brin) engendre également une fixation aspécifique de la protéine sur les sondes lésées, dont on peut mesurer l'ampleur grâce à la sonde double-brin non lésée pour laquelle la protéine démontre une plus faible affinité. On ne peut exclure la présence de plus d'une protéine par sonde. HMGB1 a également démontré une affinité pour l'ADN simple-brin supérieure à celle mesurée pour l'ADN double-brin non lésé, affinité d'ailleurs proche de celle mesurée pour l'ADN lésé (~ 4/5 du signal moyen des deux adduits platinés). Comparant les lésions entre elles, HMGB1 paraît posséder une affinité supérieure pour les sondes cisplatine : si la valeur maximale représentant l'association de la protéine avec chacune des deux sondes est légèrement supérieure pour la sonde cisplatine, HMGB1 reste durablement fixée sur cette dernière alors qu'elle se dissocie progressivement de la sonde oxaliplatine. Ces résultats ont été confirmés par une seconde expérience menée sur la même puce.

B) Vérification de l'interaction d'HMGB1 avec les trois types d'adduits

Faisant suite à la validation de la puce contenant deux lésions platinées, nous avons mis au point un second type de prisme, sur lequel ont été déposées les séquences Zip permettant d'hybrider trois cibles oligonucléotidiques portant chacune l'adduit 1,2-d(GpG) produit par le cisplatine, l'oxaliplatine et le JM118. Les contrôles simple-brin et double-brin non lésés ont été conservés. La différence majeure avec la première version de la puce testée réside dans le fait que trois concentrations de dépôt des sondes (*i.e.* densités de greffage des séquences Zip) ont été utilisées : 0,5µM, 2µM et 5µM. Ce gradient de densité permet de déterminer les meilleures conditions d'accessibilité des sondes pour la protéine.

En outre, de la même façon que nous avons augmenté la quantité de cibles grâce à une boucle d'injection de plus grand volume, nous avons décidé d'augmenter la quantité de protéine afin d'atteindre le plateau d'association, ce qui n'était pas le cas lors de l'expérience précédemment exposée et pour la sonde cisplatine. Pour cela, seule la boucle de volume 1ml a été utilisée lors de toutes les expériences qui vont être maintenant décrites.

La spécificité de l'adressage de chaque cible, parfaitement visible sur les sensorgrammes, est aussi constatable après conversion des signaux en image SPRi. La préparation du prisme qui nous intéresse ici est ainsi visible à travers les images réunies sur la Figure 63.

Ensuite, plusieurs concentrations de la protéine HMGB1 ont été séquentiellement injectées sur la biopuce : 5nM, 10nM, 25nM, 50nM, puis à nouveau 10nM pour s'assurer de la reproductibilité des signaux en fin d'expérimentation. Deux sensorgrammes enregistrés sont visibles sur la Figure 64. L'injection d'HMGB1 à 10nM montre qu'à une telle concentration il n'est pas possible d'atteindre de plateau de saturation pour les quatre sondes portant l'ADN double-brin. Ces observations rejoignent ce qui avait été constaté lors de l'expérience précédente pour les sondes lésées, avec l'injection d'une concentration double et sur des plots plus denses. En revanche, la différence principale est liée à l'obtention d'un signal plus important sur la sonde double-brin non lésé, par rapport à la sonde simple-brin. Le signal enregistré pour cette dernière dépasse d'ailleurs à peine celui des plots PPy. HMGB1 engendre un signal d'association plus important pour les adduits du cisplatine et de l'oxaliplatine que pour ceux du JM118. C'est à partir de la concentration 25nM d'HMGB1 que nous sommes parvenus à atteindre le plateau de saturation pour l'ensemble des sondes. La protéine s'associe de façon identique aux trois lésions, alors que le signal d'association sur l'ODN non lésé ne représente que 2/3 de ce signal.

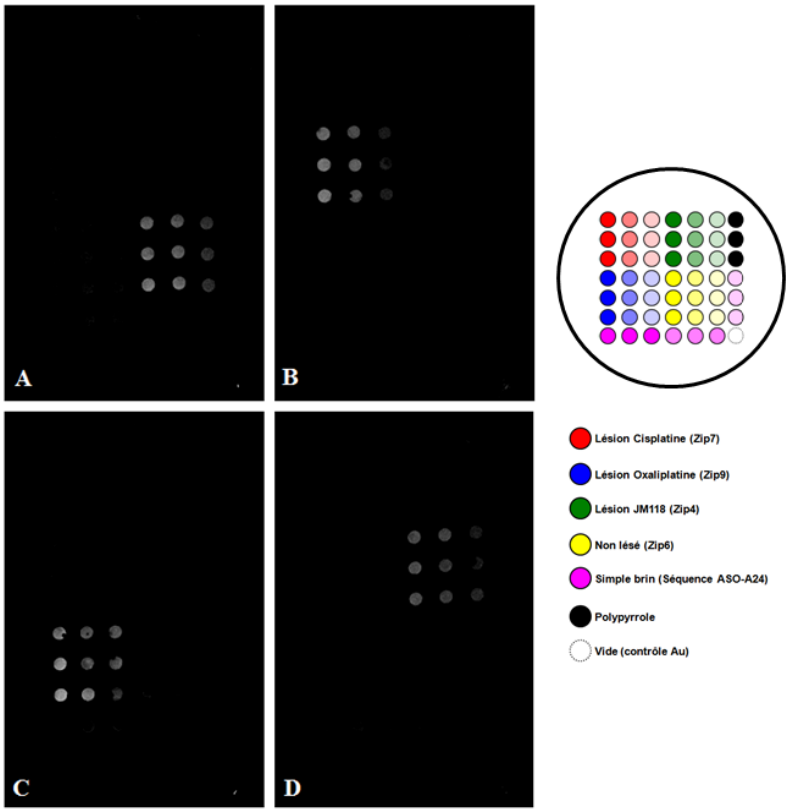


Figure 63 : Conversion en image des signaux d'hybridation des constructions oligonucléotidiques cibles : (A) [ODN non lésé-Zip6C] ; (B) [ODN cisplatine-Zip7C] ; (C) [ODN oxaliplatine-Zip9C] ; (D) [ODN JM118-Zip7C].

Dans les deux cas présentés ici, mais aussi à toutes les autres concentrations de protéine évaluées, les dissociations observées pour les sondes cisplatine et JM118 étaient dues à la rupture de l'interaction d'HMGB1 avec la portion non lésé des ODN portant les adduits. En effet, pour les deux concentrations de protéines, la dissociation spécifique de la présence d'adduit (après soustraction du signal mesuré pour l'ODN non lésé) était quasi nulle pour les adduits du cisplatine et du JM118, ce qui n'était pas le cas pour ceux de l'oxaliplatine puisqu'un rinçage de 30min causait une perte de 30% du signal généré lors de l'association. Les signaux uniquement dus à l'interaction avec les adduits étaient, pour les trois dérivés du platine, identiques à 25 et 50nM HMGB1. En outre, l'expérience a été réitérée le lendemain sur la même puce, après avoir régénéré celle-ci par rinçage alcalin de la surface du prisme et élimination des cibles, et a permis d'obtenir des résultats très comparables.

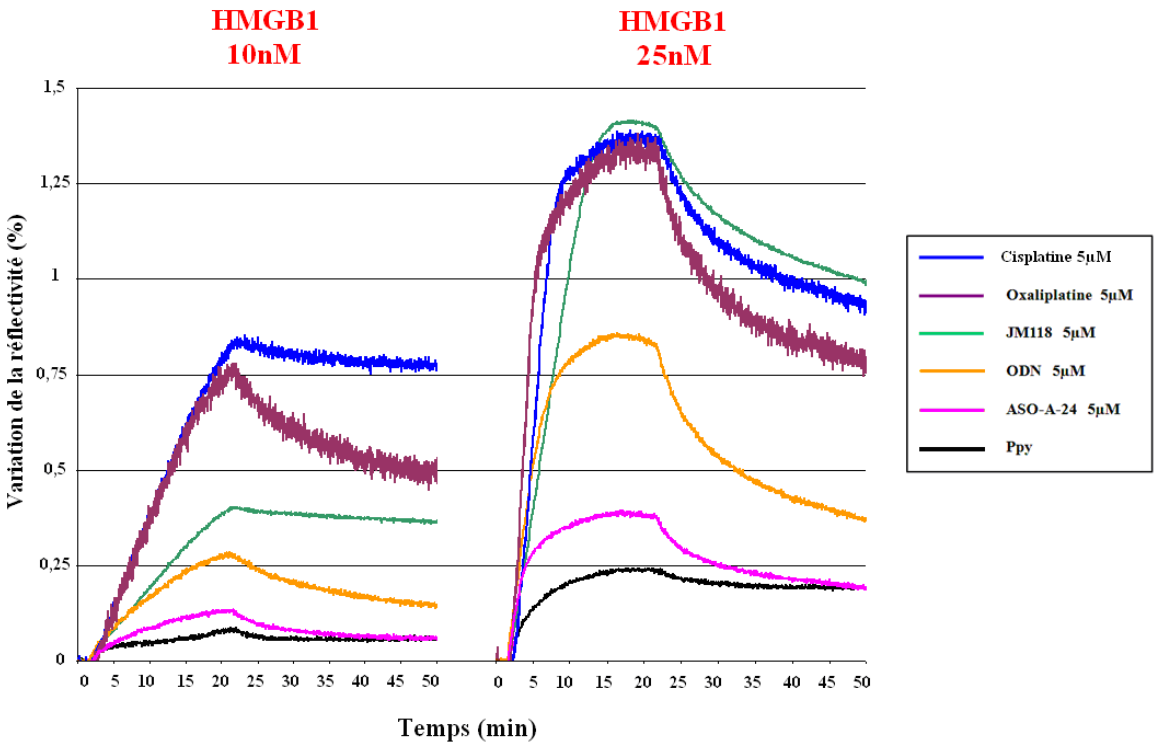


Figure 64 : Interaction d'HMGB1 recombinante (10 puis 25nM) avec les trois lésions platinées (densité de greffage 5µM). L'association protéine/adduit produit un signal quasi-identique pour les trois dérivés. La moins bonne affinité d'HMGB1 pour l'ADN non lésé est confirmée. En revanche, la forte affinité pour l'ADN simple-brin constatée sur la Figure 62 n'est pas confirmée.

C) Évaluation des capacités de fixation de TOX4 sur les adduits platinés

Dans un dernier temps, nous avons souhaité vérifier les capacités d'interaction d'une version recombinante de TOX4, HMGB1 faisant office de contrôle positif. En raison des signaux peu élevés enregistrés pour les plus faibles densités de greffage (0,5 et 2µM) lors de l'expérience portant uniquement sur HMGB1, nous avons choisi de réintroduire une densité plus élevée. Les concentrations de sondes choisies pour le dépôt sont : 2µM, 5µM et 10µM.

Les signaux correspondant à l'hybridation des cibles sur les sondes sont présentés sur la Figure 65. Parmi les deux densités de greffage les plus élevées, ce sont les ROI correspondant à la concentration 5µM qui ont produit les sensorgrammes les plus homogènes. Cette densité a donc été sélectionnée pour l'étude de l'interaction des protéines avec les sondes. À cette densité, c'est la construction portant l'adduit cisplatine qui a produit le plus faible signal. On remarque pour les autres types de sondes une bonne homogénéité à cette même densité : 1,40% de réflectivité pour le JM118 et l'ODN non lésé, 1,10% pour l'oxaliplatine. Les mesures pour la sonde non lésée ont de nouveau été utilisées pour effectuer la normalisation des signaux d'interaction.

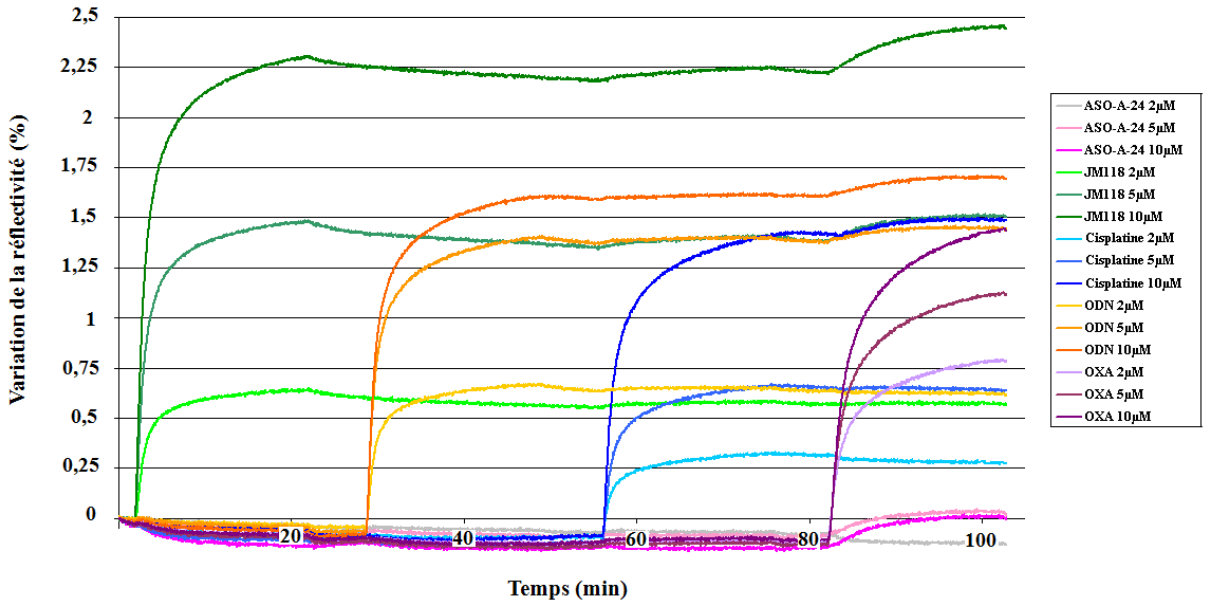


Figure 65 : Hybridation séquentielle des cibles/sondes sur la troisième version de la biopuce supportant la fixation d'adduits cisplatine, oxaliplatine et JM118. L'ordre d'injection est : [ODN JM118-Zip4C] ; [ODN non lésé-Zip6C] ; [ODN cisplatine-Zip7C] ; [ODN oxaliplatine-Zip9C].

Les protéines HMGB1 et TOX4 ont été successivement injectées (concentrations 20 et 40nM) avec une étape de régénération saline intermédiaire. De plus, un contrôle négatif a cette fois été ajouté, à savoir la BSA (version commerciale ultrapure) injectée dans les mêmes conditions que les deux protéines d'intérêt. Les sensorgrammes obtenus pour la concentration 20nM de chaque facteur sont visibles sur la Figure 66.

On y constate tout d'abord une absence totale de signal mesuré pour la BSA, une observation également faite à 40nM. Pour HMGB1, de très forts signaux d'interaction pour les sondes cisplatine (3,3%) et JM118 (3,2%) ont été enregistrés. La variation de réflectivité observée pour les sondes oxaliplatine est inférieure (2,7%), suivie par celle mesurée pour les sondes ODN non lésé (2,4%). On remarquera donc la part très significative de l'interaction aspécifique avec l'ADN double-brin : après soustraction, le signal résiduel correspondant à l'interaction les lésions atteint 0,8% pour le cisplatine, 0,7% pour le JM118 et 0,4% pour l'oxaliplatine. Lors de la phase de rinçage (30min à débit identique) les sondes JM118 ne

connaissent aucune diminution de signal, alors que les sondes cisplatine enregistrent une perte d'1/4 du signal, et les sondes oxaliplatine une réduction de près de 3/5. En outre, à l'instar de la deuxième série d'expériences, le signal obtenu pour la sonde ODN non lésée est encore une fois bien supérieur au signal produit par les sondes simple-brin, qui atteint 1,2%.

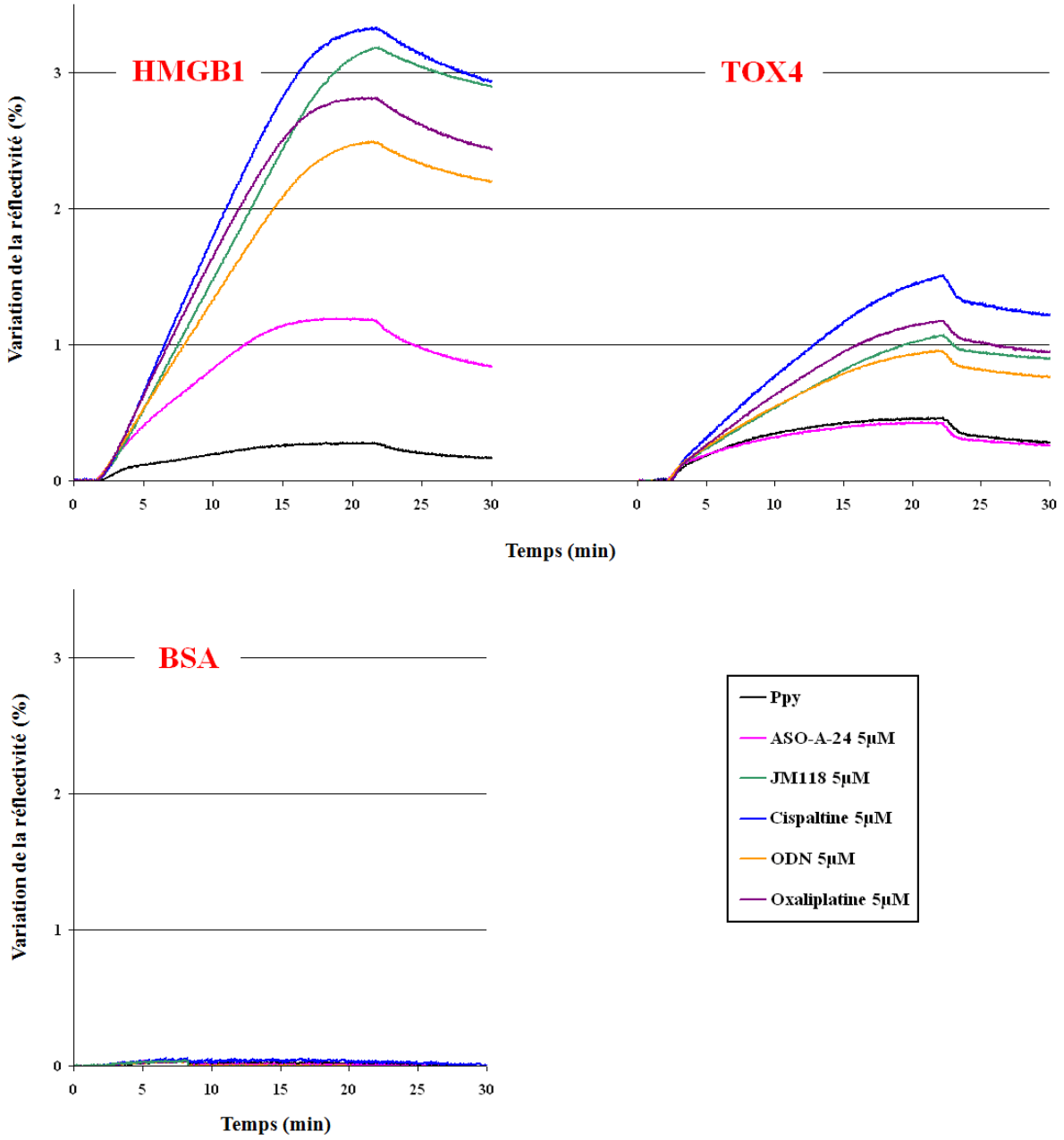


Figure 66 : Capacités d'association/dissociation comparatives d'HMGB1, TOX4 et la BSA (20nM) pour les adduits 1,2-d(GpG) formés par le cisplatine, l'oxaliplatine et le JM118.

La protéine TOX4, à concentration égale à celle d'HMGB1, engendre des signaux moins forts sur chaque sonde présente. Ceci paraît indiquer une affinité inférieure. Les signaux les plus importants pour TOX4 sont mesurés sur les sondes cisplatine (1,5%), suivie

par les sondes oxaliplatine (1,2%), JM118 (1,1%), ODN non lésé (0,9%). La séquence ASO-A-24 ne produit pas un signal dépassant celui des plots de PPy, ce qui semble indiquer une incapacité totale de cette version de TOX4 d'interagir avec l'ADN simple-brin non lésé. Lors de la phase de rinçage (après soustraction du signal des sondes ODN non lésé), on observe une perte de 1/10 du signal pour les sondes cisplatine, 1/4 du signal pour les sondes oxaliplatine, et aucune variation pour les sondes JM118. Une augmentation du débit lors de la phase de rinçage n'a pas généré de rupture de pente, indiquant qu'une éventuelle réassociation des protéines avec des sondes en aval n'est pas observée, ou est négligeable.

Cependant, la hiérarchie d'affinité de TOX4 pour les adduits 1,2-d(GpG) des trois dérivés du platine qui a été notée ici (cisplatine > oxaliplatine > JM2118) n'a pu être totalement validée lorsque l'expérience a été réitérée sur un autre prisme fonctionnalisé de façon identique. En effet, si les signaux obtenus pour les sondes portant les adduits étaient systématiquement supérieurs à ceux pour les sondes non lésées, et ceci pour les deux protéines, l'ordre précis n'était pas reproduit : la protéine a alternativement démontré une préférence variable selon les expérimentations pour chacun des trois adduits.

Nous avons donc conclu que TOX4 possède une préférence pour l'ADN lésé par les trois dérivés du platine considérés versus l'ADN double-brin non lésé, et qu'elle ne semble pas capable d'interagir avec l'ADN simple-brin. Cette affinité est cependant inférieure à celle d'HMGB1, autre protéine à boîte HMG, pour les mêmes lésions. De plus, la version recombinante utilisée ainsi que les configurations actuelles du prisme et du protocole SPRi ne nous permettent pas de trancher définitivement à propos d'une affinité supérieure de cette protéine pour l'un ou l'autre de ces adduits.

III. Discussion

À travers notre approche de *ligand fishing* nous sommes parvenus à capturer, parmi d'autres protéines, HMGB1 et TOX4 sur les adduits générés par trois dérivés du platine. La première de ces protéines était un membre déjà connu de l'interactome des lésions du cisplatine, alors que la seconde a été identifiée par nos travaux. Notre système de *ligand fishing* ne nous a pas permis de déterminer une éventuelle préférence de ces protéines pour les lésions de l'un ou l'autre des trois dérivés du platine. De ce fait, nous avons souhaité vérifier ces caractéristiques à l'aide d'une autre méthode. La SPRi avait déjà été utilisée par notre laboratoire pour étudier les propriétés de fixation et d'excision de glycosylases sur des bases oxydées et sites abasiques (Corne *et al.*, 2008; Fuchs, 2009). Cette approche, autorisant l'étude de plusieurs interactions en parallèle, nous a semblé appropriée à l'objectif fixé. Nous avons donc adapté un format de biopuce SPRi servant à mesurer les capacités d'interaction de protéines avec des sondes comportant l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine, de l'oxaliplatine ou du JM118. La biopuce a été utilisée avec des versions recombinantes d'HMGB1 et TOX4. Cette dernière est un des membres du complexe PTW/PP. Elle possède une boîte HMG, ce qui est susceptible de faire d'elle, au sein du complexe, le facteur responsable de l'interaction avec les adduits platinés. Également disponible sous forme recombinante, TOX4 nous a ainsi paru être un candidat adéquat pour l'évaluation de ses capacités d'interaction.

Dans un premier temps, nous allons discuter de la méthode, en insistant sur ses points forts mais aussi sur les points faibles que nous avons identifiés au travers de nos expériences. Ensuite, nous reviendrons sur les interactions que nous avons observées pour chacune des deux protéines.

A) Remarques générales sur la technique

La biopuce SPRi que nous avons construite a permis de confirmer efficacement les capacités d'interaction de TOX4 sur l'ADN lésé. La SPRi combine l'intérêt majeur de la SPR, l'étude des interactions en temps réel plutôt qu'en point final sans aucun marquage, avec d'autres avantages fort intéressants :

- facilité d'adaptation des biopuces ;
- comparaison en parallèle de conditions multiples (lésions, protéines, dans une certaine limite de gestion des données) ;
- visualisation directe de la biopuce (évaluation de la qualité de sa fonctionnalisation, observation directe des événements se produisant à sa surface dans la chambre d'analyse).

C'est ainsi que nous avons pu réaliser notre étude avec deux candidats, sur trois lésions différentes ainsi que les contrôles appropriés, le tout placé exactement dans les mêmes conditions expérimentales.

Notre protocole s'est malgré tout heurté à des limitations expérimentales qui ont influé sur la reproductibilité des résultats, ainsi que sur les paramètres qu'il était possible de tirer de ceux-ci. Nous allons aborder ces deux points, puis nous évoquerons l'importance de la source de protéine.

1. Reproductibilité des interactions

Comme cela est illustré par nos résultats, le manque de reproductibilité (d'une expérience à l'autre, que ce soit sur un même prisme ou sur des prismes différents) est le principal problème de notre système SPRi qu'il est nécessaire de résoudre. Cette variabilité des résultats, si elle n'a pas compromis la détermination des capacités d'interaction de ces protéines, a été un obstacle pour l'obtention de paramètres cinétiques quantitatifs. Il ne nous est pas possible d'évaluer d'une quelconque façon la qualité des prismes eux-mêmes (homogénéité du verre, qualité du revêtement d'or) qui sont des consommables disponibles dans le commerce. De ce fait, nous allons nous attarder sur les points critiques de la conception puis de l'utilisation de la biopuce susceptibles d'être responsables de ce manque de reproductibilité.

Le premier de ces points concerne le système en lui-même. Les réglages qu'ils nécessitent sont réalisés à partir de l'œil de l'utilisateur, plutôt que par un programme déterminant la courbe de résonnance des plasmons, ce qui est susceptible d'introduire un biais entre chaque série d'expériences.

Les puces SPR classiques présentent une surface intégralement fonctionnalisée, par exemple par la fixation de molécules de streptavidine. Le système expérimental possède plusieurs chambres d'analyse séparées, où sont injectées les sondes puis les analytes d'intérêt. Les prismes SPRi tels que nous les avons décrits ici constituent des biocapteurs multiparamétriques adressables à volonté, dont les caractéristiques sont déterminées par l'utilisateur, notamment lors de l'étape de greffage semi-automatisée. C'est cela qui permet d'obtenir une biopuce personnalisée. Dans notre cas, un « code Zip », permettant d'adresser spécifiquement des sondes sur les ROI voulues, est employé. Au sein d'une expérience, il est alors possible de multiplier les sondes, tandis que d'une expérience à l'autre, il est ainsi possible de les faire varier, tout en utilisant la même puce.

Ce concept a donc des avantages, mais également quelques inconvénients. L'étape de dépôt s'avère critique, car de leur qualité (forme, densité) et de leur homogénéité dépendent aussi les paramètres cinétiques. Un potentiostat permet de délivrer les charges électriques nécessaires à la réaction d'électropolymérisation, et doit impérativement être capable de le faire de façon très reproductible. Ce n'était pas le cas pour le premier modèle que nous avons utilisé, ce qui a conduit à la fabrication de puces très hétérogènes. Le remplacement du potentiostat nous a permis de régler une partie de ces problèmes, par l'obtention de charges moins disparates. Une procédure entièrement automatisée utilisant un robot *spotter* est

également déjà disponible. Cependant, cette machine réalise des greffages très peu denses, difficiles à visualiser à l'écran lorsque les ROI sont manuellement définies.

L'hétérogénéité de greffage peut avoir des conséquences négatives sur le processus d'hybridation des cibles. Les séquences Zip ont été établies dans l'objectif de favoriser l'hybridation de leurs séquences complémentaires. Nous avons été confrontés à ce problème, avec une efficacité d'hybridation maximale pour le Zip4 (supportant l'adduit JM118) et une efficacité minimale pour le Zip9 (supportant l'adduit oxaliplatine). Une attention particulière a été portée aux concentrations des lots d'oligonucléotides utilisées pour préparer les solutions de dépôt. De ce fait, de telles différences nous paraissent liées à une variabilité dans les capacités d'hybridation des séquences sondes et cibles. Sans être capables d'abolir ces différences, nous avons déterminé des conditions expérimentales visant à minimiser la formation de structures secondaires, notamment en adaptant salinité du tampon et surtout température de la procédure.

L'avantage majeur du système du laboratoire CREAB est la possibilité de contrôler la température. Les appareils commerciaux actuellement disponibles ne disposent pas de système de contrôle de la température. Or, à travers nos étapes de mise au point, nous avons constaté que ce paramètre était crucial. L'hybridation des cibles sur les sondes greffées est dépendante de l'accessibilité de ces séquences, susceptible d'être diminuée par l'existence de structures secondaires. L'augmentation de la température permet de rompre ces structures. De plus, réaliser l'étape d'hybridation à une température élevée (mais, bien sûr, inférieure à la température de fusion des oligonucléotides) permet de favoriser la spécificité de l'assemblage sonde/cible, et éviter les hybridations croisées. Enfin, selon la protéine étudiée, la température d'interaction est susceptible de varier (notamment en fonction de l'organisme d'où provient la protéine).

2. Détermination des paramètres cinétiques de l'interaction

Les travaux ayant fait l'objet de publications emploient la SPR pour identifier des interactions, mais aussi pour les caractériser par la détermination de paramètres cinétiques chiffrés. Obtenir ce type d'information pour les interactions entre HMGB1 et TOX4 et les adduits du platine faisait partie de nos objectifs lorsque nous avons initié nos propres travaux. Néanmoins, avant d'atteindre ce but, l'optimisation de plusieurs paramètres est encore nécessaire afin de s'affranchir de certaines contraintes.

Tout d'abord, nous avons vu qu'une partie des protéines injectées s'associe avec les sondes en raison de leur caractère d'ADN double-brin, indépendamment de la lésion. Ce mécanisme éloigne notre modèle de celui de Langmuir, qui suppose deux états possibles pour la protéine : en solution ou associée à la lésion. En conséquence, l'association adduit/protéine est en partie masquée par l'association ADN/protéine et gène la détermination de la constante d'association.

La configuration de la biopuce influe également sur l'association. Dans sa forme la plus élaborée, le schéma place les sondes cisplatine et JM118 près de l'entrée par laquelle le tampon (et donc les protéines injectées) pénètre dans la chambre d'analyse. De ce fait, la concentration en protéine n'est pas égale après passage de la solution sur les sondes en amont, ce qui défavorise l'interaction avec les sondes en aval. À cause du système utilisé pour réaliser la fonctionnalisation de la puce, il est techniquement peu envisageable de modifier la disposition des plots, à la fois pour des raisons de reproductibilité des dépôts, mais aussi de faisabilité (prolongation importante du temps nécessaire à la réalisation de la procédure).

Par ailleurs, lors de la phase de rinçage, qui permet de visualiser la dissociation du complexe, les protéines se détachant sont susceptibles de passer d'une sonde à l'autre, au sein du même ROI mais aussi d'une ROI en amont vers une ROI en aval. Ce phénomène fausse potentiellement la mesure de dissociation.

De tels effets pourraient être corrigés par plusieurs adaptations expérimentales. Tout d'abord, il est possible d'augmenter le débit du tampon de course. Ce faisant, les concentrations locales dans la chambre d'analyse se trouvent ré-équilibrées lors de l'association et la réassociation des protéines avec les sondes lors du rinçage est atténuée. Étant limités par les quantités de protéine disponibles, nous n'avons pas fait varier le débit lors des phases d'interaction, afin de maintenir des conditions expérimentales constantes. Cependant, l'augmentation du débit a été réalisée lors de la dissociation des deux protéines, et nous n'avons constaté dans aucun des cas une rupture de pente, caractéristique du phénomène de réassociation. Nous en avons conclu que cet effet ne se produisait pas ici, certainement car les lésions en amont sont le cisplatine et le JM118, adduits sur lesquels les deux protéines restent fixées. L'introduction d'un compétiteur spécifique dans la phase mobile (par exemple un oligonucléotide lésé) est également envisageable, dans la mesure où cette modification du tampon de course n'induit pas de variation de réflectivité.

3. Utilisation de protéines recombinantes

Les limitations expérimentales de notre protocole de SPRi sont aussi liées aux protéines utilisées. En effet, chaque expérience s'est avérée très consommatrice en protéine. Les protéines recombinantes, lorsqu'elles sont commercialement disponibles, présentent un coût élevé. S'il s'agit de protéines produites en laboratoires à l'aide d'un système d'expression approprié, le coût peut également être important, et les rendements sont souvent faibles. Ainsi, d'une façon générale, la source de protéines constitue une entrave à la qualité du système. Si l'information recherchée est une validation de l'interaction, et dans le cas où le signal mesuré est faible (pour une protéine à faible affinité), il est envisageable de le renforcer par l'injection d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt après la phase de dissociation, ce qui permet de maximiser le signal spécifiquement sur les sondes portant la lésion. Précisons en outre qu'une seconde version de la protéine HMGB1 vendue pour des applications telles que l'EMSA (ce qui garantit une certaine activité de liaison du facteur) a

été injectée sur le même prisme lors de la première de ces séries, mais n'a pas permis de mesurer une interaction avec nos sondes. Ceci souligne, s'il en était besoin, la difficulté de disposer d'une protéine fonctionnelle.

Lié à la sélection de la protéine candidate, le choix d'une protéine de blocage appropriée peut aussi être difficile. Remarquons que les publications utilisant la SPR ne font d'ailleurs jamais état de l'emploi de protéines non spécifiques afin de masquer les sites d'adsorption de la puce BIAcore®. Les travaux de l'équipe de Corne *et al*. ont cependant montré qu'il s'agissait d'un paramètre non négligeable, à tout le moins pour le système que nous utilisons. Fort heureusement, une protéine adéquate a pu être identifiée et utilisée aisément pour nos travaux sur HMGB1, TOX4, mais aussi pour la protéine DDB2 (pour laquelle les résultats seront présentés dans la partie suivante).

B) Remarques générales sur les interactions observées

HMGB1 et TOX4 sont deux protéines à boîte HMG sans spécificité de reconnaissance. La structure de TOX4 n'a pas encore été précisément étudiée. Nous pouvons cependant signaler que HMGB1 possède deux boîtes HMG, contrairement à TOX4 qui n'en possède qu'une seule (Lee *et al*., 2009). Nous avons étudié l'affinité d'HMGB1 pour les adduits de nos trois dérivés du platine. La seconde étape fut la détermination de l'affinité de TOX4 pour les mêmes lésions, afin de mieux comprendre le fonctionnement du complexe PTW/PP dans lequel cette protéine est impliquée.

1. Affinité d'HMGB1 pour les sondes platinées

HMGB1 s'est avérée capable de se fixer sur nos sondes oligonucléotidiques lésées et non lésées. Cependant, nous sommes parvenus à observer des comportements différents pour chaque sonde. Tout d'abord, HMGB1 a démontré une capacité équivalente de fixation sur les adduits du cisplatine et du JM118. De plus, l'association formée est restée stable au cours du temps. Lors de nos expériences successives, nous ne sommes pas parvenus à établir une différence d'affinité d'HMGB1 pour ces deux lésions. En effet, l'amplitude de la variation de réflectivité était systématiquement équivalente pour chacune de ces deux lésions. Dans le cas de l'oxaliplatine, HMGB1 s'associe aux sondes de façon similaire à ce qui est observé avec les deux lésions précédemment citées, mais le complexe formé est moins stable et la protéine se dissocie progressivement de la lésion, ce qui indique une plus faible affinité. Nos résultats semblent donc indiquer la séquence suivante : affinité de HMGB1 pour l'adduit 1,2-d(GpG)-cisplatine ≈ affinité pour l'adduit 1,2-d(GpG)-JM118 > affinité pour l'adduit 1,2-d(GpG)-oxaliplatine.

Ces données ne sont pas en parfaite adéquation avec celles obtenues par EMSA (Figure 67) lors d'une comparaison de l'affinité d'HMGB1 pour les adduits 1,2-d(GpG) produits par ces trois dérivés (Vaisman *et al*., 1999). Ces travaux indiquent que les adduits du

cisplatine sont mieux reconnus par HMGB1 que ceux de l'oxaliplatine et du satraplatine (soit cisplatine > satraplatine ≈ oxaliplatine). Les différences de déformation de la structure de l'ADN selon les adduits, en raison de l'encombrement stérique apporté par les groupements transporteurs de l'oxaliplatine et du cisplatine, sont certainement responsables de cette affinité variable. Notre biopuce n'a permis qu'une confirmation partielle de ces observations.

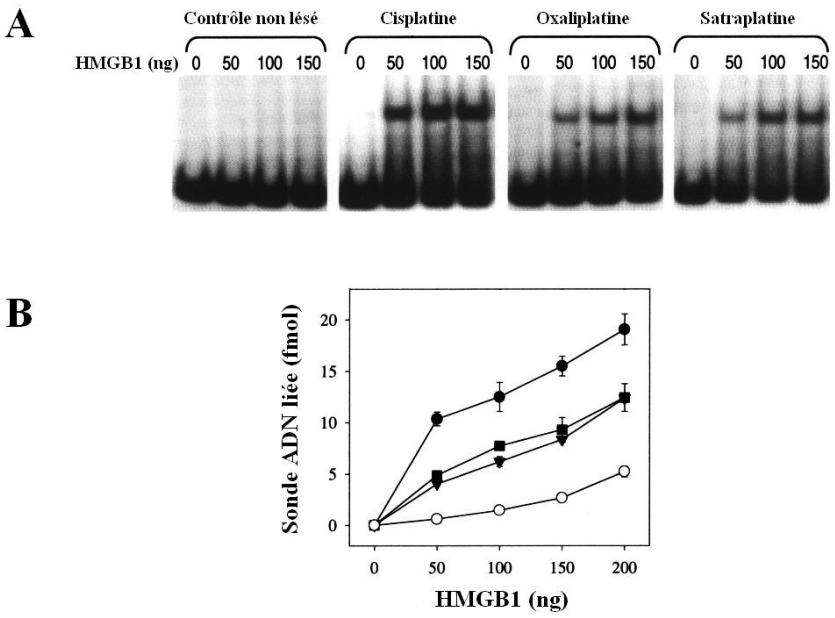


Figure 67 : L'affinité différentielle de HMGB1 pour l'adduit 1,-2d(GpG) généré par le cisplatine, l'oxaliplatine et le satraplatine. (A) Résultats de l'expérience d'EMSA à l'aide d'oligonucléotides lésés. (B) Quantification de la fraction d'ADN lié sur chaque type de sonde : ● = cisplatine ; ▼ = oxaliplatine ; ■ = satraplatine ; o = contrôle (adapté de Vaisman *et al.*, 1999).

D'une façon générale, HMGB1 est capable de se fixer sur l'ADN double-brin, bien qu'elle possède une préférence très marquée pour les structures tridimensionnelles inhabituelles. Cette aptitude justifie le fait que la sonde double-brin a été reconnue par la protéine, puis que celle-ci s'en soit dissociée. De plus, en raison de la longueur de nos sondes, il était envisageable que plusieurs molécules viennent s'y fixer, interagissant spécifiquement avec la lésion, ou aléatoirement avec le reste de la séquence pour s'en détacher ensuite. Chaque domaine HMG d'HMGB1 nécessite en effet moins de dix bases pour se fixer sur l'adduit (He *et al.*, 2000b). Lors de nos expériences, ce phénomène a été bien illustré par la perte de signal lors de la phase de rinçage qui, dans le cas d'HMGB1 et des adduits du cisplatine et du JM118, correspond exactement à la perte de signal enregistrée avec la sonde double-brin non lésée.

La première série d'expériences que nous avons menée avec HMGB1 nous avait permis de visualiser une interaction d'HMGB1 avec la sonde simple-brin supérieure à celle constatée pour la sonde double-brin non lésée. Ceci semblait en accord avec les travaux d'Isackson *et al.*, qui avaient montré à l'aide d'une expérience simple (interaction de la

protéine avec ADN simple- et double-brin immobilisés sur colonne) que HMGB1 possède une plus grande capacité de liaison à l'ADN simple-brin qu'à l'ADN double-brin (Isackson *et al*., 1979). Cependant, si une certaine affinité de la protéine (lot identique) pour la sonde simple-brin a toujours été observée au cours des expériences ultérieures (signaux supérieurs à ceux enregistrés pour les plots pyrrolés), cette interaction ne s'est jamais avérée supérieure à celle observée pour la sonde double-brin non lésée par la suite.

2. Affinité de TOX4 pour les sondes platinées

TOX4 a été analysée en parallèle d'HMGB1. Elle s'est également avérée capable d'interagir avec les sondes lésées avec une affinité supérieure à celle observée pour la sonde double-brin non lésée. Ceci confirme donc les résultats obtenus par notre approche combinant *ligand fishing* et protéomique. En raison d'un manque de reproductibilité entre les expériences successives, les données mesurées n'ont cependant pas permis d'établir une préférence de TOX4 pour l'une ou l'autre des trois lésions. Remarquons que les signaux mesurés lors de l'interaction de TOX4 avec les sondes, étaient globalement de plus faible amplitude que ceux obtenus avec HMGB1 sur les mêmes biopuces. Ceci peut bien sûr indiquer de plus faibles capacités de reconnaissance de l'ADN lésé pour TOX4, d'autant plus que notre version recombinante était d'une taille deux fois supérieure à celle d'HMGB1 (94,4kDa contre 50kDa), une caractéristique plutôt à même de renforcer le signal d'interaction (celui-ci dépend en partie de la taille des analytes se fixant sur les sondes). Cependant, en raison de la source de protéine utilisée, nous ne pouvons malheureusement pas être certains que l'amplitude des signaux observés reflète une activité optimale de TOX4. Nous disposions en effet d'une version recombinante de la protéine produite *in vitro* à l'aide d'un système d'expression *cell free*, ne pouvant introduire toutes les modifications post-traductionnelles potentiellement nécessaires à la parfaite fonctionnalité de la protéine.

La principale différence entre HMGB1 et TOX4 est l'incapacité de cette dernière à reconnaître l'ADN simple-brin. Nous pouvons émettre l'hypothèse que, en raison de la présence d'une seule boîte HMG, TOX4 est potentiellement moins capable de former un complexe stable avec l'ADN en général, et avec l'ADN lésé en particulier. En outre, son rôle putatif de facteur de transcription, que ne partage pas HMGB1, confère peut-être à TOX4 des spécificités de séquences et/ou de motifs qui la rendent moins à même d'interagir avec toutes les formes d'ADN.

Ainsi, notre étude a permis d'effectuer une validation qualitative des capacités d'interaction de TOX4. Des travaux d'optimisation sont encore nécessaires pour aboutir à une puce SPRi parfaitement fonctionnelle, qui permettra une caractérisation fine de l'interaction mesurée (détermination des paramètres thermodynamiques). Nous sommes parvenus, au cours de nos travaux, à identifier les paramètres critiques ainsi que des solutions qui peuvent

être apportées pour contourner les obstacles expérimentaux, ce qui permettra à terme de finaliser la construction d'une biopuce efficace.

D'après nous, la méthode ne peut se passer, pour l'instant, de techniques de référence plus éprouvées (telles que l'EMSA) pour la validation des paramètres thermodynamiques lorsqu'il sera possible de les déterminer. Cependant, il faut remarquer que dans la série d'expériences, déjà évoquée au cours de notre introduction bibliographique, mettant en œuvre l'anisotropie de fluorescence (Hey *et al*., 2001), les constantes de dissociation observées pour la protéine XPA sur une séquence platinée sont 20 fois plus grandes que celles obtenues pour la même protéine et la même lésion par la méthode de SPR (Wang *et al*., 2000). Ceci illustre bien le fait que la mesure de tels paramètres est fortement dépendante du support utilisé (notamment de la taille de la séquence oligonucléotidique sonde), ce qui constitue un inconvénient de taille (Draghici *et al*., 2006).

Les deux premières parties de ce travail ont permis d'optimiser deux approches technologiques complémentaires. Dans une troisième partie, nous avons souhaité appliquer cs méthodes à une autre problématique : la protéine DDB2 et son rôle en tant que membre de l'interactome des lésions de l'ADN. Ce dernier thème nous a permis de tester nos méthodes sur d'autres modèles.

ÉTUDE DE LA PROTÉINE DDB2 EN TANT QUE MEMBRE DE L'INTERACTOME DES ADDUITS DU CISPLATINE

I. Matériel et méthodes

A) Principe général et stratégie expérimentale

Nous avons souhaité utiliser les deux microsystèmes précédemment décrits afin d'aborder une problématique biologique : le rôle de la protéine DDB2 dans la réparation des lésions du cisplatine et/ou la médiation de leur toxicité. Nous disposions pour cela de deux modèles cellulaires exprimant la protéine de réparation DDB2 de façon différentielle, ce qui a permis d'étudier l'influence de celle-ci dans la réponse cellulaire à deux stress génotoxiques : l'irradiation UV et le traitement au cisplatine. L'exposition aux UV a été initialement choisie en raison de l'existence de nombreuses données sur ses relations avec la protéine DDB2. Ceci nous a permis de disposer d'un point de comparaison avec résultats obtenus en parallèle pour le stress engendré par le cisplatine. Les lignées cellulaires nous ont également permis de vérifier sur d'autres modèles biologiques les résultats obtenus lors de la détermination de l'interactome des adduits du platine à partir d'extaits HeLa.

La stratégie expérimentale qui a été mise en œuvre est résumée par la Figure 68. Tout d'abord, la sensibilité des lignées aux deux agents génotoxiques d'intérêt a été déterminée. Ensuite, deux approches ont été mises en œuvre en parallèle. La première fait appel à notre système de *ligand fishing* afin de déterminer l'interactome des photoproduits UV et des adduits du cisplatine à partir d'extraits nucléaires des deux lignées, exposés ou non au cisplatine. Elle est complétée par une vérification des capacités d'interaction de DDB2 avec l'adduit 1,2-d(GpG) des trois dérivés du platine sur la biopuce SPRi. La seconde approche vise à évaluer les capacités de réparation de nos deux lignées après application d'un stress génotoxique (rayonnement UV ou traitement au cisplatine) afin de déterminer l'influence de DDB2. L'induction de gènes d'intérêt, enfin, est déterminée par une mesure de niveau de transcrits à l'aide de la méthode de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR).

Nous allons maintenant détailler chacune de ces étapes, en illustrant la démarche expérimentale mise en œuvre puis les protocoles utilisés.

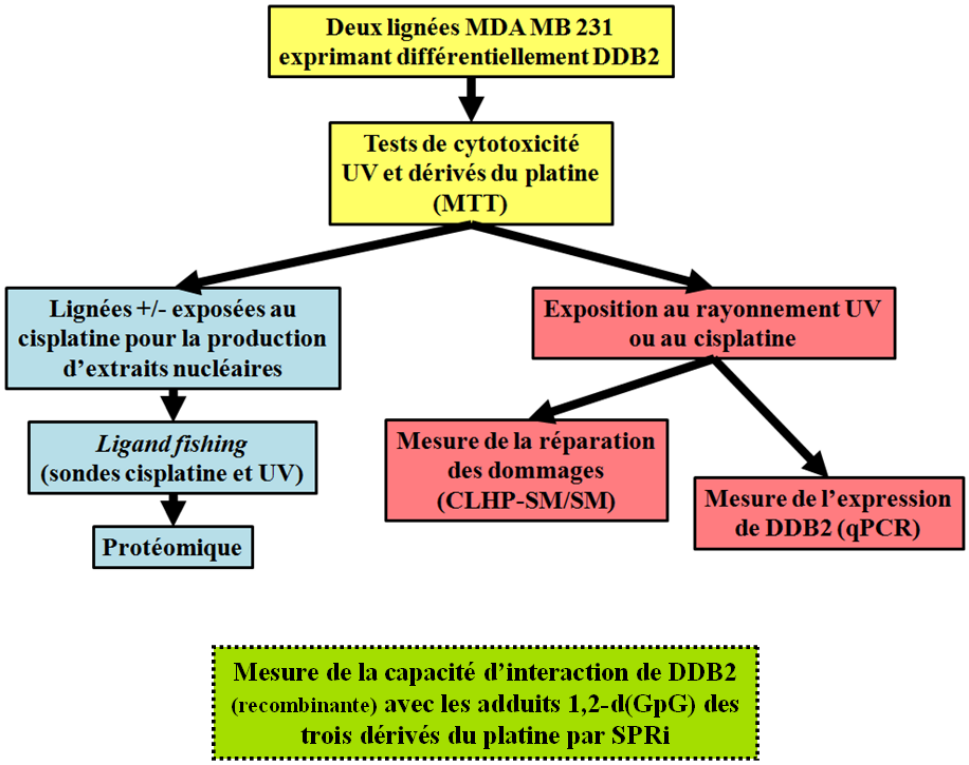


Figure 68 : Stratégie expérimentale d'étude de la protéine DDB2 en tant que membre de l'interactome des lésions de l'ADN.

B) Cultures des lignées et tests de cytotoxicité

1. Lignées cellulaires

Les deux lignées transfectées de la lignée d'adénocarcinome mammaire MDA MB 231 parentale ont été fournies par le Pr Philippe Becuwe (Laboratoire de biologie cellulaire EA 4001 PREDICTHER – Université Henri Poincaré – Nancy I). La lignée parentale provient d'une source commerciale (Clonetics Cambrex). Elle n'exprime pas de récepteur à œstrogènes, et possède une mutation G280A dans le gène de *TP53* qui rend cette protéine non fonctionnelle (Bartek *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1994). La Figure 69 est une photographie d'une culture typique de la lignée parentale.

La lignée contrôle (*mock control*, MC) a été transfectée à l'aide du vecteur pCDNA3.1(+) (Invitrogen) contenant un promoteur du cytomégalovirus (CMV) et le gène de résistance à la généticine. La seconde (DDB2+) a été transfectée avec le même vecteur incluant cette fois un ADN complémentaire (ADNc) correspondant à la phase ouverte de lecture du gène de la protéine DDB2 (longueur totale), isolée à partir de cellules de la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Kattan *et al.*, 2008), qui se trouve donc sous le contrôle du promoteur CMV.

Les deux lignées sont cultivées en flasques 25, 75 ou 175cm² (Falcon BD Biosciences) selon les besoins, dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté en L-glutamine (2mM

final, Gibco Invitrogen), sérum de veau fœtal décomplémenté (10% final, Gibco Invitrogen) et l'antibiotique généticine (800µg/ml final, Gibco Invitrogen), à 37°C sous atmosphère contenant 5% CO_2. Le milieu est changé tous les trois jours, et un passage hebdomadaire est réalisé en détachant les cellules à l'aide d'une solution de PBS 0,05% trypsine 10µM EDTA (Gibco Invitrogen) et en réensemençant à 20 000 cellules/ml (volumes utilisés : 5ml par boîte de 25cm² ; 15ml pour une boîte de 75cm² ; 35ml pour une boîte 175cm²). Le comptage est réalisé manuellement, en colorant les cellules à l'aide d'une solution de bleu de trypan (Sigma) puis en les disposant dans une cellule de comptage Kova glasstic slide (Hycor Agilent Technologies). Les antibiotiques sont éliminés du milieu de culture 5 jours avant toute expérience.

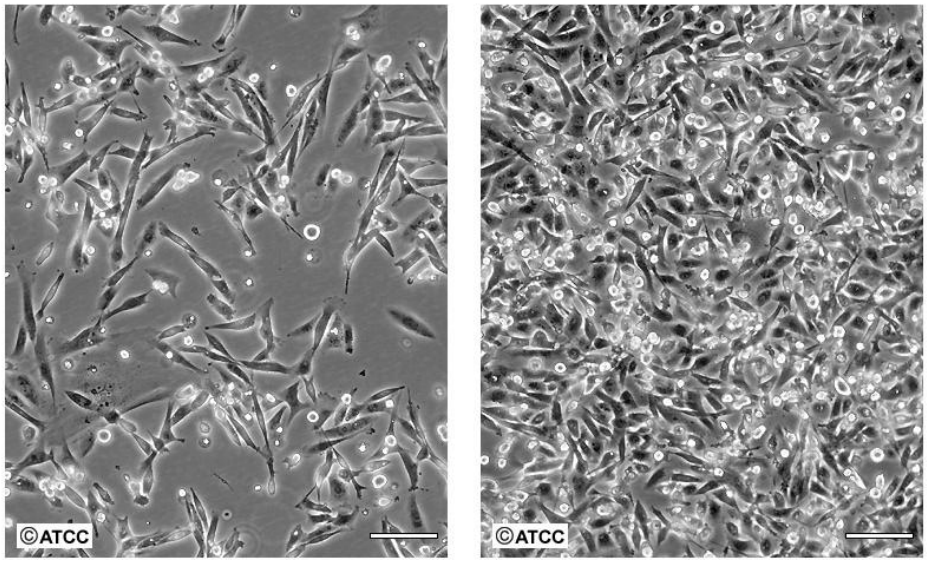


Figure 69 : La lignée parentale MDA MB 231 à faible (panneau de gauche) et forte (panneau de droite) confluences (source : banque de données de l'*American Type Culture Collection*).

2. Test de viabilité MTT

   - Après exposition UVB

Des boîtes de 35mm de diamètre (bp35, BD Falcon) sont ensemencées à 20 000 cellules/ml (V_{final} = 2ml ; total = 40 000 cellules) et cultivées selon les conditions normales, en omettant tout antibiotique. Le milieu est changé au bout de 3 jours, et les cellules sont à environ 80% de confluence quatre jours après. Elles sont irradiées à l'aide d'une lampe UVB (312nm, Vilbert Lourmat), dont la puissance moyenne est préalablement mesurée (et contrôlée toutes les 30min) à l'aide d'un radiomètre VLX3W (Vilbert Lourmat) afin de déterminer le temps d'irradiation nécessaire pour obtenir la dose souhaitée. Le rayonnement UVB (280-315nm) est ici choisi en raison de sa pertinence biologique.

Avant irradiation le milieu de chaque boîte est réservé et le tapis cellulaire rincé à l'aide d'1ml de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}]. 1ml de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}] est ensuite ajouté et l'irradiation réalisée (couvercle enlevé). Après élimination du PBS 1,7ml du milieu de culture originel sont replacés dans chaque boîte et les cellules incubées dans les conditions normales durant 24h00. Des triplicats sont préparés pour chaque dose d'irradiation.

À la fin de l'incubation chaque boîte reçoit 200µl d'une solution de MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-tetrazolium, 5mg/ml dans PBS [+Ca^{2+}, +Mg^{2+}], Sigma) préparée extemporanément et reste durant 02h00 dans les conditions normales de culture. Après ce délai le milieu est éliminé, le tapis cellulaire rincé avec 1ml de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}], puis sont ajoutés 3ml de DMSO. Ceci a pour effet de détacher le tapis cellulaire, qui est alors homogénéisé, et 200µl sont prélevés pour être disposés dans une plaque 96 puits. Chaque boîte fait l'objet de quatre dépôts, soit 12 points par condition d'irradiation. Deux références (« blancs ») sont également réalisées en ajoutant le MTT dans du milieu sans cellule et en suivant toutes les étapes subséquentes (deux points sont mesurés pour chaque blanc sur la plaque).

La lecture de l'absorbance est effectuée avec le lecteur Labsystems multiskan RC à 560nm, la référence (100% de survie cellulaire) correspondant aux cellules non irradiées.

- Après exposition aux dérivés du platine

Des plaques 96 puits sont ensemencées avec 200µL de suspension cellulaire MDA MB 231 (total = 5 000 cellules/puits) et incubées dans les conditions normales de culture (sans les antibiotiques) durant 24h00. Après ce délai, le milieu est éliminé, puis 200µl de milieu contenant le dérivé du platine désiré (chacun des trois dérivés du platine a été évalué) est ajouté dans chaque puits, une colonne correspondant à une concentration en dérivé. Les cellules sont incubées 24h00 à 48h00 avant de subir le test MTT. Pour ce faire, 20µl de réactif MTT sont ajoutés par puits et les cellules incubées durant 02h00. Après élimination du milieu, 200µl de DMSO sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont disposées sur un agitateur durant 20min afin d'assurer l'homogénéisation de la suspension cellulaire. La lecture est réalisée comme décrit précédemment.

C) Ligand fishing *et protéomique*

1. Démarche expérimentale

Nous avons souhaité déterminer l'interactome des lésions UV et du cisplatine, avant et après une exposition au cisplatine, traitement potentiellement responsable d'une variation de l'expression de certains gènes. Pour cela, quatre types d'extraits nucléaires ont été préparés puis utilisés sur nos pièges plasmidiques. L'approche expérimentale suivie est synthétisée par la Figure 70.

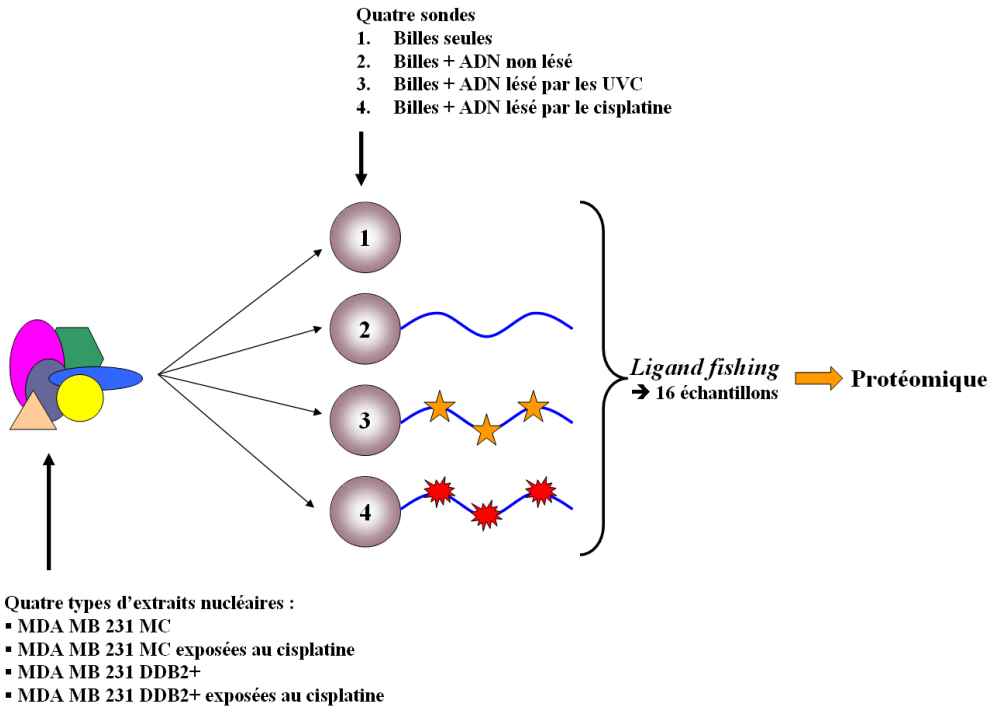


Figure 70 : La démarche expérimentale suivie pour l'établissement de l'interactome des lésions UV et cisplatine à partir des cellules MDA MD 231. Les deux lignées cellulaires ont été exposées ou non à une dose moyenne de cisplatine. Les sondes plasmidiques ont été exposées aux protéines nucléaires extraites de ces lignées, puis les protéines capturées identifiées par protéomique.

2. Exposition des lignées cellulaires au cisplatine

Les lignées MC et DDB2+, ont été cultivées dans les conditions décrites précédemment en boîte de 175cm² (5 par type d'extraits). Une partie de ces cultures a été exposée à 5µM cisplatine dans le milieu de culture +L-glu +SVF durant 24h00, puis le milieu platiné a été remplacé par du milieu de culture normal (sans antibiotique) et les cellules cultivées durant 24h00 supplémentaires.

3. Extraction des protéines nucléaires

Le protocole d'extraction des protéines nucléaires des cellules suit une méthode développée pour les thymocytes (Olnes & Kurl, 1994) et adaptée par nos soins afin d'obtenir une qualité d'extrait adaptée aux analyses protéomiques. Le tapis cellulaire est lavé 5 fois avec 10ml de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}], puis les cellules sont mises en suspension par grattage dans 5ml de PBS et centrifugées à 1 000rpm pendant 5min à 4°C. Le culot obtenu est de nouveau lavé dans 5ml de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}], puis centrifugé à 1 000rpm pendant 5min à 4°C. Les cellules sont comptées dès cette étape. Le culot est resuspendu (500µl pour 3 x 10^6 cellules) dans un tampon hypotonique (10mM Hepes pH 7,9 1,5mM KCl 8mM $MgCl_2$ 0,5mM DTT) supplémenté en inhibiteurs de protéases Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) et incubé sur glace pendant 15min. 40µl de NP-40 sont ajoutés, puis les culots subissent une

agitation au vortex pendant 10sec et une centrifugation à 500g pendant 5min à 4°C. Après élimination du surnageant, les culots nucléaires, sont repris dans 35µl de tampon hypertonique (20mM Hepes pH 7,9 0,15mM $MgCl_2$ 450mM NaCl 0,2mM EDTA 0,5mM DTT 0,5mM PMSF 0,25% NP-40 supplémenté en inhibiteurs de protéases) et incubés sur glace pendant 20min. Une centrifugation à 12 000g pendant 10min à 4°C permet de récupérer le surnageant qui contient les protéines nucléaires. Celles-ci sont aliquotées et conservées à -80°C.

La concentration des extraits en protéines est déterminée à l'aide du kit MicroBC Assay : Protein Quantification Kit (Uptima), en microplaque de 96 puits selon un protocole adapté de celui du fabricant. Une gamme étalon comprenant des concentrations connues (0 ; 1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20µg/ml) de BSA est réalisée, tandis que les échantillons à doser sont dilués (à partir d'une solution au 1/160ème) au 1/216ème ; 1/400ème ; 1/533ème. Le volume final de chaque puits est de 100µl, auxquels sont ajoutés 100µl de réactif du kit. Après une incubation d'01h00 à 60°C, l'absorbance est mesurée à 560nm à l'aide d'un lecteur Labsystems multiskan RC (Jencons) et les valeurs des inconnues comparées à la gamme afin de déterminer leur concentration.

4. Préparation des sondes plasmidiques UV

La préparation des plasmides linéarisés a été précédemment décrite, ainsi que l'introduction des lésions générées par le cisplatine. L'introduction des lésions photoinduites se fait par une simple exposition de la solution d'ADN au rayonnement UV. Le maximum d'absorption de lumière UV par l'ADN se trouvant à $\lambda = 260nm$, c'est une lampe émettant un rayonnement UVC (100-280nm) qui a été choisie (contrairement à l'irradiation des cellules) afin d'optimiser la formation des photoproduits au sein de nos plasmides. L'introduction des lésions sur les sondes plasmidiques est réalisée par exposition de l'ADN en « goutte congelée » (Millau *et al.*, 2008), ce qui a pour but de limiter la formation de lésions oxydatives dues à la présence naturelle d'O_2 dans les solutions aqueuses. Pour cela, la solution d'ADN est répartie en gouttes de 25µl sur la surface d'une boîte de Petri, puis congelée à -80°C. Ces gouttes sont ensuite exposées à la lumière UVC (débit 2,5mW, lampe Vilbert Lourmat) jusqu'à obtention d'une dose de 0,3J/cm^2. L'ADN est ensuite récupéré puis conservé à -20°C. Le taux de lésions a été évalué par CLPH-SM/SM, selon des conditions décrites plus loin. La fixation des sondes UV sur les billes magnétique est effectuée de la même façon que pour les sondes platinées. Un contrôle de la fixation effective de l'ADN est là encore effectué sur gel d'agarose, dont un exemple typique est visible dans la partie « Annexes » de ce travail.

5. Capture et analyse des protéines

La capture de protéines sur les sondes plasmidiques UV et cisplatine, puis leur identification par protéomique, a suivi un protocole d'analyse et de traitement des résultats

identique à celui décrit dans la partie concernant l'interactome des dérivés du platine. L'unique différence est l'utilisation de la plus forte condition de salinité (150mM NaCl) pour le tampon de rinçage du système de piège, avant la récupération des protéines fixées. Des analyses par immunodétection ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment.

D) SPRi

Les expériences de SPRi visant à l'analyse des capacités d'interaction de DDB2 avec les adduits 1,2-d(GpG) des trois dérivés du platine ont été menées dans les mêmes conditions que décrites dans la partie expérimentale décrivant la mise au point de la méthode pour l'étude des interactions d'HMGB1 et TOX4.

Une version recombinante de DDB2 (complète, tag GST, pI [protéine + tag] = 9,1 – Abnova) a été sélectionnée. La protéine de blocage choisie est cette fois le cytochrome C de cœur de cheval (Sigma) en raison de son point isolélectrique (pI = 9,6) proche de celui de DDB2 recombinante.

E) Mesure des capacités de réparation après un stress génotoxique

1. Principe général

La vitesse de réparation des lésions de l'ADN induites par un stress génotoxique est mesurée en observant la disparition de celles-ci au cours du temps après application dudit stress. Les cellules sont exposées à une dose fixe de l'agent génotoxique désiré, puis les culots cellulaires récupérés à différents temps et leur ADN est extrait puis digéré. Enfin, le taux de lésions à chaque temps est mesuré par CLHP-SM/SM.

2. Exposition des cellules au rayonnement UVB

Les cellules MDA MB 231 sont cultivées dans les mêmes conditions que pour le test MTT, mais dans des boîtes de 60mm (bp60, BD Falcon) de diamètre (V_{final} = 4ml ; total = 80 000 cellules). Elles sont irradiées selon la dose choisie à partir du test MTT et dans les mêmes conditions que pour celui-ci (volume de PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}] = 2ml, volume de milieu restitué = 3,7ml). Les cellules sont replacées à l'étuve et collectées séquentiellement en fonction des temps de réparation choisis. Le nombre de boîtes nécessaires pour chaque condition est indiqué dans le Tableau 19 (ce nombre est augmenté pour les temps les plus éloignés afin d'augmenter la quantité totale d'ADN et donc d'adduits dans les échantillons, ce qui facilite leur détection par spectrométrie de masse).

Temps	00h00	04h00	08h00	24h00	48h00	Non irradiées
Nombre de bp60	2	2	2	3	4	2
Répliques	3	3	3	3	3	3
Nombre total de bp60	6	6	6	9	12	6

Tableau 19 : Nombre de bp60 nécessaires pour chaque condition lors du test de réparation de lésions UV-induites.

La récolte des cellules nécessite de réserver le milieu de chaque boîte, de laver le tapis cellulaire à l'aide de 2ml PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}], et de décrocher les cellules en utilisant 1ml de trypsine-EDTA et en les incubant brièvement à 37°C. 2ml de milieu réservé sont ajoutés afin d'inhiber l'action de la trypsine, les cellules sont homogénéisées et réunies afin d'obtenir trois réplicats pour chaque condition. Elles sont centrifugées durant 3min à 1 000g, puis le surnageant est éliminé, les cellules reprises dans 2ml PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}] et centrifugées à nouveau. Après élimination du PBS [-Ca^{2+}, -Mg^{2+}] le culot cellulaire sec est conservé à -80°C en attente de l'extraction de l'ADN.

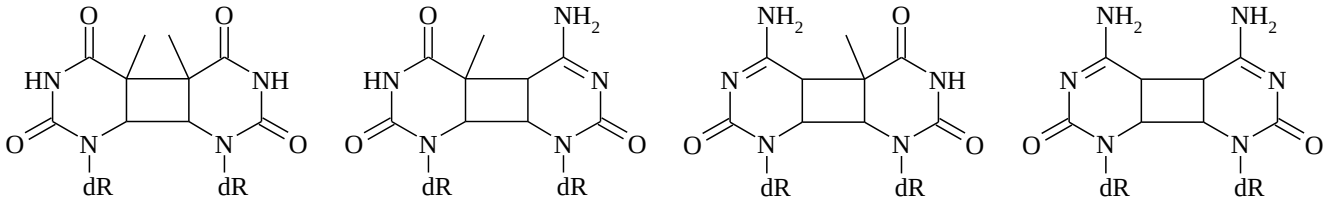
3. Extraction de l'ADN cellulaire

L'ADN cellulaire est extrait par resuspension de chaque culot sec par pipetages répétés dans 1ml de tampon de lyse A (320mM sucrose 5mM $MgCl_2$ 10mM Tris-HCl 0,1mM déféroxamine 1% Triton, pH7,5). Après centrifugation (1 500g, 5min) et élimination du surnageant, 0,5ml de ce même tampon de lyse est ajouté sur les culots nucléaires obtenus, qui sont resuspendus puis centrifugés (1 500g, 5min). Le surnageant est éliminé, puis 300µl de tampon de lyse B sont déposés (5mM EDTA-Na_2 10mM Tris-HCl 0,15mM déféroxamine, pH8) sur les culots nucléaires, qui sont homogénéisés avant que soit ajouté 18µl d'une solution 10% SDS et les échantillons à nouveau homogénéisés. L'ARN est éliminé par ajout de 1,5µl de RNase A (100mg/ml, Sigma) et 3,5µl de RNase T1 (1U/µl, Sigma) et incubation durant 15min à 50°C. Les RNases et autres protéines présentes sont dégradées par l'ajout de 15µl de protéase (20µg/µl, Qiagen) et incubation durant 01h00 à 37°C. L'ADN isolé est ensuite précipité par addition de 600µl d'une solution de NaI (20mM EDTA-Na_2 7,6M NaI, 40mM Tris-HCl 0,3mM déféroxamine, pH8) et 1ml d'isopropanol absolu suivie d'une agitation douce puis d'une centrifugation (5 000g, 5min). Un lavage des pelotes d'ADN est réalisé par ajout de 500µl d'isopropanol 40% et une centrifugation (5 000g, 5min), puis avec 500µl d'éthanol 70% et une centrifugation (5 000g, 5min). Enfin, les pelotes d'ADN sont diluées dans 50µl d'une solution de déféroxamine 0,1mM. L'ADN ainsi obtenu est conservé à -20°C.

Le protocole de digestion de l'ADN est identique à celui déjà décrit pour la quantification des adduits du platine dans les plasmides sondes.

4. Quantification des lésions UV

La quantification des lésions UVB par CLHP-SM/SM utilise le même système que celui employé lors de la mesure des adduits du platine. Les conditions d'élution chromatographique sont les suivantes (A = 100% ACN ; B = 2mM TEAA) : de 0 à 2% B en 8min, puis de 2 à 10% B en 12min, puis palier à 10%B durant 5min. Les solutions calibrées de photoproduits UV étaient déjà disponibles au sein du laboratoire, où elles ont été synthétisées, et il n'a donc pas été nécessaire d'en préparer. Les photoproduits mesurés sont représentés sur la Figure 71, et les transitions recherchées après fragmentation sont rassemblées dans le Tableau 20. Un spectre SM/SM typique présentant l'analyse de ces lésions est visible dans la partie « Annexes » de ce travail.



cis,syn CPD T-T | *cis,syn* CPD T-C | *cis,syn* CPD C-T | *cis,syn* CPD C-C



(6-4)-TT | (6-4)-TC

Figure 71 : Les six photoproduits mesurés par CLHP-SM/SM (dR = désoxyribose).

Type de lésion		Masse de l'ion parent	Masse du fragment	Remarque
CPD	T<>T	545	447	Perte d'un désoxyribose déshydraté
	T<>C / C<>T	531	195	Désoxyribose phosphate
	C<>C	517	195	Désoxyribose phosphate
(6-4)-PP	TT-(6-4)	545	432	Réarrangement complet et perte d'une chaîne de masse moléculaire 113
	TC-(6-4)	530	195	Désoxyribose phosphate

Tableau 20 : Transitions recherchées lors de l'analyse CLHP-SM/SM des CPD et (6-4)-PP.

La quantification des lésions a été réalisée de la même manière que pour celle des adduits du platine au sein de l'ADN plasmidique. La significativité des différences de taux de lésions aux différents temps de la cinétique a été évaluée à l'aide du test non paramètrique de Mann-Whitney adapté aux petites populations d'échantillons (n < 30).

5. Traitement au cisplatine

Les cellules sont cultivées dans les conditions normales en boîtes 75cm² durant 4 jours (le milieu étant changé le 3ème). La platination de l'ADN est réalisée en réservant le milieu de culture et en ajoutant 4ml de milieu -L-glu -SVF contenant 150µM de cisplatine. Les cellules sont exposées durant 01h00, puis récoltées en fonction des temps de réparation établis selon une méthode identique à la récolte des cellules irradiées avec les UVB.

L'extraction et la digestion de l'ADN ainsi que la quantification des adduits du cisplatine ont été réalisées selon les protocoles déjà décrits.

F) Mesure de l'expression de gènes

1. Culture des cellules

- Stress UVB

Les cellules sont cultivées et irradiées dans les mêmes conditions que pour la mesure de capacités de réparation des photoproduits. Les temps de récolte post-irradiation et le nombre de boîtes nécessaires à chacun de ces temps est indiqué dans le Tableau 21.

Temps	04h00	24h00	36h00	48h00	Non irradiées
Nombre total de bp60	3	3	3	3	3

Tableau 21 : Nombre de bp60 nécessaires pour chaque condition lors de la mesure d'expression de gènes suite à un stress UV.

- Traitement au cisplatine

Les cellules sont cultivées et traitées avec le cisplatine exactement dans les mêmes conditions que lors du test de réparation des adduits du cisplatine.

2. Extraction de l'ARN total

L'ARN total des culots cellulaires est extrait à l'aide du kit GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) selon le protocole du fabricant. Brièvement, les culots cellulaires sont soigneusement resuspendus dans la solution de lyse 1% 2-

mercaptoéthanol, puis le lysat est placé sur une colonne GenElute Filtration et centrifugé à 16 000g durant 2 min. À l'éluat est ajouté un volume d'EtOH 70%, et l'échantillon est soigneusement homogénéisé. Ce mélange est disposé sur une colonne GenElute Binding, qui est centrifugée à 16 000g durant 30sec. L'éluat est éliminé, et les acides nucléiques fixés sur la colonne rincés par ajout d'un volume de solution de lavage n°1 puis une centrifugation à 16 000g durant 30sec. Chaque colonne reçoit ensuite 80µl d'une solution de DNaseI (10µL d'enzyme et 70µL de tampon RDD, mélangés par inversion) et est incubée à température ambiante durant 15min, ce qui permet de dégrader tout ADN présent qui est ensuite éliminé par rinçage à l'aide d'un volume de solution de lavage n°1 et une centrifugation, puis par deux rinçages avec 500µl de solution de lavage n°2 80% EtOH puis centrifugation. 50µl de solution d'élution de l'ARN sont disposés sur chaque colonne, ce qui permet de récupérer une solution contenant l'ARN, et dont la concentration et le taux de contamination en protéines sont dosés par mesure d'absorbance à 260 et 280nm à l'aide du NanoDrop 1000. Une concentration supérieure à 200ng/µl est acceptable afin de réaliser une qPCR sur l'échantillon, ainsi qu'un rapport 260/280 entre 1,7 et 2,1 pour une préparation d'une pureté acceptable. L'ARN ainsi obtenu est conservé à -80°C.

L'intégrité de la préparation est vérifiée en déposant sur gel natif (1% agarose 0,5X TBE 0,5µg/µl bromure d'éthidium) 500ng d'ARN dans un tampon de dépôt (15% ficoll 0,25% cyanol de xylène 0,25% bleu de bromophénol), et en confirmant la présence de deux bandes correspondant aux ARN ribosomiques 18s et 28s (intensité relative 2:1, respectivement). Le marqueur de taille utilisé est le 1kb ladder (Invitrogen).

3. Rétrotranscription

La rétrotranscription de l'ARN total en ADNc est réalisée à l'aide du kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Brièvement, pour chaque échantillon 2µg d'ARN sont mélangés à 1µl d'amorces *random primers* (Promega), 1µl de dNTP 10mM (Sigma) et 12µl d'eau *RNase free*. Les échantillons sont chauffés à 70°C pendant 5min puis rapidement refroidis par transfert dans la glace. Après une courte centrifugation afin d'éliminer la condensation, 4µl de tampon First Strand Buffer 5X, 2µl de DTT 0,1M et 1µl d'inhibiteur de RNase (Sigma) sont ajoutés, le mélange homogénéisé puis incubé durant 2min à 25°C. Enfin, l'enzyme superscript II RT (200U, 1µl), est ajoutée et chaque échantillon incubé durant 10min à 25°C puis durant 50min à 42°C. À l'issue de la réaction de rétrotranscription, l'enzyme est inactivée par chauffage à 70°C durant 15min, et la solution d'ADNc conservée à -20°C.

4. PCR quantitative

- Test des amorces

Les séquences des amorces choisies pour nos gènes d'intérêt sont présentées dans le Tableau 22. À l'exception de S18 (Javeri *et al.*, 2008), TOX4, PNUTS (établies par nos soins à l'aide du programme Primer3 ; url : http://frodo.wit.mit.edu/primer3/), les séquences ont été déterminées dans le cadre d'une étude portant sur l'implication de la réparation de l'ADN dans la maladie d'Alzheimer (Anne Forestier). Elles ont été obtenues auprès d'Eurogentec.

Ces amorces ont été testées sur de l'ADNc de fibroblastes ([C] = 20ng/µl) disponible dans notre laboratoire. Dix dilutions séquentielles de cet ADNc dans l'eau ont été réalisées et déposées en double sur une plaque qPCR 96-well plate non-skirted high profile (Eurogentec), en ajoutant un contrôle sans ADNc (*non template*). Chaque puits reçoit ensuite :

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

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

- 5 minutes à 95°C (activation de la polymérase)
- 15 secondes à 95°C (dénaturation de l'ADN)
- 20 secondes à 55°C (hybridation des amorces) } (40 cycles)
- 40 secondes à 72°C (synthèse du brin complémentaire)
- 1 minute à 95°C (dénaturation de l'ADN)
- 30 secondes à 55°C (renaturation de l'ADN) } détermination de
- 30 secondes à 95°C (dénaturation de l'ADN) la courbe de fusion

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

$$N_n = N_{initiale} \times (1 + E)^n$$

où N est le nombre de copies de la séquence amplifiée et n le nombre de cycles. Pour E = 1 (efficacité de doublement de 100%), le nombre final de copies après n cycles est égal au nombre maximal théorique de copies qu'il est possible d'obtenir avec la quantité initiale de copies. L'efficacité mesurée expérimentalement doit être comprise entre 95 et 105% pour valider un couple d'amorces. L'observation de la courbe de fusion permet quant à elle de

s'assurer, par l'obtention d'un pic unique, qu'un seul produit correspondant à une amplification spécifique est présent dans le mélange.

GÈNE	SÉQUENCES DES AMORCES	TAILLE DE L'AMPLICON
S18	Forward : AAC GTC TGC CCT ATC AAC TTT Reverse : TGG ATG TGG TAG CCG TTT TCT	117
Cyclophiline A	Forward : TTCATCTGCACTGCCAAGAC Reverse : TCGAGTTGTCCACAGTCAGC	158
Cyclophiline B	Forward : GCAAGATCGAGGTGGAGAAG Reverse : CTGTGGAATGTGAGGGGAGT	171
GAPDH	Forward : GAGTCAACGGATTTGGTCGT Reverse : TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238
DDB2	Forward : TCAAGGACAAACCCACCTTC Reverse : GTGACCACCATTCGGCTACT	226
TOX4	Forward : TGGAAAGTAGTCCTGAGCGGCCT Reverse : AGGCTGGGGTGAGAGTGCCA	176
PNUTS	Forward : CTGAGCCCGAGGTGCTGACG Reverse : TGGTGAACGGGTCTGCAGGAG	229

Tableau 22 : Séquence des amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitative.

- Validation du gène de ménage

La mesure de l'expression de gènes par qPCR nécessite tout d'abord la validation de gènes de ménage, c'est-à-dire de gènes dont l'expression ne change pas au cours du temps malgré l'application d'un stress. Cela permet de disposer d'une référence invariable pour comparer les échantillons. À l'aide d'amorces dédiées décrites ci-dessus, l'expression de S18 (protéine ribosomale), cyclophiline A, cyclophiline B et GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase) est vérifiée sur les échantillons afin de choisir celui dont l'expression est la plus stable.

À l'issue de la rétrotranscription la concentration de l'ADNc est de 4ng/µL. Chaque puits reçoit 5µl de ce stock d'ADNc puis des volumes de réactifs équivalents à ceux décrits lors de l'étape de vérification des amorces. Les dépôts sont réalisés en triplicat pour chaque condition considérée. L'amplification est réalisée de façon identique à l'étape de validation des amorces.

La validation du gène de ménage le plus approprié parmi les quatre disponibles est effectuée à l'aide de la matrice Excel BestKeeper© version 1.0 (Pfaffl *et al.*, 2004). Afin de déterminer la variabilité d'expression du gène entre chaque condition expérimentale et chaque

lignée testée, la moyenne géométrique des cycles seuils est calculée, ainsi que la déviation standard associée. Le critère de validation est fondé sur un écart type des cycles seuils de toutes les conditions inférieur à 1. Ce fut le cas pour S18, que nous avons donc systématiquement choisi pour référence au cours de nos analyses.

- Mesure de l'expression de gènes d'intérêt

Ces analyses incluent sur chaque plaque le gène de ménage retenu et deux gènes d'intérêt au maximum. Le protocole d'amplification et d'acquisition des données est identique à celui dédié à la validation du gène de ménage.

Après vérification de la validité du gène de ménage à l'aide de la macro BestKeeper© Les résultats de la PCR quantitative sont analysés à l'aide de la macro Excel REST-MCS© (Pfaffl, 2001), capable de traiter un gène de ménage, plusieurs gènes d'intérêt et plusieurs conditions expérimentales. Elle réalise le calcul du facteur de sur- ou sous-expression par rapport à la condition contrôle selon la méthode du $\Delta\Delta$Ct, et procure également une mesure statistique (test de comparaison par paires après réallocation aléatoire) de la significativité de cette expression (p-value < 0,05). Selon la référence choisie il est alors possible de mesurer l'expression du gène au cours du temps au sein d'une même lignée (conditions de référence = cycles seuil pour les cellules non traitées), ou de comparer des lignées entre elles également au cours du temps (conditions de référence = cycles seuil pour les cellules contrôles non traitées). Les valeurs d'expression sont confirmées par l'utilisation d'un réplicat biologique.

II. Résultats

A) Vérification de l'expression de DDB2 et sensibilité des lignées aux trois dérivés du platine

Nous avons commencé par vérifier par immunodétection l'expression de la protéine DDB2 au sein d'extraits nucléaires préparés à partir de la lignée MDA MB 231 et des deux lignées transfectées MC et DDB2+, ansi qu'à partir de cellules HeLa (Figure 72). On peut ainsi constater que cette protéine n'est présente à l'état basal que dans les extraits HeLa et MDA MB 231 DDB2+.

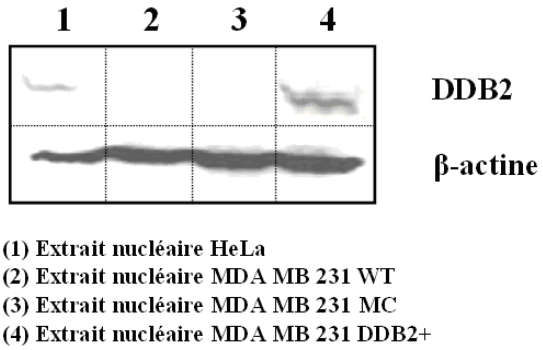


Figure 72 : Expression de la protéine DDB2 dans les sources de protéines nucléaires utilisées lors de notre étude.

Ces différences entre les lignées MC et DDB2+ ont été confirmées au niveau des transcrits par plusieurs tests de qPCR. Nous avons remarqué qu'à l'état basal, le niveau de transcrit diffère d'un facteur important et très variable (de 15 à 200 en faveur de la lignée DDB2+ selon les expérimentations).

B) Détermination de l'interactome des lésions UV et cisplatine à partir des extraits MDA MB 231 MC et DDB2+

1. Détermination préalable de la sensibilité des lignées au trois dérivés du platine

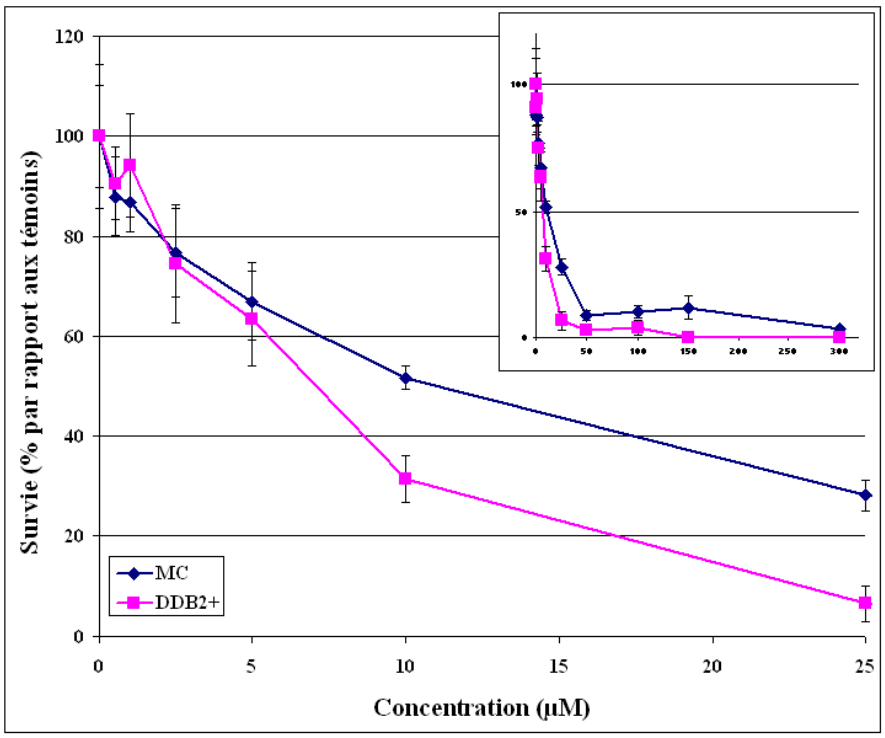
Un test de cytotoxicité MTT a été conduit sur les deux lignées MDA MB 231 MC et DDB2+ exposées aux trois dérivés du platine (cisplatine, oxaliplatine, JM118), avec un double objectif : déterminer les doses de ces agents à appliquer dans la suite de nos expériences ; vérifier si la surexpression de DDB2 influe sur leur sensibilité à des agents génotoxiques tels que le rayonnement UV et les dérivés du platine.

Les cellules ont été exposées à des doses croissantes de chacun des trois dérivés durant 24h00, et une mesure de la survie cellulaire a été effectuée 24h00 et 48h00 après la fin de l'exposition. Les résultats obtenus pour le cisplatine sur les deux lignées sont visibles sur la

Figure 73. La lignée DDB2+ (DL_{50} ≈ 7µM à 24h00) est plus sensible que la lignée MC (DL_{50} = 10µM à 24h00). De plus, pour la première de ces deux lignées la mortalité cellulaire est quasi-totale dès 25µM, alors que ceci n'est observable qu'à partir de 50µM pour la lignée MC. Le même test conduit sur les deux lignées et avec l'oxaliplatine a produit les résultats présentés sur la Figure 74. La lignée DDB2+ (DL_{50} = 1µM à 24h00) est là encore plus sensible que la lignée MC (DL_{50} > 5µM à 24h00 ; un plateau de viabilité autour de 50%-60% est observé entre 5 et 50µM à 24h00). Enfin, l'exposition des deux lignées au JM118 (Figure 75) montre que la lignée DDB2+ (DL_{50} ≈ 5µM à 24h00) est toujours plus sensible que la lignée MC (DL_{50} ≈ 10µM à 24h00). À 48h00, la lignée DDB2+ s'avère également plus sensible aux dérivés du platine que la lignée MC. Globalement, les DL_{50} des trois dérivés sont du même ordre de grandeur, mais les cellules semblent toutefois plus sensibles à l'oxaliplatine.

Ainsi, pour chacun de nos trois dérivés du platine, les cellules exprimant la protéine DDB2 se sont avérées plus sensibles que la lignée contrôle MC. Le cisplatine est le seul des trois qui a été retenu pour la suite des expérimentations. En nous basant sur ces courbes de cytotoxicité, la dose sélectionnée pour le traitement de cellules destinées à la production d'extraits nucléaires est de 5µM (entre 60 et 80% de survie).

A



B

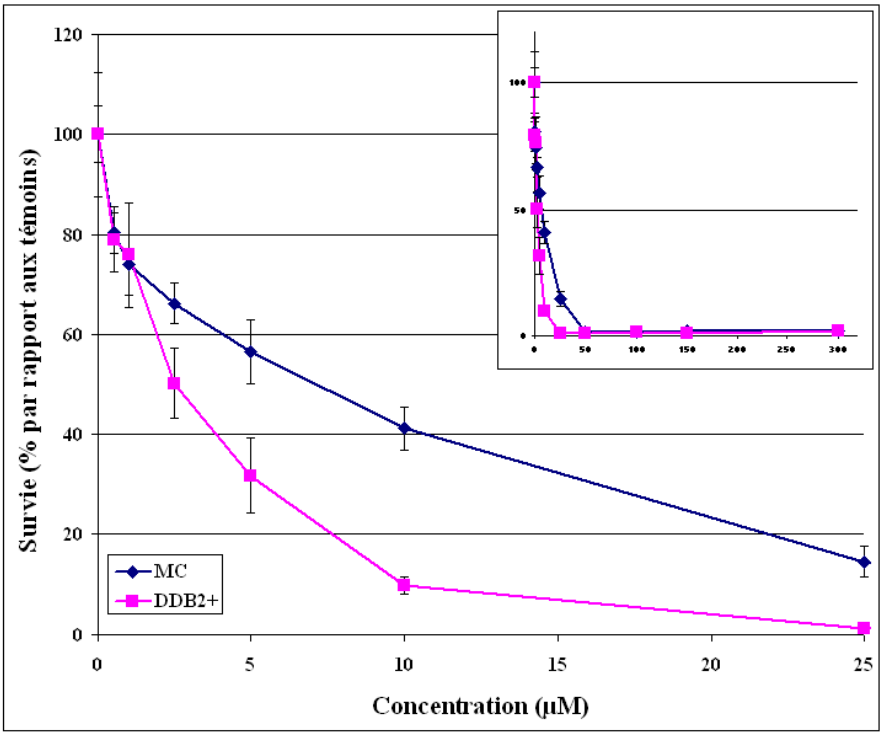
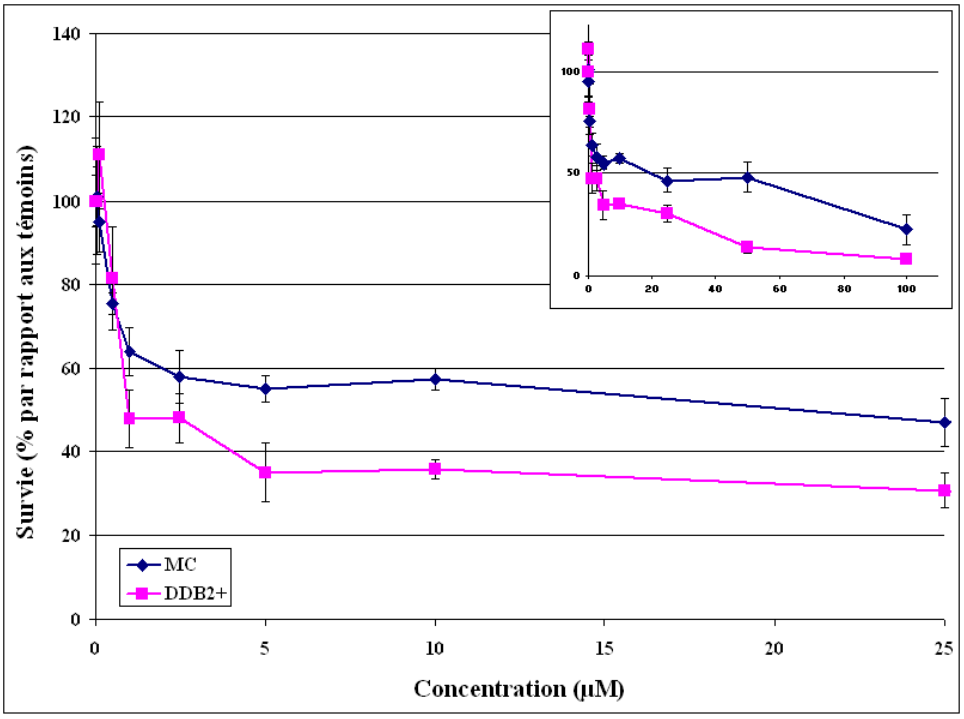


Figure 73 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ 24h00 (A) et 48h00 (B) après exposition à des doses croissantes de cisplatine.

A



B

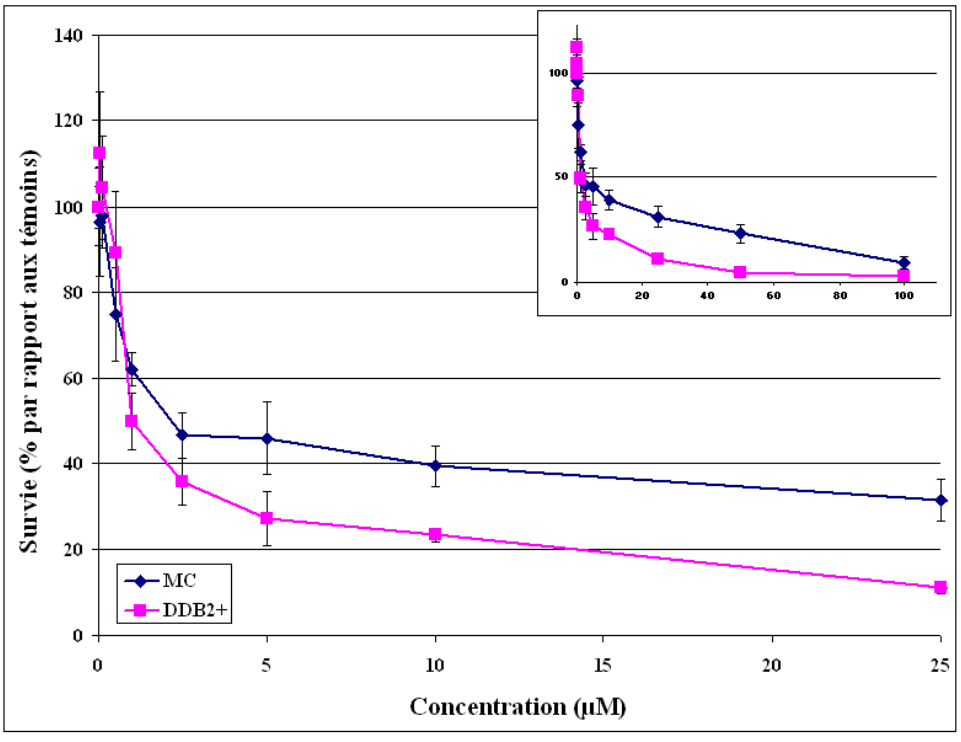
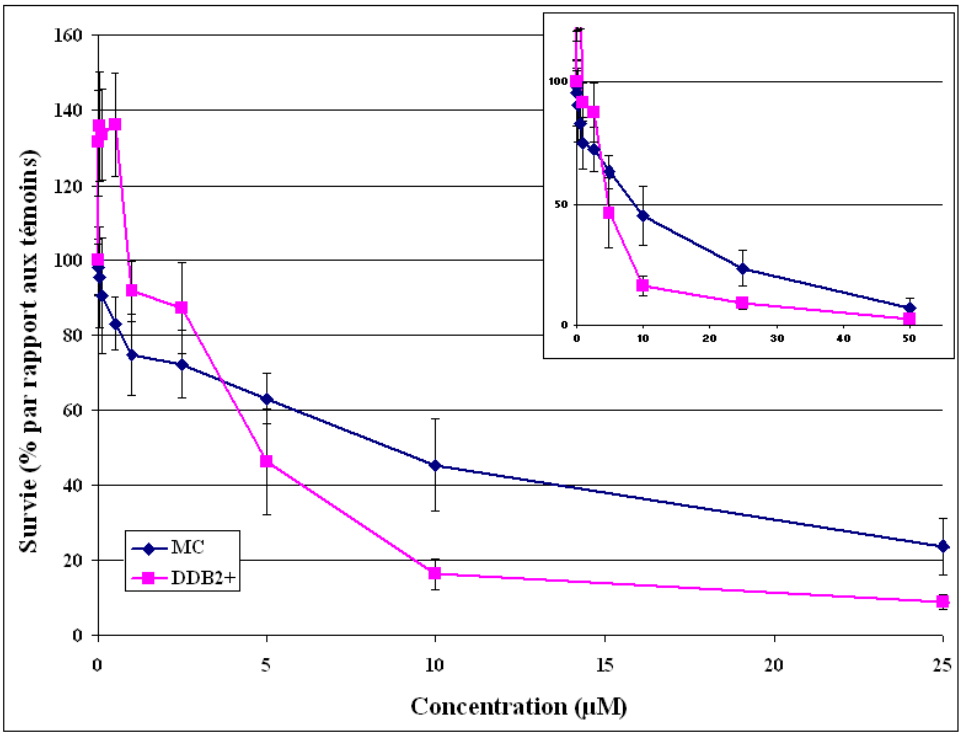


Figure 74 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ 24h00 (A) et 48h00 (B) après exposition à des doses croissantes d'oxaliplatine.

A



B

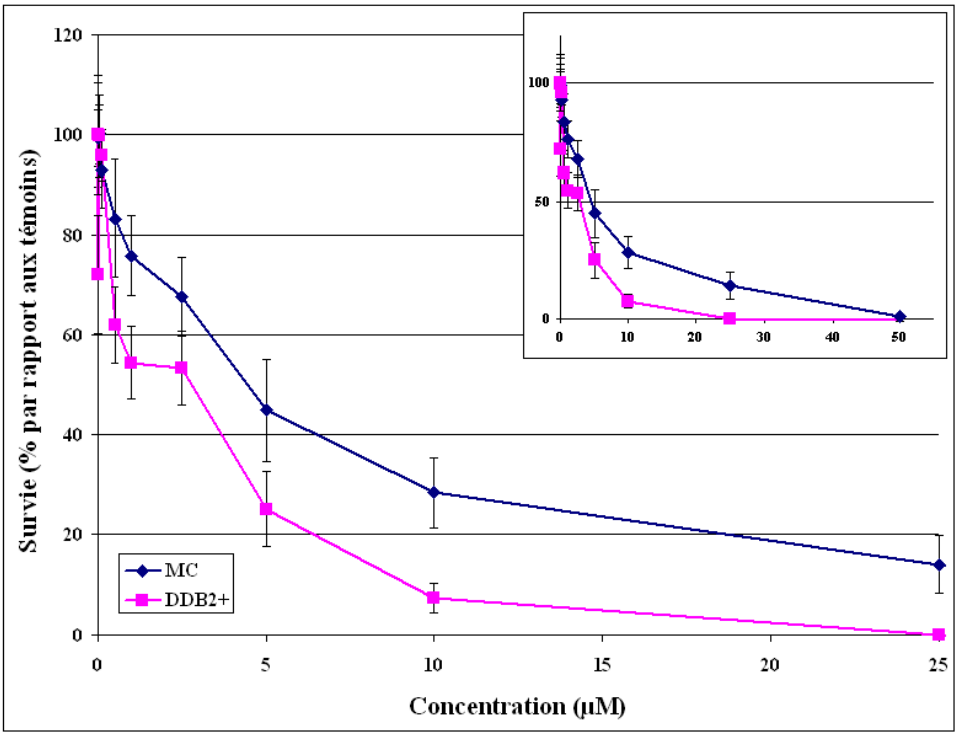


Figure 75 : Résultats du test de cytotoxicité sur les lignées MC et DDB2+ 24h00 (A) et 48h00 (B) après exposition à des doses croissantes de JM118.

2. Mise au point des sondes plasmidiques UV

Disposant déjà d'une sonde plasmidique lésée par le cisplatine, nous avons mis au point une sonde analogue mais portant cette fois les photoproduits UV. Le protocole d'introduction de ces lésions était déjà bien établi dans notre laboratoire et n'a pas nécessité de mise au point particulière. La répartition des lésions formées sur les plasmides du lot obtenu est indiquée dans le Tableau 23.

	Dimères (6,4)-pyrimidine-pyrimidone		**Dimères de pyrimidine cyclobutane**			
	T<>C	*T<>T*	*C<>T*	*T<>C*	*T<>T*	*C<>C*
Nombre de lésions / plasmide	9,8	1,8	0,2	1,3	23,8	0,3

Tableau 23 : Nombre de lésions obtenues sur les plasmides irradiés par les UVC.

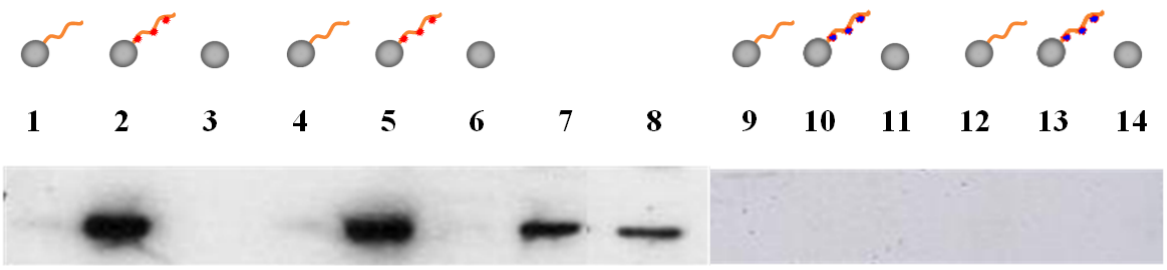
Au total, on peut constater que le nombre total de dimères formés (37,3 par plasmide) est du même ordre de grandeur mais inférieur au nombre d'adduits majoritaires du platine obtenus sur les autres stocks d'ADN (30-60 adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG)). La répartition des lésions (69% CPD, 31% (6-4)-PP) correspond à ce qui a été précédemment observé après irradiation de plasmides avec un rayonnement UVC (Gaillard *et al.*, 1996). Ici, plus précisément, le CPD TT est largement majoritaire (64% du total), suivi par le (6-4)-TC (26%) et le CPD TC (3,5%).

Les UVC, plus nocifs que les UVA et UVB, n'ont pas la capacité de franchir la couche d'ozone. Il existe donc peu d'études portant sur les effets de ce type de rayonnement sur les cellules. Cependant, notons tout de même, afin de comparer avec ce qui se produit *in cellulo*, que ces proportions diffèrent de ce qui est observé après irradiation UVB de fibroblastes humains : 37% CPD TT, 31% CPD TC, 14% (6-4)-PP TC. Ce type de rayonnement favorise particulièrement, sur les cellules, la formation de CPD TC par rapport à l'ADN nu de nos sondes. En outre, le nombre de lésions formées sur l'ADN cellulaire est bien sûr plus faible que sur nos plasmides nus, puisqu'à 0,2J.cm^{-2} il ne dépasse pas 35 (UVB) et 11 (UVA) CPD TT par million de nucléosides normaux (Mouret *et al.*, 2008).

3. Évaluation préalable par immunodétection de l'interaction de DDB2 avec les sondes plasmidiques

Avant de débuter les analyses protéomiques, le piège plasmidique portant les lésions UV a été employé pour vérifier par simple immunodétection la possibilité de capturer DDB2. En parallèle, la présence de cette protéine a été recherchée sur les sondes portant les adduits du cisplatine. La Figure 76 montre que DDB2 est effectivement capturée par nos sondes lésées par les UV (pistes 2 et 5). En revanche, elle n'est pas retenue par les sondes portant les

adduits du cisplatine (pistes 10 et 13). De plus, on remarque que dans le cas des lésions UV, la stringence du tampon de rinçage du système n'a pas d'influence sur la capacité de DDB2 à être retenue par celui-ci : en effet, un signal équivalent est observé à 150 et 50mM NaCl. Partant du constat que HMGB1 est aussi capable de reconnaître les lésions UV (Pasheva *et al.*, 1998) avec une affinité tout de même inférieure à celle pour les adduits du platine (K_d = 1,2 et 4µM pour les (6-4)-PP TT et TC, respectivement), nous avons aussi vérifié son éventuelle liaison à la sonde plasmidique UVC, cette fois sans succès.



(1) Billes + ADN non lésé fixé (stringence 150mM NaCl)
(2) Billes + ADN lésé UV fixé (stringence 150mM NaCl)
(3) Billes seules (stringence 150mM NaCl)
(4) Billes + ADN non lésé fixé (stringence 50mM NaCl)
(5) Billes + ADN lésé UV fixé (stringence 50mM NaCl)
(6) Billes seules (stringence 50mM NaCl)
(7) Extrait HeLa commercial (20µg)
(8) Extrait MDA-MB231 DDB2+ (20µg)
(9) Billes + ADN non lésé fixé (stringence 150mM NaCl)
(10) Billes + ADN lésé cisplatine fixé (stringence 150mM NaCl)
(11) Billes seules (stringence 150mM NaCl)
(12) Billes + ADN non lésé fixé (stringence 50mM NaCl)
(13) Billles + ADN lésé cisplatine fixé (stringence 50mM NaCl)
(14) Billes seules (stringence 50mM NaCl)

Figure 76 : La protéine DDB2 est efficacement retenue par le piège portant les dommages UVC (pistes 2 et 5) mais pas par les adduits du cisplatine (pistes 10 et 13).

Les sondes plasmidiques portant les photoproduits UV sont donc elles-aussi efficaces pour piéger une protéine attendue telle que DDB2. En revanche, les capacités de fixation de DDB2 sur les lésions platinées n'ont pu être confirmées ici.

4. Interactome des adduits du cisplatine

Une analyse protéomique a été menée sur des échantillons isolés (seule la stringence de rinçage la plus saline – 150mM NaCl – a été conservée) à l'aide de sondes plasmidiques portant les adduits du cisplatine. Nous avons utilisé comme sources de protéines des extraits nucléaires produits à partir de cellules de lignées MC et DDB2+, exposées ou non à 5µM cisplatine durant 24h00, puis récoltées 24h00 après la fin de cette exposition, ce qui permettait de déterminer uen éventuelle influence de l'exposition à cet agent chmiothérapeutique sur l'interactome. Chaque échantillon a reçu la même quantité d'ADN sonde et d'extraits nucléaires MDA MB 231 que lors de l'établissement de l'interactome des lésions du platine à l'aide des extraits HeLa. Les analyses protéomiques ont de nouveau été menées par la plate-forme LEDyP, en utilisant des paramètres expérimentaux identiques à ceux mis en œuvre lors de l'établissement de l'interactome des lésions platinées. Une différence importante est

cependant à relever : cette expérimentation n'a été pratiquée qu'une seule fois alors que deux séries de manipulations indépendantes avaient été effectuées pour les extraits HeLa.

Les protéines retenues spécifiquement par la sonde cisplatine sont visibles dans le Tableau 24 et sur le Tableau Excel Analyse_4. Elles sont au nombre de 17, dont six sont communes aux quatre conditions. Parmi celles-ci on trouve bien les protéines les plus attendues : HMGB1, HMGB2, HMGB3 (sauf dans les extraits de la lignée DDB2+ non exposée), SSRP1, Spt16. De plus, nous avons pu confirmer sur ces deux modèles cellulaires la possibilité de capturer les membres du complexe PTW/PP PNUTS et TOX4 à partir des extraits nucléaires de la lignée MC non exposée au cisplatine, et de la lignée DDB2+ exposée ou non à cet agent. WDR82, en revanche, n'a été identifiée que sur les sondes exposées aux extraits issus de la lignée MC exposée au cisplatine. Un autre membre de l'interactome des lésions du cisplatine déjà connu est également identifié ici. Il s'agit de TFAM, protéine à boîte HMG. Les résultats présentés ici ne provenant que d'une seule analyse, il serait nécessaire de répéter celle-ci afin de confimer les capacités de liaison des autres candidats mentionnés dans le Tableau 24.

En raison des différences de capture notées pour la lignée MC après exposition au cisplatine, nous avons mesuré l'expression de TOX4 et PNUTS sur 48h00 après exposition des cellules au cisplatine par qPCR. Cependant, nous n'avons pas observé de variation significative de l'expression de ces deux protéines.

L'utilisation d'un second modèle cellulaire a donc permis de confirmer les résultats originaux obtenus à l'aide des sondes cisplatine à partir d'extraits HeLa (capture du complexe PTW/PP). En revanche, ni DDB1 ni DDB2 ne paraissent pouvoir se lier aux adduits du cisplatine dans nos conditions, comme cela avait été envisagé à travers l'immunodétection.

PROTÉINES RETENUES PAR LA SONDE CISPLATINE							
				Nature des extraits nucléaires			
Nom générique (Uniprot)	**Entrée (Uniprot)**	**Nombre de peptides (extrêmes)**	**Score (extrêmes)**	**MC**	**MC cisplatine**	**DDB2+**	**DDB2+ cisplatine**
AP-2 complex subunit μ AP2M1	AP2M1_HUMAN	2	136	X	-	-	-
Actin-related protein 3 ARP3	ARP3_HUMAN	2	95	-	-	X	-
F-actin-capping protein subunit β	CAPZB_HUMAN	7	132	X	-	-	-
Condensin complex subunit 1	CND1_HUMAN	2	87	X	-	-	-
Coatomer subunit β	COPB_HUMAN	2	88	X	-	-	-
HMGB1	HMGB1_HUMAN	8 - 18	224 - 602	X	X	X	X
HMGB2	HMGB2_HUMAN	7 - 17	161 - 493	X	X	X	X
HMGB3	HMGB3_HUMAN	2 - 4	103 - 234	X	X	X	-
PNUTS	PP1RA_HUMAN	3 - 7	154 - 319	X	-	X	X
60S ribosomal protein L11	RL11_HUMAN	2	107	-	-	-	X
60S ribosomal protein L23	RL23_HUMAN	2	159	-	-	-	X
Spt16	SP16H_HUMAN	3 - 8	113 - 361	X	X	X	X
SSRP1	SSRP1_HUMAN	4 - 7	193 - 363	X	X	X	X
Transcription factor A, mitochondrial TFAM	TFAM_HUMAN	6 - 18	217 - 543	X	X	X	X
TOX4	TOX4_HUMAN	4 - 6	214 - 273	X	-	X	X
hUBF	UBF1_HUMAN	8 - 29	245 - 1132	X	X	X	X
WDR82	WDR82_HUMAN	7	269	-	X	-	-

Tableau 24 : Interactome des adduits du cisplatine isolé à partir d'extraits de cellules MDA MB 231 MC et DDB2+ préalablement traitées ou non au cisplatine.

5. Interactome des photoproduits UV

En parallèle de l'analyse de l'interactome des adduits du cisplatine, l'analyse protéomique a aussi été menée sur des échantillons isolés (seule la stringence de rinçage la plus saline – 150mM NaCl – a été conservée) à l'aide des sondes plasmidiques portant les photoproduits UV et avec les mêmes sources de protéines que celles utilisées sur les sondes cisplatine. Le Tableau 25 rassemble les 18 candidats spécifiquement retenus par les sondes UV, et l'ensemble de l'analyse est aussi consultable sur le Tableau Excel Analyse_4. On constate immédiatement qu'aucune de ces protéines n'est commune aux quatre types d'extraits nucléaires. DDB1 a été identifiée dans trois des quatre conditions, sa capture ne se trouvant abolie que dans les extraits de cellules MC exposées au cisplatine. Notons de plus que cette protéine a été identifiée avec un nombre de peptides bien plus important (35 et 51) dans les extraits DDB2+ que dans l'extrait MC (7). DDB2, quant à elle, a été retrouvée sur les sondes exposées aux extraits DDB2+, indépendamment de l'exposition au cisplatine.

Remarquons qu'un nombre plus important (facteur 4-6) de peptides a été observé pour DDB1 par rapport à DDB2. Ceci peut s'expliquer par le fait que DDB1 est une plus grosse protéine que DDB2 (127kDa contre 48kDa, respectivement), et justifie peut-être le fait que l'on soit parvenu à détecter DDB1 pour la lignée MC en dépit d'une expression basale de DDB2 extrêmement faible.

PROTÉINES RETENUES PAR LA SONDE UVC							
Nom générique (Uniprot)	**Entrée (Uniprot)**	**Nombre de peptides (extrêmes)**	**Score (extrêmes)**	***Nature des extraits nucléaires***			
				MC	**MC cisplatine**	**DDB2+**	**DDB2+ cisplatine**
Acetyl-CoA carboxylase 1 ACACA	ACACA_HUMAN	2	92	-	-	X	-
α-actinin-1	ACTN1_HUMAN	3	214	-	-	X	-
Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNK_HUMAN	4	121	-	-	X	-
Annexin A2	ANXA2_HUMAN	5	111	-	-	X	-
Barrier-to-autointegration factor BAF	BAF_HUMAN	3	139	-	X	-	-
Cytoskeleton-associated protein 4	CKAP4_HUMAN	2	96	-	X	-	-
DDB1	DDB1_HUMAN	7 - 51	333 - 1757	X	-	X	X
DDB2	DDB2_HUMAN	8 - 9	204 - 345	-	-	X	X
Elongation factor 1-δ EEF1D	EF1D_HUMAN	4	164	-	-	X	-
Eukaryotic initiation factor 4A-I IF4a	IF4A1_HUMAN	6	263	-	-	X	-
Ku80/XRCC5	KU86_HUMAN	8	231	-	-	X	-
Nucleolin	NUCL_HUMAN	2	117	-	-	X	-
Polyadenylate-binding protein 1 PABPC1	PABP1_HUMAN	2	99	-	-	X	-
Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PYC_HUMAN	3 - 4	148 - 176	X	X	-	-
Rac GTPase-activating protein 1 RACGAP1	RGAP1_HUMAN	2	124	-	X	-	-
60S ribosomal protein L12	RL12_HUMAN	2	75	-	-	X	-
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 HNRNPA1	ROA1_HUMAN	4	219	-	-	X	-
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 VDAC2	VDAC2_HUMAN	4	137	-	X	-	-

Tableau 25 : Interactome des photoproduits UVC isolé à partir d'extraits de cellules MDA MB 231 MC et DDB2+ préalablement traitées ou non au cisplatine.

Malgré la présence des deux membres de l'hétérodimère UV-DDB, on notera l'absence d'autres partenaires connus de ces deux protéines (tels que CUL4, RBX1 ou E2F1, ou XPC-HR23B). Notons en outre la présence de quelques protéines déjà évoquées dans le présent volume, telles que Ku80, VDAC, ainsi qu'EF1D et IF4A, deux facteurs intervenant dans la traduction de l'ARNm.

Les analyses protéomiques confirment donc la possibilité de capturer le complexe UV-DDB sur nos sondes UV. Une fois encore, les résultats présentés ici ne provenant que d'une seule analyse, il serait nécessaire de répéter celle-ci pour confirmer les capacités de liaison des autres candidats mentionnés.

C) Vérification par SPRi de l'affinité de DDB2 pour les lésions des dérivés du platine

En raison de l'absence d'UV-DDB sur nos sondes plasmidiques portant les adduits du cisplatine, nous avons voulu confirmer à l'aide de notre biopuce SPRi l'observation selon laquelle DDB2 n'interagit pas fortement avec de telles lésions. En marge de l'évaluation de la fixation de TOX4 sur les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine, de l'oxaliplatine et du JM118 par SPRi, l'affinité de DDB2 pour ces mêmes lésions a été testée.

Nous avons là encore utilisé une version recombinante de la protéine. Un prisme avec lequel la fixation d'HMGB1 et de TOX4 sur les adduits 1,2-d(GpG) des trois dérivés du platine a été détectée a été utilisé pour cette série d'expériences. Deux concentrations (20 et 40nM) de DDB2 ont été injectées sur la puce, avec une étape de régénération saline intermédiaire. Enfin, deux concentrations identiques de cytochrome C, servant de contrôle non relevant, ont été injectées, là encore avec une étape de régénération saline intermédiaire.

Les résultats de ces expériences d'interaction sont visibles sur la Figure 77 (concentration des protéines = 20nM). On y constate qu'aucune interaction n'est observée. À plus forte concentration, les sensorgrammes se sont avérés équivalents pour les deux protéines. Une répétition de l'expérience sur un autre prisme et avec un lot différent de DDB2 recombinante a produit des résultats similaires.

La biopuce SPRi confirme donc, dans nos conditions, l'incapacité de DDB2 d'interagir avec les adduits 1,2-d(GpG) formés par les trois dérivés du platine. Après avoir étudié les capacités d'interaction de DDB2 avec les lésions platinées, nous avons voulu étudier les capacités de réparation de nos deux modèles cellulaires.

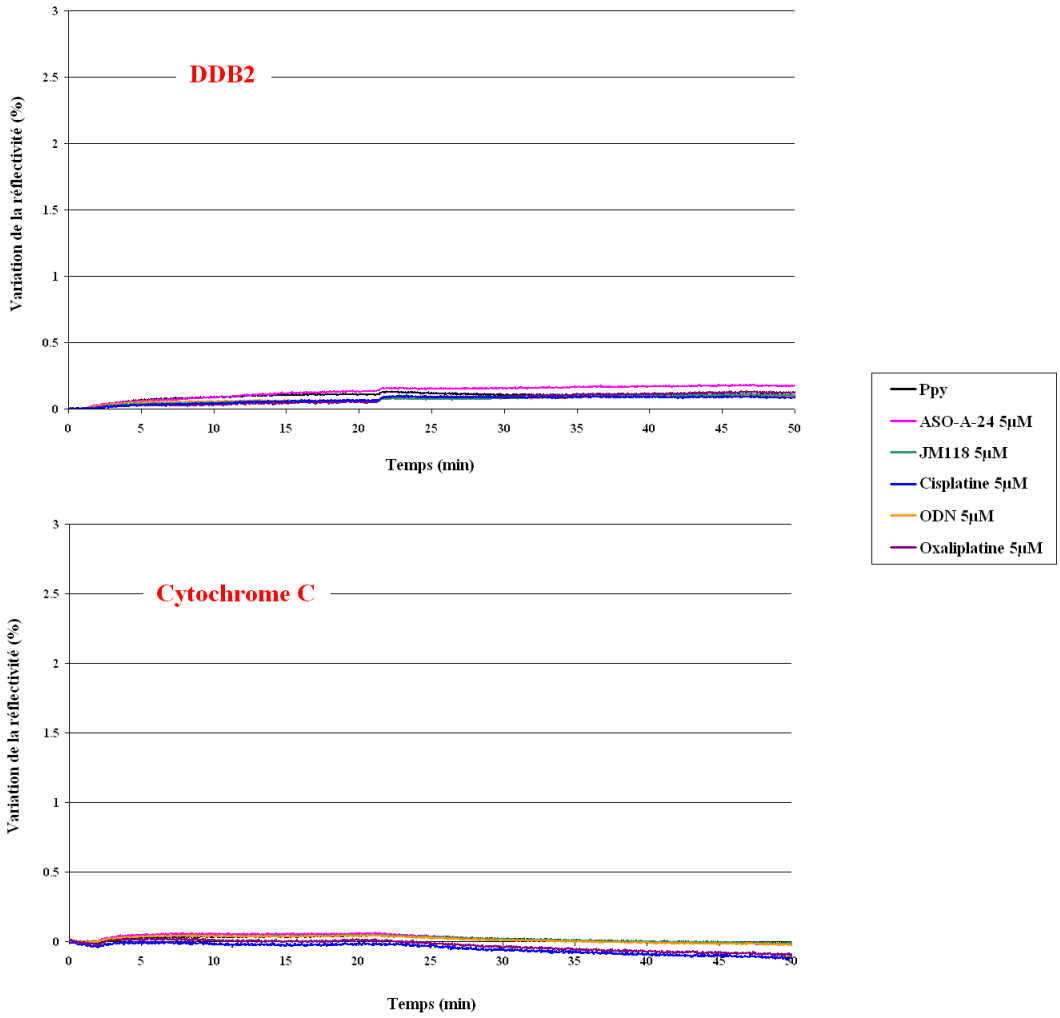


Figure 77 : La protéine DDB2 (20nM) n'interagit pas spécifiquement avec nos sondes platinées sur la biopuce SPRi. Le cytochrome C est utilisé en tant que contrôle négatif.

D) Évaluation des capacités de réparation des adduits de l'ADN selon le statut DDB2

1. Détermination de la dose d'exposition aux UV par test de cytotoxicité

Avant d'étudier la réparation, il était nécessaire de déterminer la dose d'irradiation UV à appliquer sur les cellules. Celles-ci ont donc été exposées à des doses croissantes de rayonnement UVB (0-0,5J.cm^{-2}) et la survie cellulaire a été déterminée 24h00 après traitement. Leur viabilité à chacune de ces doses est visible sur la Figure 78.

On peut constater qu'à l'inverse du cas des dérivés du platine, les deux lignées transfectées présentent une sensibilité très similaire au rayonnement UVB après exposition aux doses les plus basses : la dose permettant d'obtenir 50% de survie est DL_{50} = 0,05J.cm^{-2}. Au-delà, la viabilité est systématiquement plus importante pour la lignée DDB2+ même si les courbes se suivent de façon assez proche. Désireux de travailler lors des tests de réparation et d'expression de DDB2 avec une dose capable d'induire une mortalité raisonnable et similaire

des cellules (autour de 30%), nous avons sélectionné la dose D = 0,02J.cm^{-2}, responsable de la mort d'environ 27% des cellules pour la lignée MC et 38% pour la lignée DDB2+.

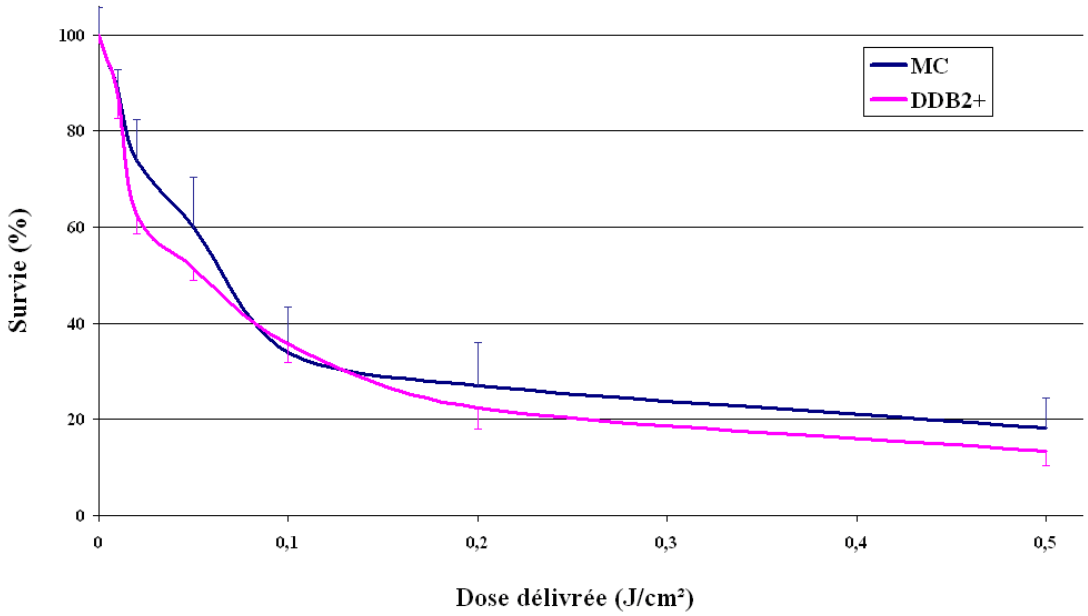


Figure 78 : Courbes de cytotoxicité des lignées MDA MB 231 MC et DDB2+ après exposition à des doses croissantes de rayonnement UVB.

2. Mesure de la cinétique de réparation des adduits

Les capacités de réparation des lésions déformantes de l'ADN pour nos deux lignées ont été évaluées à l'aide d'une cinétique de réparation des lésions générées par les UVB et cisplatine. Les cellules ont tout d'abord été exposées à une dose fixée de chacun des agents génotoxiques (UVB : 0,02J.cm^{-2} ; cisplatine : 150µM durant 01h00) puis récupérées à plusieurs temps successifs après exposition (04h00, 08h00, 24h00, 48h00). La cinétique a ensuite été évaluée après extraction de l'ADN génomique et mesure par CLHP-SM/SM des adduits. Les résultats pour les photoproduits seront présentés dans un premier temps, suivi par ceux obtenus pour le cisplatine.

3. Réparation des photoproduits UVB

La réparation des photoproduits a été suivie sur 48h00, et les résultats sont présentés sur les Figures 79 et 80. On y constate tout d'abord, pour les deux lignées, une réparation très rapide des (6-4)-PP. Dès 04h00, leur niveau ne dépasse pas 3% du nombre initial pour les (6-4)-TC, 6% (MC) et 14% (DDB2+) pour les (6-4)-TT. La réparation des CPD, quant à elle, se fait de façon beaucoup plus lente. La lignée MC, tout d'abord, répare de façon très similaire les c,s TC, cs, TT et c,s CC, puisqu'il reste à 48h00 entre 56 et 63% de leur quantité initiale.

Les c,s CT, par contre, sont réparés plus efficacement : dès 08h00, il reste 63% du taux initial (contre 81-88% pour les autres CPD), et à 48h00 70% de ces lésions ont été réparées. La lignée DDB2+ répare aussi efficacement les c,s TC et c,s CC. Les c,s TT sont moins bien réparés que les deux précédentes lésions pour cette même lignée, alors que les c,s CT sont mieux traités que les c,s TT.

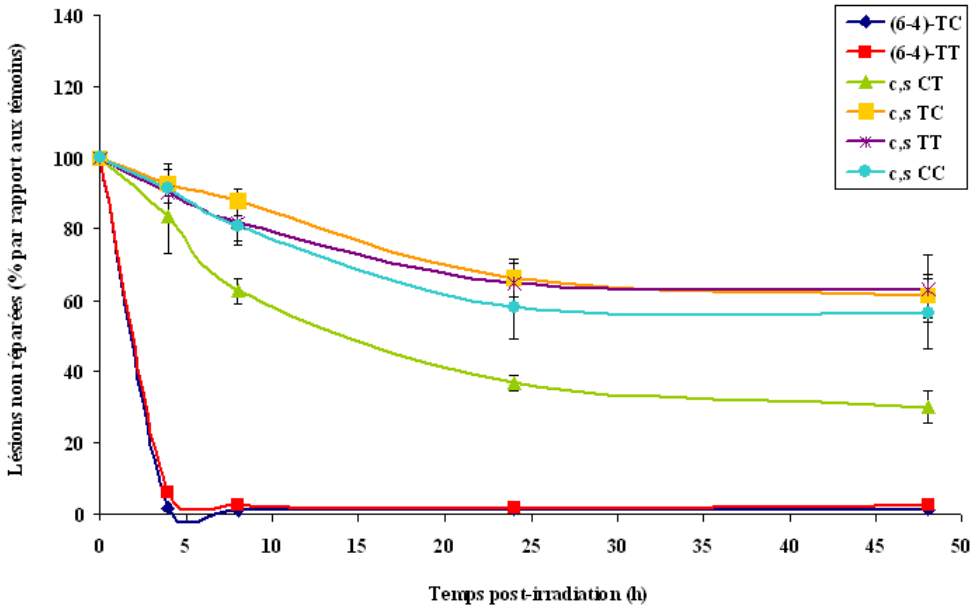


Figure 79 : Cinétique de réparation des photoproduits par la lignée MC.

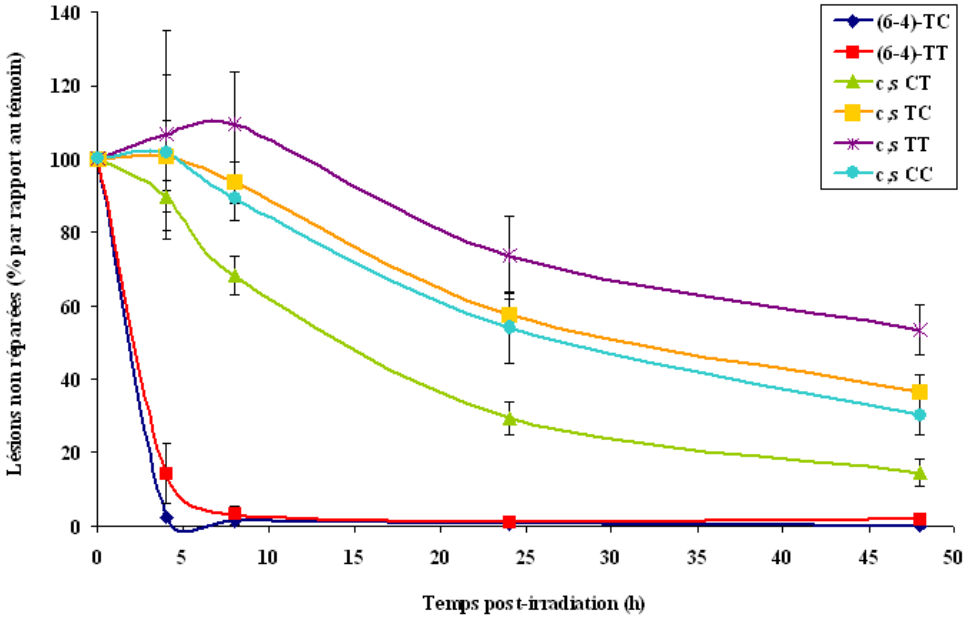


Figure 80 : Cinétique de réparation des photoproduits par la lignée DDB2+.

Afin de comparer les capacités de réparation des deux lignées, nous avons mis en parallèle la quantité de chaque lésion (nombre de dimères par millions de nucléosides

normaux) mesurée dans l'ADN génomique des cellules MDA MB 231 à 00h00 et 48h00 lors de la cinétique de réparation, les différences étant surtout significatives pour ce dernier temps. Les histogrammes résultant apparaissent sur la Figure 81. On constate tout d'abord que le taux basal de chaque lésion est très similaire pour les deux lignées. Si l'on compare ces valeurs avec celles obtenues pour les sondes plasmidiques destinées à l'établissement de l'interactome des photoproduits UV, on constate que les CPD c,s TT constituent à nouveau la lésion prédominante. Les c,s TC suivent immédiatement, ce qui diffère des plasmides où les (6-4)-TC représentaient la deuxième majoritaire.

On retrouve sur ces histogrammes la réparation quasi-complète des (6-4)-PP à 48h00, alors que l'efficacité d'élimination des CPD n'est pas semblable pour chacun d'entre eux, et entre les lignées MC et DDB2+. Dans tous les cas, des différences statistiquement significatives sont effectivement notables. Pour ces quatre formes d'adduits, la surexpression de la protéine DDB2 semble donc conférer une meilleure capacité de réparation.

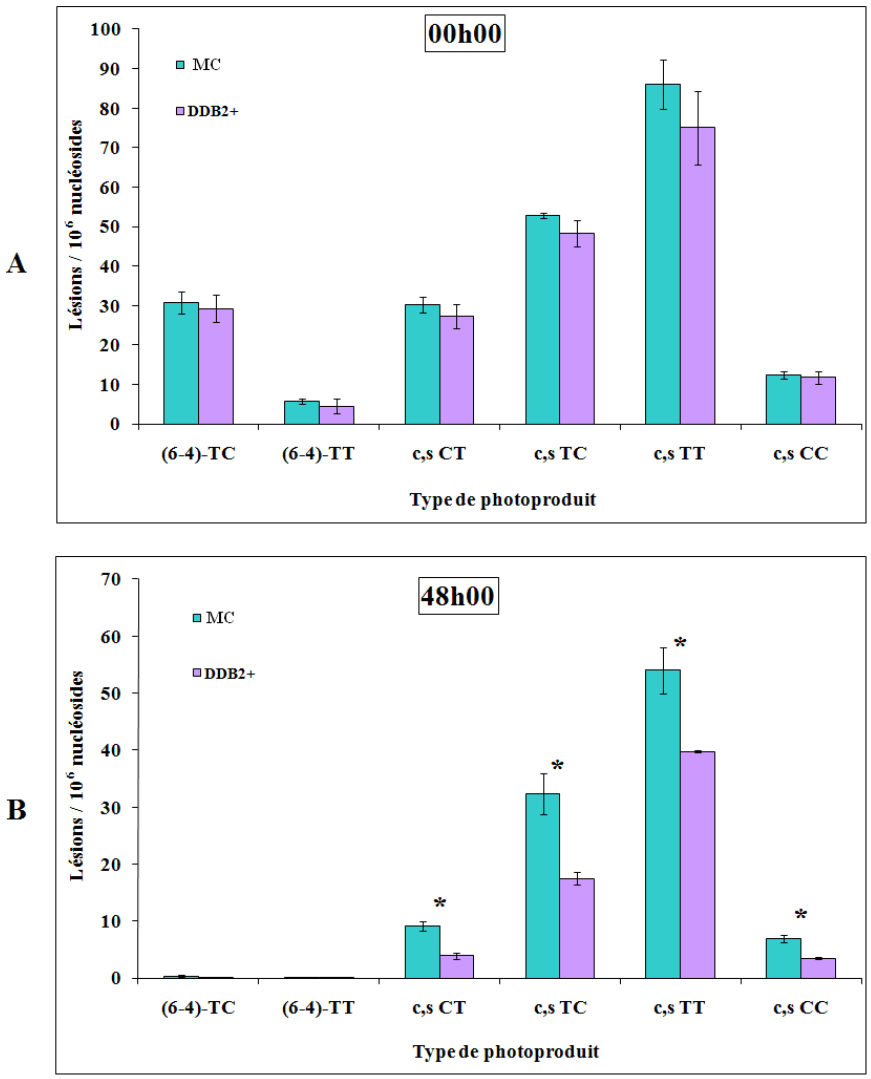


Figure 81 : Nombre de photoproduits générés par les UVB (A) et restant après un temps de réparation de 48h00 (B) sur les deux lignées MDA MB 231 (* : $p < 0,05$ d'après le test de Mann-Whitney).

Au bilan, nous constatons que la présence de DDB2, si elle ne paraît pas conférer de capacité de résistance au rayonnement UV, est surtout responsable de capacités accrues de réparation des photoproduits engendrés. Cette propriété est observable pour les lésions de type CPD, jusqu'à 48h00 après l'exposition. Nous nous sommes ensuite interrogés sur l'influence de DDB2 dans la réparation des adduits du cisplatine.

4. Réparation des adduits majoritaires du cisplatine

La réparation des adduits du cisplatine a été vérifiée sur les deux lignées de la même manière que pour les photoproduits. Les premières mesures visant à établir la faisabilité d'une telle cinétique de réparation ont montré qu'avec une exposition de 24h00 à 5µM (voir tests de cytotoxicité dans la section B), le nombre d'adduits détectés 24h00 après la fin de l'exposition était de 1,1 par million de nucléosides normaux, une valeur obtenue à partir de spectres SM/SM exploitables mais proches du bruit de fond enregistré lors de l'analyse. Pour comparaison, nous avons également observé qu'un traitement de même durée avec 1µM d'oxaliplatine ne produisait pas de quantité mesurable d'adduit 1,2-d(GpG)

Nous avons donc décidé d'adapter notre protocole en réalisant un stress aigu à 150µM de cisplatine durant 01h00 (dans un milieu sans sérum), après quoi le tapis cellulaire a été lavé et les cellules remises en culture durant les temps désirés. Les résultats de cette cinétique de formation/réparation des adduits du cisplatine sont visibles sur la Figure 82. Seuls les adduits 1,2-d(GpG), lésion majoritaire, ont été recherchés.

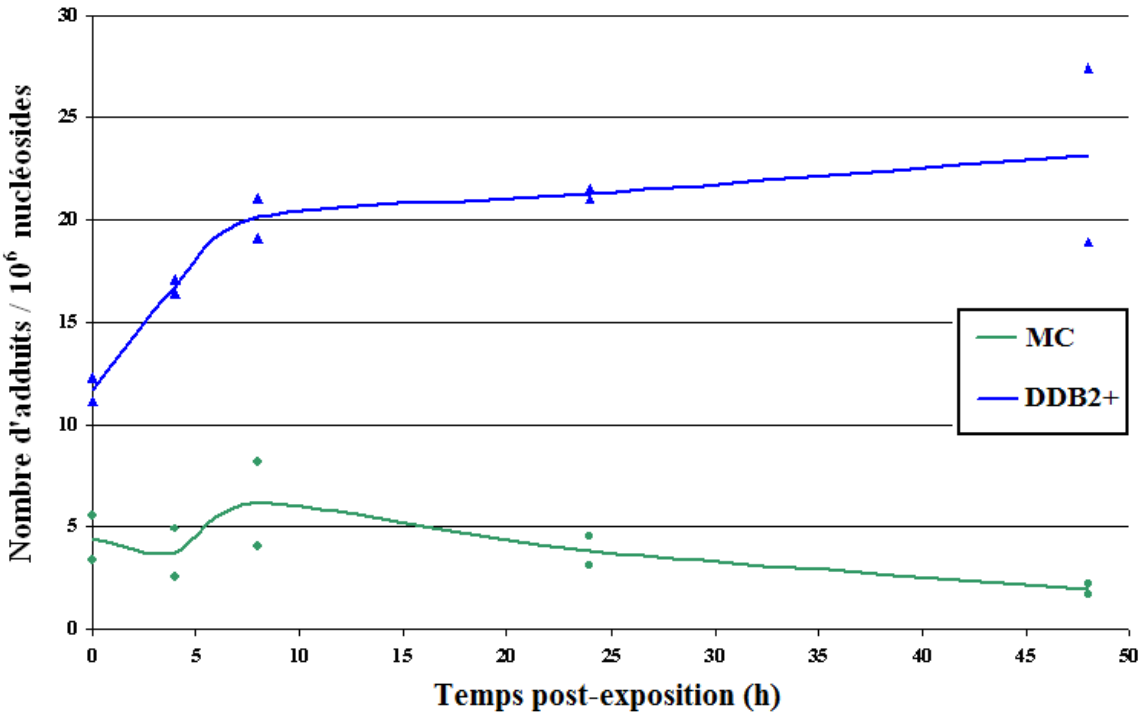


Figure 82 : Cinétique de formation/réparation des adduits majoritaires du cisplatine sur les lignées cellulaires MDA MB 231 MC et DDB2+.

Immédiatement après la fin de l'exposition de nos cellules au cisplatine, on constate que l'ADN génomique de la lignée DDB2+ contient 2,6 fois plus d'adduits majoritaires que la lignée contrôle MC (11,7 contre 4,4, respectivement). Au cours du temps, ce taux de lésions s'est maintenu durant les 24 premières heures chez la lignée MC, et a diminué d'un facteur 2,2 à 48h00. Sur l'ADN de la lignée DDB2+, au contraire, le nombre d'adduits augmente jusqu'à 08h00 pour se stabiliser ensuite autour de 20 pontages 1,2-d(GpG) par million de nucléosides normaux (23,2 à 48h00).

5. Suivi de l'expression de *DDB2* au cours du temps

L'expression des deux sous-unités du complexe UV-DDB a été mesurée à différents temps après irradiation UVB ou après traitement au cisplatine par qPCR. Les résultats pour la variation de l'expression de *DDB2* au sein de la lignée DDB2+ après exposition aux UV et au cisplatine sont visibles sur les Figures 83 et 84, respectivement. Dans le cas de l'exposition au rayonnement UV, l'expression de *DDB2* connaît une augmentation régulière jusqu'à 48h00, pour atteindre un niveau 7,5 fois supérieur au contrôle non irradié. L'expression de cette protéine est également induite par l'exposition au cisplatine, mais dans une bien moindre mesure. Le maximum d'expression intervient à 36h00 (facteur 1,88) et diminue légérement (facteur 1,62) à 48h00.

Les niveaux d'expression ont également été mesurés au sein de la lignée contrôle MC après exposition au rayonnement UV ou au cisplatine. Bien que le niveau d'expression soit dans tous les cas très faible, nous avons observé une légère diminution de celle-ci jusqu'à 24h00 (-50%) après l'exposition aux UV. En revanche, suite au traitement avec le cisplatine, une augmentation de l'expression de *DDB2* a été constatée (facteur 3,4 à 36h00).

Le niveau d'expression de *DDB2* est augmenté par l'application d'un stress génotoxique (surtout lié aux UV) sur les cellules de la lignée DDB2+. Cette induction (prolongée dans le temps) est associée à de meilleures capacités de réparation des photoproduits générés par le rayonnement UV. Les adduits du cisplatine sont plus facilement formés sur l'ADN des cellules DDB2+. L'expression de cette protéine ne semble pas provoquer de disparition de ces adduits au court du temps.

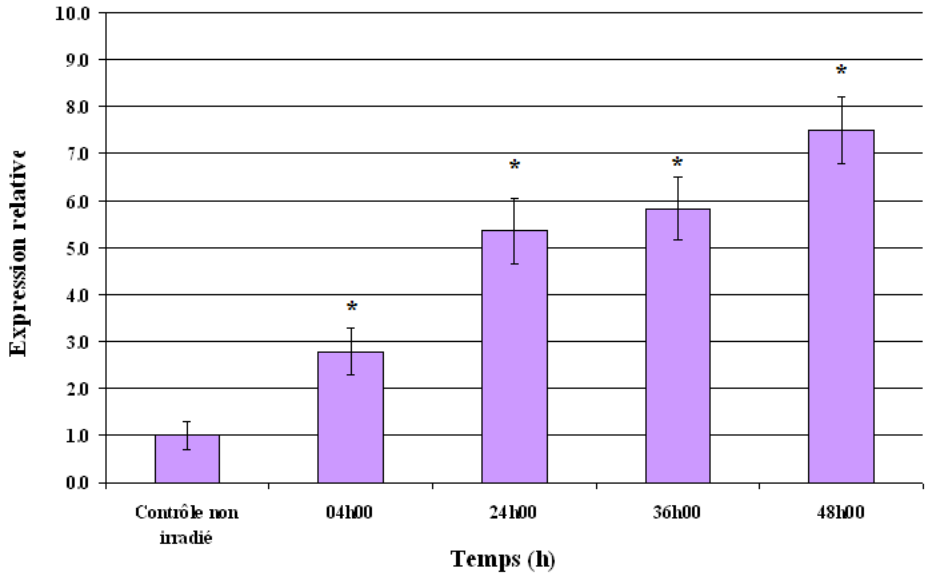


Figure 83 : Expression de *DDB2* dans la lignée DDB2+ à différents temps après exposition au rayonnement UVB (0,02J.cm^{-2}) mesurée par qPCR (* : $p < 0,05$ d'après le test de Mann-Whitney, comparaisons avec le contrôle non irradié).

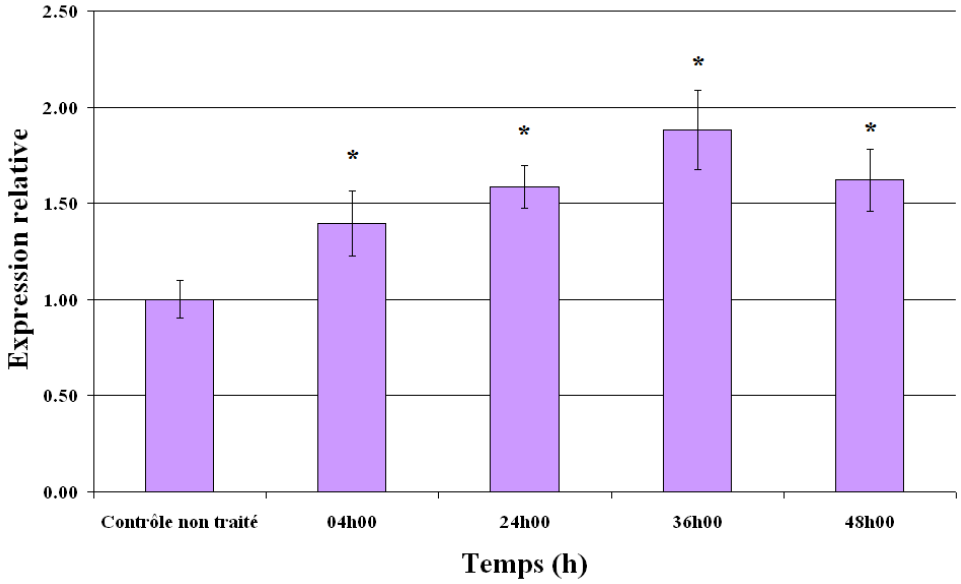


Figure 84 : Expression de *DDB2* dans la lignée DDB2+ à différents temps après exposition à 150µM cisplatine durant 01h00 mesurée par qPCR (* : $p < 0,05$ d'après le test de Mann-Whitney, comparaisons avec le contrôle non irradié).

III. Discussion

Les capacités de liaison du complexe hétérodimérique UV-DBB sur les adduits du cisplatine sont peu documentées, les seules études identifiées au début de la thèse datant de la fin des années 1980 et du début des années 1990 (Chu & Chang, 1988; Payne & Chu, 1994). Sans revenir en détail sur ces travaux déjà évoqués lors de la présentation de DDB2, nous rappelerons simplement que la protéine possèderait d'après ces études *in vitro* une affinité d'association pour l'adduit 1,2-d(GpG) du cisplatine similaire à celle démontrée pour les CPD (Fujiwara *et al*., 1999). En raison de ces observations, l'hypothèse d'une détection des adduits du cisplatine par DDB2 préalable au recrutement des autres facteurs de la voie NER apparaît plausible. Un lien entre la réparation des photoproduits UV et celle des adduits du cisplatine a été fait à partir de modèles cellulaires HeLa possédant une résistance croisée aux deux agents génotoxiques, une résistance qui passe par la surexpression de DDB2 (Chu & Chang, 1990; Chao *et al*., 1991; Sun *et al*., 2010).

À l'aide de nos deux modèles cellulaires MDA MB 231, des deux microsystèmes développés au cours de ces travaux de thèse ainsi que des méthodes de chimie analytique et de biologie moléculaire disponibles au laboratoire, nous avons souhaité apporter des données expérimentales supplémentaires permettant une meilleure compréhension du rôle de DDB2 dans la prise en charge des lésions de l'ADN issues des dérivés du platine.

Nos modèles cellulaires dérivent de tissus tumoraux des glandes mammaires, pour lesquels le cisplatine n'est pas le traitement de choix. Ils n'ont pas été choisis pour leur pertinence clinique. Il s'agit plutôt ici de profiter de l'avantage des différences d'expression de DDB2 pour réaliser une étude à portée mécanistique sur le rôle de cette protéine.

A) Tests de ligand fishing *effectués à partir des extraits MDA MB 231*

Après avoir tout d'abord confirmé par *Western blotting* et qPCR l'expression différentielle de DDB2 au sein de chacune de nos lignées (absence ou niveau extrêmement faible chez la lignée MC, présence chez la lignée DDB2+), nous avons cultivé ces cellules avec et sans cisplatine, extrait leurs protéines nucléaires puis réalisé une capture spécifique à l'aide de notre système de *ligand fishing*, en utilisant des sondes plasmidiques lésées par le cisplatine ou le rayonnement UVC.

Des membres potentiels de l'interactome des adduits du cisplatine et des photoproduits UV autres que DDB1 et DDB2 ont été identifiés. Toutefois, l'analyse protéomique n'ayant été réalisée qu'une seule fois, les candidats identifiés ne peuvent encore être considérés comme validés, et nous ne commenterons donc que ceux qui nous ont paru biologiquement pertinents.

1. Interactome des lésions du cisplatine

- Complexe PTW/PP

L'établissement de l'interactome des adduits du cisplatine à partir des extraits nucléaires de cellules MDA MB 231 avait pour but principal de confirmer les résultats déjà obtenus sur les extraits HeLa. La liste des protéines spécifiquement retenues par les adduits du cisplatine contenait effectivement, outre les candidats classiques (protéines à boîte HMG, complexe FACT) présents dans toutes les conditions, les membres du complexe PTW/PP. PNUTS et TOX4 ont été piégées sur les adduits à partir des extraits de cellules MC non traitées et DDB2+ traitées ou non au cisplatine. Leur absence des échantillons obtenus à partir des extraits de cellules MC exposées au cisplatine nous a conduits à vérifier par qPCR une éventuelle variation de leur expression suite au traitement platiné, ce qui n'a pas été observé. La capture de WDR82, en revanche, n'a été réalisée qu'à partir des extraits de cellules MC traitées au cisplatine. Il est délicat de trancher ici sur la signification de cette capture de WDR82 car, en effet, il ne s'agit ici que des résultats d'une expérience unique. Il est donc indispensable de répéter celle-ci avant d'en tirer des conclusions, d'autant plus que WDR82 n'a jamais été identifiée avec plus de sept peptides, toutes conditions expérimentales confondues. Au bilan, la présence de deux des trois membres du complexe nous a permis de confirmer nos observations à l'aide d'un second modèle cellulaire, renforçant ainsi la pertinence d'études futures sur les conséquences biologiques d'une telle interaction.

- TFAM

Un autre membre déjà connu de l'interactome des adduits du cisplatine, et qui n'avait pas été retenu à partir des extraits HeLa, a fait son apparition sur nos sondes plasmidiques cisplatine à partir des extraits MDA MB 231 : le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM). Ce candidat appartient à la famille des protéines à boîte HMG. Il contient deux de ces motifs, qui n'ont pas de spécificité de séquence (Fisher & Clayton, 1988) mais qui lui permettent de reconnaître les motifs de type boucle D sur l'ADN mitochondrial, dont il contrôle la transcription et la réplication (Larsson *et al*., 1998). Ses capacités à lier les dommages de l'ADN, incluant les adduits du cisplatine (Chow *et al*., 1994), du N-acétoxy-acétylaminofluorène (Pietrowska & Widlak, 2005; Pietrowska *et al*., 2006) et la la 8-oxo-dG (Yoshida *et al*., 2002) ont déjà été démontrées. Cette activité de liaison aux dommages de l'ADN est augmentée par son interaction avec la thiorédoxine 2, facteur mitochondrial au rôle antioxydant, et la surexpression de ces deux protéines a été associée à une résistance au cisplatine (Kidani *et al*., 2009).

En outre, il a également été observé que, lors de la relocalisation de p53 vers la mitochondrie (étapes initiatrices de l'apoptose), cette protéine est capable d'interagir directement avec les boîtes HMG de TFAM. De plus, la coincubation de TFAM et p53

permet d'augmenter les capacités de reconnaissance des adduits du cisplatine par TFAM, alors que cette même coincubation entraîne une diminution de l'affinité de TFAM pour la 8-oxo-dG (Yoshida *et al*., 2003). La surexpression de TFAM contribue à sensibiliser, bien que dans des proportions modestes, des lignées cellulaires à l'étoposide, au cisplatine et à la camptothécine (stabilisateur de la topoisomérase I, empêchant le processus de ligation après l'action de cette enzyme) (Pastukh *et al*., 2007). L'ensemble de ces observations suggère un rôle pour TFAM au cours des processus de réparation et d'induction de l'apoptose.

L'absence de TFAM lors de nos analyses réalisées à partir d'extraits nucléaires HeLa pourrait s'expliquer par deux hypothèses : TFAM est présente au sein des noyaux des cellules MDA MB 231 mais pas des cellules HeLa ; la méthode de préparation des extraits MDA MB 231 introduit des protéines mitochondriales dans lesdits extraits. TFAM est une protéine dont la localisation est majoritairement mitochondriale, mais il a été montré pour des cellules humaines que sa surexpression et/ou l'altération de sa séquence d'adressage mitochondriale induisent son accumulation dans le noyau (Pastukh *et al*., 2007). Une présence naturelle de TFAM au sein d'extraits nucléaires ne peut donc être exclue. Cependant, il faut remarquer que le protocole utilisé par le laboratoire qui nous a fourni les extraits HeLa ne comprend pas de détergent dans les tampons d'extraction, ce qui n'est pas le cas de celui que nous avons utilisé pour obtenir les protéines nucléaires des cellules MDA MB 231 (présence de Nonidet-P40). Le détergent est susceptible de déstabiliser la membrane des mitochondries au cours de la procédure, causant un relargage de certaines protéines incluses dans cette structure, dont TFAM. Cette éventualité a d'ailleurs été confirmée expérimentalement (Pietrowska *et al*., 2006).

- DDB2

En marge de l'observation de ces candidats pertinents, nous avons constaté que les deux membres du complexe UV-DBB étaient totalement absents de nos échantillons, indépendamment de la source de protéines et de l'exposition au cisplatine. Ainsi, même lorsque DDB2 est surexprimée, il n'est pas possible, dans nos conditions expérimentales, de la capturer sur un panel d'adduits du cisplatine. DDB2 n'a pas non plus été observée par l'équipe de Lippard grâce à leur sonde photoactivable, qui avait par contre piégé DDB1 (Guggenheim *et al*., 2009; Zhu & Lippard, 2009). Ceci est en contradiction avec les travaux plus anciens ayant détecté une interaction entre DDB2 et les adduits du cisplatine par des techniques d'EMSA (Chu & Chang, 1988; Payne & Chu, 1994).

Dans un second temps, une série d'expériences menée sur notre biopuce SPRi, dont on a vu qu'elle est capable de mettre en évidence les capacités de liaison de protéines à boîte HMG sur les adduits 1,2-d(GpG) du cisplatine, de l'oxaliplatine et du JM118, a produit des résultats qui vont dans le sens de ceux obtenus à partir du système de *ligand fishing*. L'aptitude de DDB2 à se fixer sur les adduits platinés n'a pu être confirmée, aucun signal

d'interaction significatif n'étant enregistré pour l'une ou l'autre de ces lésions, pas plus que pour l'ADN non lésé double- et simple-brin.

Nous devons revenir sur une limitation importante inhérente aux expériences de SPRi présentées ici et déjà évoquée au cours de la discussion de la cinquième partie. La protéine DDB2 recombinante utilisée était elle-aussi produite à l'aide d'un système de traduction reconstitué (*cell free*). Les résultats pertinents obtenus pour deux protéines à boîte HMG synthétisées avec un tel système nous ont incités à poursuivre nos expériences avec une version de DDB2 produite de la même façon. Néanmoins, nous ne pouvons affirmer que cette protéine recombinante était totalement fonctionnelle et aurait été effectivement capable de reconnaître les lésions présentes.

La présence d'une sonde oligonucléotidique portant un photoproduit (par exemple un (6-4)-PP, pour lesquels DDB2 présente une affinité importante), faisant office de contrôle positif, nous aurait permis de vérifier la fonctionnalité de notre DDB2. Cependant, la production de telles sondes oligonucléotidiques se heurte à deux contraintes. Tout d'abord, le rendement d'introduction de telles lésions sur un site unique, au sein d'un oligonucléotique court, est très faible, et les conditions expérimentales requises sont plus exigentes (Wang *et al*., 2000). Ceci en rend la synthèse laborieuse. Il est alors possible de se tourner vers l'utilisation de synthons commerciaux pour les introduire dans l'oligonucléotide au cours d'une synthèse à façon. Cependant, une telle approche présente un coût extrêmement lourd qu'il ne nous a pas été possible d'envisager.

Nos résultats de *ligand fishing* et de SPRi semblent pencher en faveur d'une faible affinité de DDB2 pour les adduits des dérivés du platine.

- TRF2

Signalons enfin que nous n'avons pas détecté TRF2, une protéine qui avait été observée sur les sondes lésées par les trois dérivés du platine après l'exposition aux extraits nucléaires HeLa. La validation de ce candidat à partir du modèle cellulaire MDA MB 231 n'a donc pas été possible. Ceci est peut-être dû à une faible expression nucléaire de TRF2 déjà constatée au cours de certains travaux au sein de cette lignée (Diehl *et al.*, 2010; Fordyce *et al.*, 2010). D'autres travaux seront nécessaires pour clarifier son interaction éventuelle avec les adduits du platine.

2. Interactome des lésions engendrées par le rayonnement UV

Contrairement à l'interactome des adduits platinés, celui des lésions UV s'est avéré, dans nos conditions, très restreint. DDB1 et DDB2 n'ont été observés ensemble que chez la lignée DDB2+, indépendamment de son exposition préalable au cisplatine. Pour la lignée MC, seule DDB1 a pu être observée, et ce uniquement au sein d'extraits issus de cellules non

traitées par le cisplatine. Ces observations sont en accord avec le fait que l'expression basale de DDB2 des cellules MC est extrêmement faible.

Grâce à la capture de DDB1 et DDB2 sur les sondes UV, nous avons pu valider notre méthode de *ligand fishing* avec une seconde famille de lésions déformantes de l'ADN. La sonde sert également ici de contrôle postitif à l'analyse de l'interaction entre DDB2 et les adduits du cisplatine. La capture réussie d'UV-DDB suggère que notre tampon, s'il n'est pas universel, est compatible avec l'interaction de ce complexe de réconnaissance des photoproduits (lésions pour lesquelles elle présente la plus forte affinité) comme il est compatible avec l'interaction d'HMGB1 avec les adduits du platine. Nous ne pouvons toutefois exclure que des conditions physico-chimiques différentes soient requises pour favoriser l'interaction de DDB2 avec les adduits du cisplatine.

Parmi les protéines retenues par les sondes UV, attardons-nous simplement sur le *barrier-to-integration factor* (BAF). Il s'agit d'un composant important de la lamina nucléaire, réseau filamenteux exerçant un rôle structural au sein du noyau, mais aussi impliqué dans l'ensemble des processus mettant en jeu l'organisation de la chromatine. Notamment, la voie de réponse aux dommages de l'ADN requiert l'existence d'une lamina intacte. BAF forme un homodimère, et possède des capacités de liaison séquence-indépendantes à l'ADN double-brin. Interagissant avec les nucléosomes durant l'interphase, la protéine est également localisée au niveau des télomères lors de l'anaphase. BAF co-précipite avec PARP-1, XPC, mais surtout avec le complexe CUL4-UV-DDB comme cela a été récemment établi (Montes de Oca *et al*., 2009), ce qui peut expliquer sa présence au sein de nos échantillons. Les auteurs de cette étude ont aussi montré que cette interaction est renforcée après exposition au rayonnement UV, suggérant pour BAF un rôle potentiel dans les étapes préliminaires de la réponse aux dommages.

Au bilan, cette série d'expériences de *ligand fishing* à partir d'extraits cellulaires MDA MB 231 nous a permis de valider sur un second modèle cellulaire certaines des observations réalisées à partir de la lignée HeLa. En outre, nous avons pu mettre au point une seconde sonde plasmidique fonctionnelle, et capturer à l'aide de celle-ci le complexe UV-DDB. Cet hétérodimère n'a cependant pas pu être identifié sur les sondes portant les adduits du platine, que ce soit par *ligand fishing* ou par SPRi. DDB2 montre donc une affinité pour les lésions générées par le cisplatine (et probablement par les deux autres dérivés) bien plus faible que celle qu'elle possède pour les photoproduits. Ces résultats préliminaires n'indiquent pas de différence flagrante dans les interactomes des cellules exposées et non exposées au cisplatine.

Après cette étude *in vitro* des capacités de reconnaissance de DDB2 pour deux types de lésions de l'ADN, nous avons étudié les capacités de réparation de ces mêmes lésions par nos deux modèles cellulaires.

B) Cinétique de réparation des lésions

Avant de discuter plus avant nos résultats, il est nécessaire de rappeler quelques-unes des caractéristiques de nos lignées. La construction réalisée pour transfecter la lignée DDB2+ contient la phase ouverte de lecture (*open reading frame*, ORF) complète du gène de DDB2, mais pas ses éléments de régulation. De plus, la lignée MDA MB 231 possède une mutation ponctuelle au sein du codon 280 du gène de *TP53*. Cette mutation faux-sens (substitution d'une guanine par une adénine, responsable de l'introduction d'une lysine en lieu et place d'une arginine) induit l'expression d'une forme non fonctionnelle de p53 (Park *et al*., 1994). Or, le rôle crucial de p53 dans la transactivation de certains gènes indispensable à la sous-voie GGR a été établi, dont XPC et DDB2 (Adimoolam & Ford, 2003). Plus particulièrement, il a été observé à l'aide de fibroblastes humains mutants p53-/- que l'absence de cette protéine supprimait l'expression de DDB2, que ce soit au niveau basal ou après exposition des cellules au rayonnement UV, et que la sous-voie GGR chez ces cellules en était fortement atténuée (Hwang *et al*., 1999). Il existe en effet, au sein de la région promotrice du gène de DDB2, au moins un élément de réponse qui met l'expression de cette protéine directement sous le contrôle de p53 (Tan & Chu, 2002). p53 est assistée dans ce mécanisme par la protéine issue de l'expression du gène suppresseur de tumeur *Brca1* (Hartman & Ford, 2002). En accord avec ces informations, et malgré la présence du gène intact chez la lignée MC, celle-ci n'est pas capable d'exprimer DDB2 à un niveau significatif.

1. Réparation des photoproduits

Nous avons suivi simultanément la réparation de six photoproduits, ce qui n'avait encore jamais été réalisé dans une étude sur le rôle de DDB2. Comme nous l'avons montré, la formation de ces photoproduits après exposition des cellules au rayonnement UV n'est pas influencée par l'expression de DDB2. La lésion majoritaire est le CPD c,s TT (> 40% du total des lésions mesurées), suivie par le c,s TC. Les (6-4)-TC et c,s CT sont générés dans des proportions très comparables. La répartition des lésions est semblable à celles observées par notre laboratoire sur des fibroblastes humains après une irradiation identique (Mouret *et al.*, 2008), ainsi qu'on peut le constater sur le Tableau 26.

Notre cinétique de réparation pour la lignée MC peut également être mise en parallèle avec les résultats de Mouret *et al*., visibles sur la Figure 85. 24h00 après irradiation, l'efficacité de réparation des lésions par les fibroblastes est assez similaire à celles des cellules MDA MB 231 MC. Cependant, la réparation des photoproduits par ces dernières paraît être interrompue après ce temps, alors qu'elle se poursuit normalement chez les fibroblastes. C'est la restauration de l'expression de DDB2 qui permet de retrouver (pour notre lignée DDB2+) une efficacité de réparation à 48h00 comparable à celle observée pour les fibroblastes. Les c,s CT sont mieux réparés que les c,s CC et c,s TC. c,s TT est la lésion la

moins bien réparée. Dans tous les cas, nous n'avons pas constaté de différence visible dans la réparation très rapide des (6-4)-PP par les deux lignées.

Type de photoproduit	Nombe de lésions pour 10^6 nucléosides normaux	
	Mouret *et al.*, 2008 (fibroblastes)	Nos résultats (MDA MB 231)
(6-4)-TT	6,7	4,5 – 5,7
(6-4)-TC	38,9	29,2 – 30,8
CPD TT	104,2	75,1 – 86
CPD TC	85,6	48,3 – 52,9
CPD CT	30,7	27,4 – 30,3
CPD CC	10,8	11,7 – 12,4

Tableau 26 : Nombre de lésions observées sur l'ADN génomique après irradiation UVB de fibroblastes (dose = 0,2J.cm^{-2}).

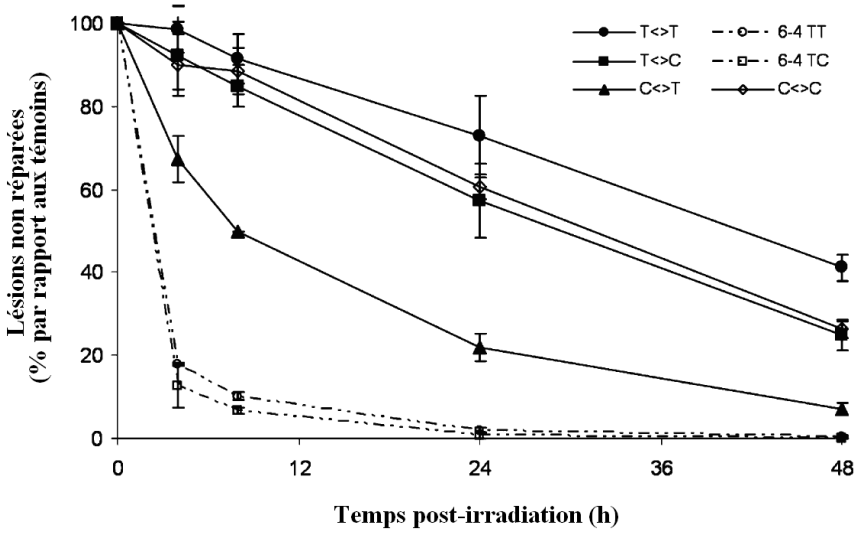


Figure 85 : Cinétique de réparation des photoproduits après irradiation UVB de fibroblastes UVB de fibroblastes (dose = 0,2J.cm^{-2}) (adapté de Mouret *et al*., 2008).

Nos résultats rejoignent ce qui a été observé lors de précédentes études. La réparation efficace des CPD pourrait surprendre dans un modèle comportant une mutation de p53. En effet, p53 est un régulateur de la voie NER en jouant sur l'expression de XPC et DDB2 (Ford, 2005). Malgré tout, il a déjà été démontré que la surexpression de DDB2 au sein de fibroblastes déficients en p53 permet d'augmenter significativement la réparation des CPD. L'étude concernée montre également que l'induction conjointe de p53 et DDB2 permet d'obtenir un effet synergique sur la réparation de ces lésions, mais qui joue principalement sur sa vitesse plutôt que sur son efficacité globale à un temps éloigné : ainsi, le taux de réparation atteint un plateau dès 06h00 lorsque les deux protéines sont présentes, alors qu'il augmente très graduellement jusqu'à 24h00 lorsque seule DDB2 est surexprimée (Fitch *et al.*, 2003a). L'élimination des (6-4)-PP est toujours très rapide, et moins affectée par l'absence de p53 que

celles des CPD (Tang & Chu, 2002). Cette dernière remarque s'explique par le fait que DDB2 est requise pour la réparation des CPD, mais pas des (6-4)-PP, qui peuvent être directement pris en charge par XPC-HR23B.

Il est important de noter que ce rôle d'acteur de la réparation des lésions déformantes de l'ADN tel que nous venons de le décrire est nuancé par quelques observations contradictoires. Ainsi, des lignées de fibroblastes XPE ne recouvrent pas la capacité de traiter les (6-4)-PP après supplémentation en UV-DDB, addition qui va même jusqu'à inhiber la réparation par un complexe NER reconstitué (Kazantsev *et al*., 1996). D'autres études ont noté que la microinjection d'une faible quantité complexe UV-DDB permet de restaurer intégralement les capacités de réparation de dommages UV chez des cellules XPE, mais l'administration d'une plus grande quantité du complexe ne stimulait pas davantage cette activité. L'abondance d'UV-DDB (10^5 copies par cellule), a amené les auteurs à s'interroger sur l'existence d'autres rôles pour ce complexe et/ou ses composantes (Keeney *et al*., 1994).

2. Réparation des pontages générés par le cisplatine

Au cours de notre série d'expériences portant sur la réparation des adduits du cisplatine par les deux lignées MDA MB 231, nous avons été confrontés à des résultats différents de ce qui est observé avec les photoproduits. Deux constatations peuvent être faites à propos de ces résultats. La première concerne la différence de quantité initiale de lésions (11,7 adduits 1,2-d(GpG) par million de nucléosides normaux pour la lignée DDB2+, contre 4,4 pour la lignée MC). Nous n'expliquons pas les raisons pour lesquelles un plus grand nombre d'adduits a ainsi pu se former sur l'ADN des cellules DDB2+.

La seconde constatation porte sur une continuité de formation des lésions jusqu'à 08h00 pour la lignée DDB2+, puis l'observation d'un plateau jusqu'à 48h00 (23 adduits 1,2-d(GpG) par million de nucléosides normaux), alors que la lignée contrôle MC a réparé environ 50% de ses lésions à la même échéance (deux adduits 1,2-d(GpG) par million de nucléosides normaux).

Notre cinétique de réparation pâtit peut-être de la trop grande concentration en cisplatine utilisée. L'augmentation du taux d'adduits dans les huit premières heures par la lignée DDB2+ peut s'expliquer par une persistence de la platination de l'ADN après le retrait du cisplatine dans le milieu (présence résiduelle de molécules dans la cellule). Pour la lignée MC, le taux initial étant nettement plus bas, on peut supposer que la formation des lésions est en partie compensée par leur réparation durant les 24 premières heures, ce qui peut expliquer que le taux n'augmente pas dans les mêmes proportions que pour la lignée DDB2+.

Dans cette lignée, la stabilité du nombre de lésions entre 08h00 et 48h00 semble indiquer que DDB2 ne participe pas à la réparation des pontages 1,2-d(GpG) engendrés par le cisplatine.

À notre connaissance, il existe très peu de travaux publiés au cours desquels l'influence de DDB2 sur la réparation des adduits du platine a été étudiée. Parmi ceux-ci, citons une étude ayant montré que des extraits cellulaires de lignées XPE et HeLa sont capables de prendre en charge l'adduit 1,3-d(GpTpG) du cisplatine, et l'ajout de DDB2 dans les extraits ne modifie pas de façon notable les capacités d'excision de la lésion (Rapic Otrin *et al*., 1998). Plus récemment, une publication (Barakat *et al*., 2009) présente la cinétique d'élimination de ces lésions au sein de lignées de fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni. Ces cellules sont déficientes en p53 fonctionnelle, ce qui les prive de l'expression de DDB2, qui est restaurée par transfection. Barakat *et al*. ont réalisé une expérience de platination sur de tels modèles exprimant ou non DDB2, puis ils ont regardé la réparation à différents points jusqu'à 24h00. Les deux lignées présentent des profils de réparation, observés par *immuno-slot-blot* quasi-identiques en termes de vitesse et pourcentage de dommages réparés (50% à 08h00, près de 80% à 24h00), ce qui va à l'encontre d'un rôle important pour DDB2 dans la réparation des adduits du cisplatine et rejoint donc nos résultats, même très préliminaires. Ces conclusions ont été confirmées par Barakat *et al*. par la technique de *host cell reactivation* à partir d'un plasmide lésé par le cisplatine (Figure 86).

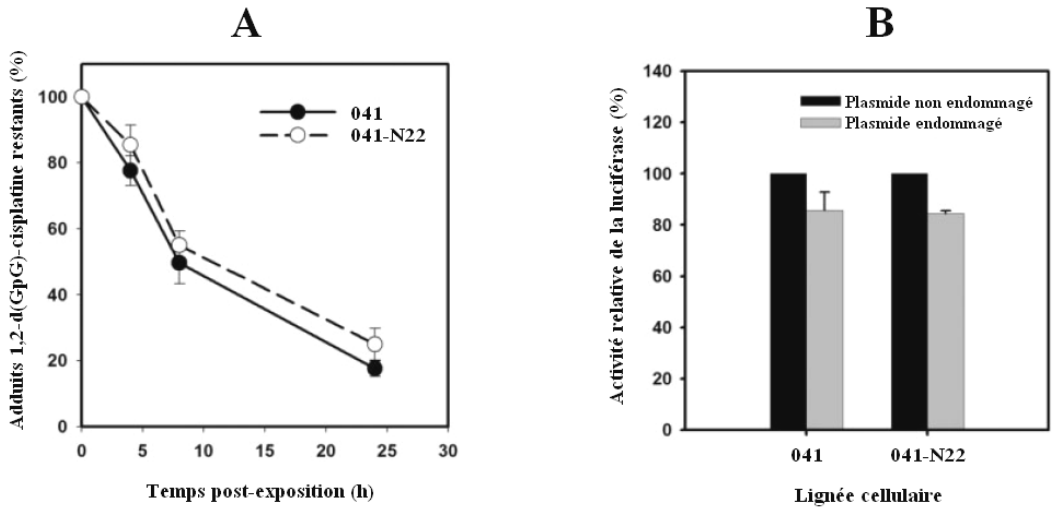


Figure 86 : Réparation équivalente des adduits du platine par deux lignées cellulaires exprimant (041-N22) ou n'exprimant pas (041) DDB2, mesurée par *immuno-slot-blot* (A) et *host-cell reactivation* (B) (adapté de Barakat *et al*., 2009).

Deux observations sont nécessaires pour mieux appréhender nos données par rapport à celles de l'équipe de Barakat. Tout d'abord, ils présentent les résultats de leur cinétique de réparation en % d'adduits restants par rapport à la quantité initiale, ce qui ne permet pas de comparer les taux initiaux au sein de leurs deux lignées. En outre, nos cellules ont dû être exposées (durant un temps égal) à une concentration bien supérieure en cisplatine (150µM) que l'équipe de Barakat (20µM). Nos conditions avaient pour but de produire un maximum de lésions afin d'en faciliter la détection par CLHP-SM/SM. Des tests préliminaires nous ont en

effet montré que l'exposition à plus faible concentration mais plus longue (5µM durant 24h00) ne permettait pas d'obtenir un taux mesurable. Notons également que les méthodes de mesure des adduits sont différentes : CLHP-SM/SM dans notre cas, immunodétection dans celui de cette équipe.

Nos résultats préliminaires, complétés par ceux de la littérature récente, semblent donc indiquer que DDB2 n'a pas d'influence significative sur les cinétiques de réparation des pontages 1,2-d(GpG) du cisplatine.

C) Cinétique d'expression de DDB2 suite aux traitements génotoxiques

Il faut rappeler que nos modèles cellulaires ne se prêtent normalement pas à l'étude de l'induction de DDB2. En effet, son gène, inclus dans le plasmide utilisé pour transfecter dans notre lignée MDA MB 231 DDB2+, est sous le contrôle du promoteur du CMV, qui permet théoriquement une expression constitutive mais non inductible. Cet état de fait, ainsi que de l'absence des séquences régulatrices de DDB2 et d'une p53 fonctionnelle, rend l'expression de la protéine DDB2 théoriquement invariable. Pourtant, que ce soit après une exposition au rayonnement UVB ou, dans une moindre mesure, au cisplatine, nous avons observé une induction du gène *DDB2* transfecté. Cette induction s'est révélée supérieure après traitement UV (facteur > 7 contre facteur ≈ 2 pour le cisplatine).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce phénomène. Ainsi, une étude montre que le traitement de cellules avec divers agents chimiothérapeutiques (n'incluant pas le cisplatine) résulte en une augmentation de la fluorescence produite par la luciférase dont le gène est sous le contrôle du promoteur du CMV. Le promoteur du cytomégalovirus s'avère capable de répondre à divers *stimuli*, notamment l'activation de la voie de la kinase p38 MAP, impliquée dans l'apoptose, ce qui pourrait se produire dans notre cas (Svensson *et al*., 2007).

Les observations précédentes sont complétées par d'autres, plus récentes, liant stress génotoxique et déméthylation du promoteur du CMV pour expliquer l'induction de l'expression de la GFP. Un mois après transfection, la lignée cellulaire utilisée présente une diminution faible mais significative de l'expression du rapporteur (quantifiée par mesure de fluorescence) sous le contrôle du promoteur du CMV. Cette baisse est en partie attribuée à la méthylation de ce dernier, puisque l'utilisation d'un agent déméthylant augmente de façon significative l'expression de la protéine rapportrice. L'utilisation de traitements génotoxiques (rayonnement ionisant ou cisplatine) sur ces lignées est responsable d'une augmentation de l'expression de la GFP (Kamensek *et al*., 2010).

Ainsi, la surexpression de DDB2 que nous avons observée au cours de nos expériences pourrait être, en partie, le résultat d'une « réactivation » du promoteur du CMV par le traitement génotoxique.

Il est possible que cette augmentation progressive de l'expression de DDB2 jusqu'à 48h00 explique l'observation d'une réparation prolongée des photoproduits dans la lignée DDB2+ (jusqu'à 48h00 également).

D) Réponse de nos modèles cellulaires aux tests de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité pratiqués afin de déterminer les doses adéquates de rayonnement UV et de cisplatine à appliquer sur les cellules nous ont renseignés sur la sensibilité de nos deux modèles. En effet, les deux lignées ont présenté des courbes de survie très similaires après traitement avec des doses croissantes de rayonnement UVB. Ainsi, même si la lignée DDB2+ répare mieux les lésions que la lignée MC, cela ne semble pas lui conférer de meilleures capacités de survie à 24h00. Dans le cas des dérivés du platine, la lignée DDB2+ s'est avérée systématiquement plus sensible que la lignée MC (DL_{50} inférieures à 24h00 et 48h00 pour chacun des trois agents testés).

Dans le cas du rayonnement UV, nos résultats se rapprochent des observations de Fitch *et al*. À l'aide des fibroblastes issus de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni présentant comme notre modèle une mutation de p53, ces auteurs n'ont pas montré de variation de sensibilité aux UV (clonogénicité) après transfection du gène de DDB2 (Fitch *et al.*, 2003a). En se basant sur sur des fibroblastes normaux et XPE dans lesquels l'expression de p53 a été inhibée par ARN interférence, une autre équipe a conclu que l'expression de DDB2 n'avait pas d'effet sur l'apoptose UV-induite (Stubbert *et al*., 2009).

Tournons-nous à présent vers le cas du cisplatine. Comme nous l'avons également constaté, l'équipe de Barakat n'a pas démontré de variation dans la réparation des adduits du cisplatine suite à une surexpression de DDB2 dans des cellules cancéreuses ovariennes (Barakat *et al*., 2009). En revanche, cette surexpression s'est traduite par une sensibilisation au cisplatine, ce qui corrobore nos résultats. Les auteurs expliquent ce phénomène par le rôle de DDB2 sur l'apoptose, en ayant montré une activation de la voie des caspases et une baisse de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Le rôle de DDB2 en tant que régulateur positif de l'apoptose suite à un traitement par le cisplatine a été mis en évidence par d'autres travaux tels que ceux utilisant des fibroblastes d'embryon de souris DDB2-négatif (Stoyanova *et al*., 2009).

Cependant, le rôle sensibilisateur de DDB2 est encore discuté, puisque l'on peut trouver des modèles résitant à la fois aux UV et au cisplatine qui surexpriment DDB2 (Sun *et al.*, 2010).

En conclusion, le statut DDB2 ne semble pas affecter la sensibilité des cellules au rayonnement UV, mais joue un rôle positif sur la cinétique de réparation des lésions CPD. En revanche, pour le cisplatine, non seulement DDB2 ne semble pas faciliter la réparation de l'ADN endommagé comme l'on pouvait s'y attendre, mais elle semble de plus capable de

potentialiser l’action de cet agent génotoxique. D’après la littérature, ceci s’expliquerait par le rôle direct de DDB2 en tant qu’inducteur des voies apoptotiques.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour objectif premier d'apporter à notre laboratoire les outils permettant d'analyser les interactions entre lésions de l'ADN et protéines, thématique nouvelle au sein de l'équipe. Afin d'atteindre ce but, le choix a été fait de se pencher sur les lésions engendrées par les dérivés du platine. Un certain nombre de protéines étaient en effet déjà identifiées comme membres de l'interactome de ces lésions, ce qui fournissait une bonne base pour valider nos méthodes.

Nous avons mis au point un piège à protéines constitué de sondes plasmidiques lésées et fixées sur un support solide. Celui-ci, couplé à la protéomique, a non seulement permis de capturer au sein d'extraits nucléaires HeLa des membres déjà connus de l'interactome des lésions du platine (hUBF, HMGB1, Spt16, etc.), mais aussi de mettre en évidence 29 candidats originaux, notamment les membres du complexe PTW/PP : TOX4, PNUTS et WDR82. Ce complexe PTW/PP n'a été que très récemment identifié, et sa fonction est encore mal connue, bien qu'un rôle au cours de la transition mitose/interphase soit suggéré.

À l'image des techniques similaires ayant déjà fait l'objet de publications, notre méthode ne s'avère pas exhaustive. C'est probablement l'exploitation de méthodes différentes mais complémentaires qui permettront progressivement d'établir une liste aussi complète que possible de cet interactome des lésions du platine.

Plusieurs aspects pourront être améliorés pour optimiser encore l'approche. Ainsi, remarquons tout d'abord que notre protocole s'inspire d'une méthode mise au point pour l'étude de la reconstitution du nucléosome sur de l'ADN endommagé par le rayonnement UVC (Gérard *et al.*, 2006). Il serait donc très intéressant d'utiliser ces conditions favorables pour étudier l'interactome des lésions du platine au sein du contexte chromatinien. On sait que la chromatine influence l'accessibilité de l'ADN, et donc le spectre de protéines susceptibles d'interagir avec les lésions éventuellement présentes.

Nos résultats montrent que, malgré l'introduction d'un bruit de fond important, le protocole choisi est efficace. Toutefois, il est difficile d'évaluer l'influence de la présence de ce bruit de fond lors de l'analyse protéomique. L'utilisation d'un système plus élaboré, faisant par exemple appel au bras photoclivable évoqué lors de l'analyse bibliographique (Hegarat *et al.*, 2007) pourrait permettre d'augmenter la sensibilité globale de l'approche, et donc son potentiel de découverte de nouveaux candidats.

D'autres informations pourront encore être obtenues à propos des dérivés du platine à l'aide de notre méthode de *ligand fishing*, en faisant varier certaines conditions. Ainsi, une étude de l'interactome des adduits du platine à partir d'autres compartiments cellulaires ou organelles (en particulier la mitochondrie) serait intéressante afin de mieux appréhender la médiation de la toxicité par ces agents anticancéreux. La réalisation de cinétiques d'interaction, permettant d'établir la composition de l'interactome à différents temps

d'exposition, est également envisageable. Les séquences d'interactions potentielles (une protéine en remplaçant une autre), les étapes d'assemblage des complexes, sont des exemples informations qui nous échappent encore. La principale limitation à l'étude de conditions multiples reste actuellement le coût élevé des analyses protéomiques.

Si le protocole de *ligand fishing* est une méthode « globale » efficace, il était nécessaire de disposer d'une seconde technique pour valider les interactions identifiées. La biopuce SPRi que nous avons mise au point s'est avéré être un outil intéressant pour la confirmation de ces capacités d'interaction. Grâce à l'utilisation « du code Zip », nous avons pu l'adapter aisément à l'étude parallélisée de trois adduits platinés, et avons suivi en temps réel les interactions de deux protéines, HMGB1 et TOX4, avec ces lésions. Nous avons ainsi pu confirmer l'affinité de ce dernier candidat, identifié par le piège plasmidique, pour les adduits du platine.

Le protocole développé pourrait être encore amélioré, notamment pour mieux caractériser les interactions observées en étant capable d'obtenir des paramètres cinétiques.

Nous n'avons travaillé que sur les dérivés du platine, mais nous avons aussi évoqué d'autres études publiées portant sur divers dommages. Les limites à l'étude d'autres lésions sont posées par la faisabilité de l'introduction des lésions dans des oligonucléotides cibles. Nous avons vu que même avec des lésions *a priori* faciles à générer, telles que les photoproduits UV, que cela n'était pas toujours aisément réalisable, et requiert en tout cas un effort de synthèse supplémentaire.

La nécessité de disposer de protéines fonctionnelles est également apparue comme cruciale au travers de nos expériences de SPR. De la même façon que pour la protéomique, le matériel disponible au laboratoire ne nous permet pas travailler sur l'expression de protéines peu connues, et des collaborations seront ainsi indispensables. En outre, afin de contourner ce problème, il pourrait être envisageable d'utiliser des extraits cellulaires directement sur la biopuce, introduisant ainsi des protéines fonctionnelles. Cependant, en raison de la très large gamme dynamique des extraits, des étapes de décomplexification préalables seraient indispensables. Ensuite, la confirmation d'interactions choisies serait réalisée à l'aide d'un anticorps spécifique du candidat.

Un couplage entre SPRi et protéomique serait également envisageable (Buijs & Franklin, 2005). En effet, la SPR est une technique non destructive pour les protéines, et les progrès de la spectrométrie de masse, permettant de détecter des quantités de protéines de plus en plus faibles, autorisent l'isolement de candidats sur la biopuce SPR, puis leur identification par *peptide mass fingerprinting*. En réalité, ce type d'approche n'est pas innovant, mais il ne paraît pas avoir encore trouvé sa voie dans l'étude des interactions ADN/protéine.

Grâce à nos deux microsystèmes, mais aussi à l'aide d'autres méthodes développées ou disponibles dans notre laboratoire, nous avons pu confirmer initier une étude sur le rôle de la protéine DDB2 dans la prise en charge des lésions engendrées par les dérivés du platine. Il

ressort de nos expériences d'interaction (*ligand fishing* et SPRi) que l'affinité de DDB2 pour les adduits platinés est très inférieure à celle qu'elle possède pour les photoproduits. De plus, nous avons confirmé que DDB2 confère aux cellules de meilleures capacités de réparation des CPD, alors que son expression élevée paraît ne pas affecter la réparation des adduits du cisplatine. Le rôle de cette protéine dans le traitement par le cisplatine n'est cependant pas inexistant, puisqu'elle contribue à sensibiliser les cellules à cet agent, un phénomène confirmé par de récents travaux.

Le modèle cellulaire MDA MB 231 utilisé lors de cette étude nous a également permis de valider un résultat important obtenu par *ligand fishing* avec les cellules HeLa concernant l'interaction du complexe PTW/PP avec les adduits du cisplatine.

À partir des informations obtenues au cours de ce travail de thèse, des perspectives plus larges peuvent être considérées, que ce soit au niveau méthodologique mais également biologique.

L'identification à haut débit de membres de l'interactome des lésions de l'ADN procure un grand nombre d'informations qui apporteront potentiellement une meilleure compréhension des réseaux complexes et interdépendants intervenant dans la réponse cellulaire aux dommages. Cette somme de données requiert toutefois une validation de l'intérêt biologique des candidats identifiés. Dans le cas du complexe PTW/PP, en raison du peu de connaissances générales disponibles et de la mise en évidence de ses capacités de reconnaissance des adduits du platine, il sera nécessaire d'engager des travaux pour étudier les implications d'une telle interaction, notamment sur la réparation des lésions et la progression du cycle cellulaire. L'affinité éventuelle des autres membres du complexe PTW/PP pour les adduits du platine devra être vérifiée, même si nous avons montré que TOX4 constitue le senseur potentiel des dommages. L'interaction du complexe avec les adduits du platine peut avoir pour effet sa séquestration, auquel cas sa participation à d'autres processus cellulaires sera compromise. De plus, la place de ce complexe au sein d'une voie de signalisation en réponse aux dommages de l'ADN est également envisageable.

Nos résultats et les données récemment apportées par d'autres équipes ont permis de clarifier le rôle de DDB2 dans la prise en charge des adduits du platine. La potentialisation de la formation d'adduits par le cisplatine observée en présence de DDB2 sera à expliquer. Des projets de recherche vont été initiés pour comprendre l'influence de cette protéine suite au traitement de cellules tumorales mammaires par des agents cliniquement plus pertinents que le cisplatine, comme par exemple les anthracyclines et la radiothérapie (équipe PREDICTHER, Université Henri Poincaré – Nancy I).

Malgré les améliorations encore possibles, le piège à protéines et la biopuce SPRi ont été validés sur plusieurs types de lésions. Notre équipe dispose maintenant d'outils qu'elle

pourra adapter à l'exploration de l'interactome de dommages ayant reçu jusqu'à présent moins d'attention de la part des chercheurs, mais aussi à des investigations portant sur des protéomes orginaux. Par exemple, la lésion complexe dCyd341 générée par le rayonnement ionisant et les substances radiomimétiques, découverte par notre laboratoire (Regulus *et al.*, 2007), devrait bientôt faire l'objet d'une telle étude. L'investigation des protéines interagissant avec certaines modifications épigénétiques, mais aussi du protéome d'espèces présentant des capacités de résistance aux dommages de l'ADN hors du commun (*Thermococcus gammatolerans*) sont également en projet.

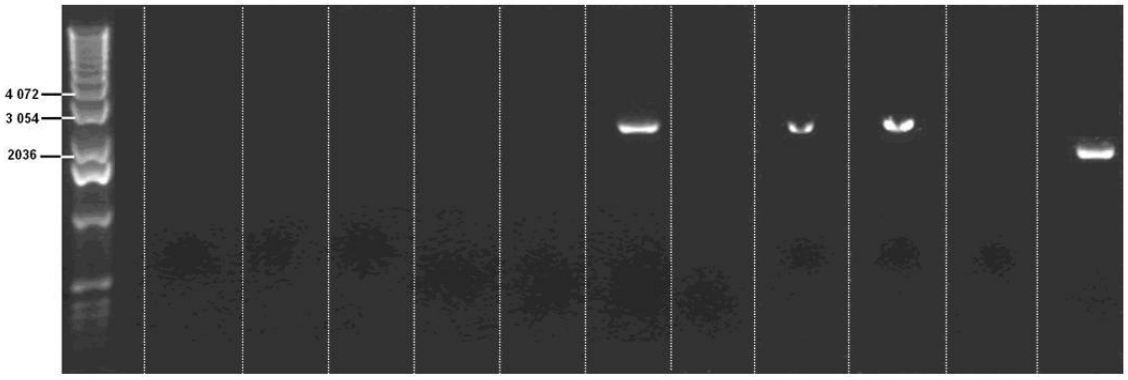
Le transfert de notre technique vers d'autres lésions ou d'autres systèmes biologiques nécessitera certainement l'adaptation de paramètres expérimentaux, notamment en ce qui concerne l'introduction des lésions dans les plasmides, qui n'est pas toujours possible par simple traitement physique ou chimique. L'introduction de bases modifiées sur des sites choisis d'oligonucléotides, puis l'utilisation directe de ces séquences ou leur incorporation dans des sondes plasmidiques, constituent des voies expérimentales tout à fait réalisables.

Plus généralement, nous espérons que l'établissement d'une cartographie aussi précise que possible des protéines qui interagissent avec les lésions de l'ADN contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux de cancérogénèse, ainsi que du mode d'action des anticancéreux. Notamment, les nouvelles connaissances pourraient mener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou des marqueurs prédictifs de réponse aux traitements, permettant d'adapter ces derniers au profil des patients.

ANNEXES

Annexe 1 : Figures supplémentaires

- *Contrôle de la fixation de l'ADN lésé sur les billes magnétiques*

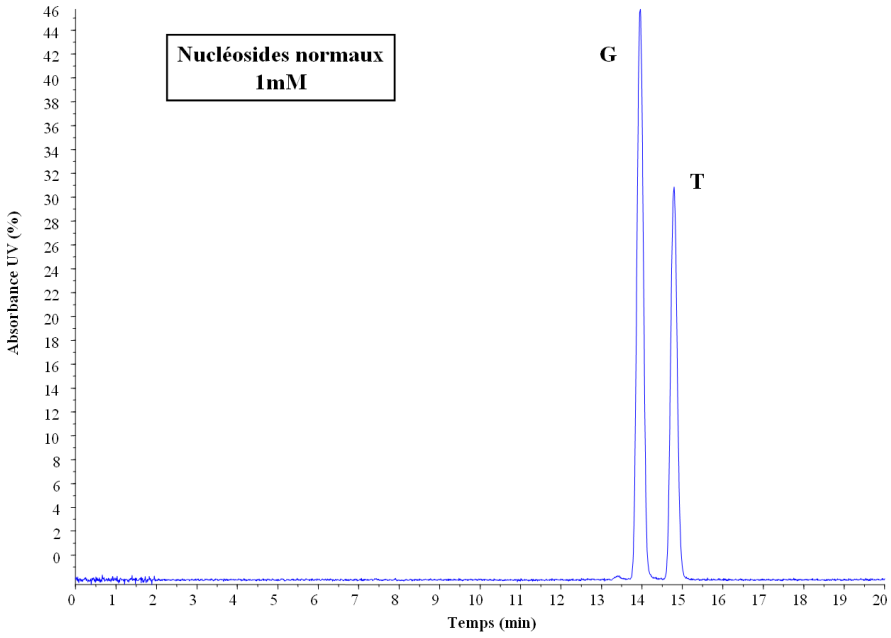


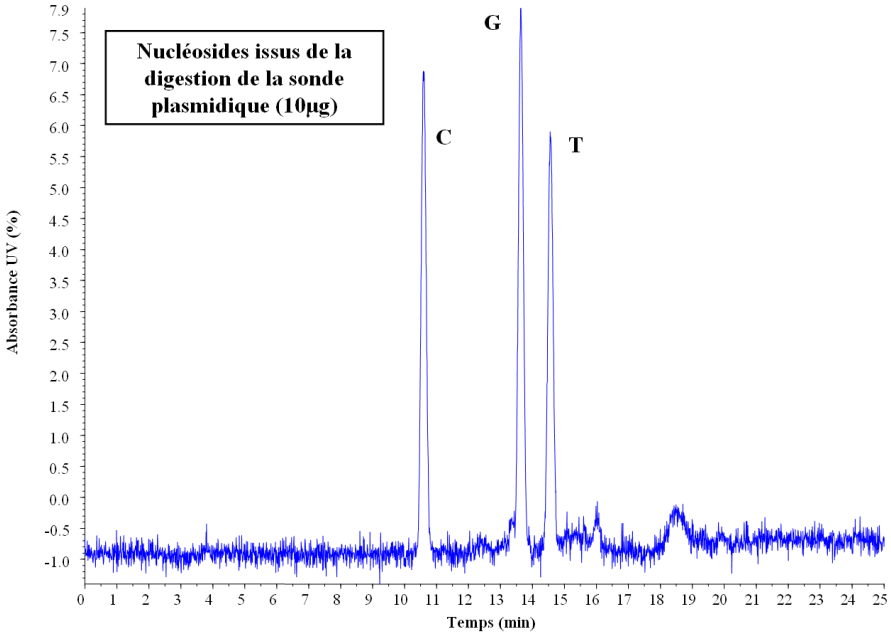
L'ADN biotinylé lésé est fixé efficacement sur les billes magnétiques. Les solutions dans lesquelles ont été incubées les billes magnétiques ont été déposées sur gel d'agarose. On ne retrouve pas de trace d'ADN après fixation (pistes 2 et 8) d'ADN cisplatiné ou exposé au rayonnement UV. Suite au rinçage à forte salinité, l'ADN portant les adduits du cisplatine n'est pas décroché des billes, alors que des traces de sondes plasmidiques lésés par les UV sont visibles dans les solutions de lavage. Les plasmides portant les lésions oxaliplatine et JM118 ont produit les mêmes résultats que dans le cas des sondes cisplatine.

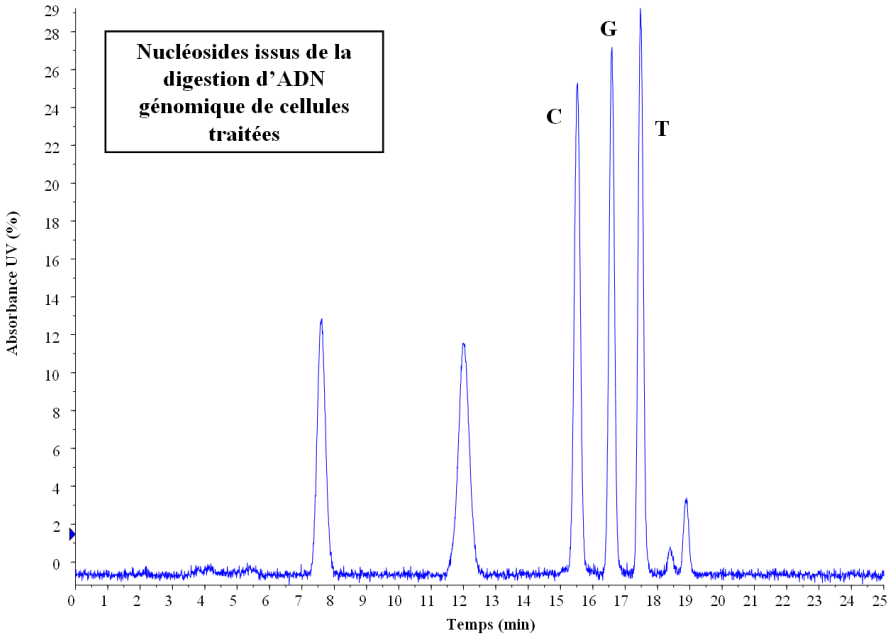
- *Chromatogrammes et spectres typiques obtenus lors de la quantification des lésions de l'ADN par CLHP-SM/SM*

Les chromatogrammes enregistrés lors de la séparation des échantillons par CLHP (nucléosides normaux / adduits / mélange de nucléosides normaux et d'adduits) sont présentés ci-dessous, ainsi que les spectres SM/SM enregistrés par le spectromètre de masse (adduits du platine puis photoproduits UV).

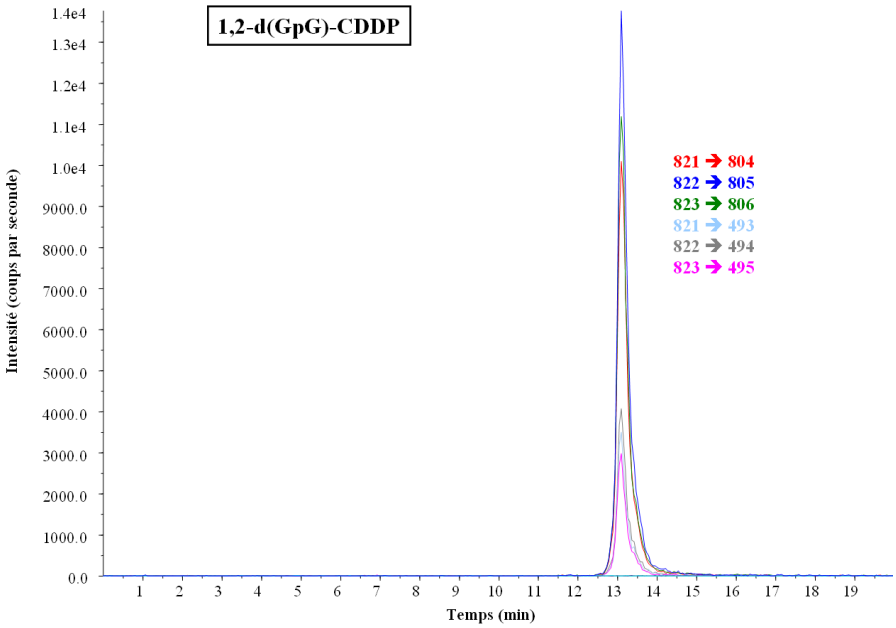
Chromatogrammes UV

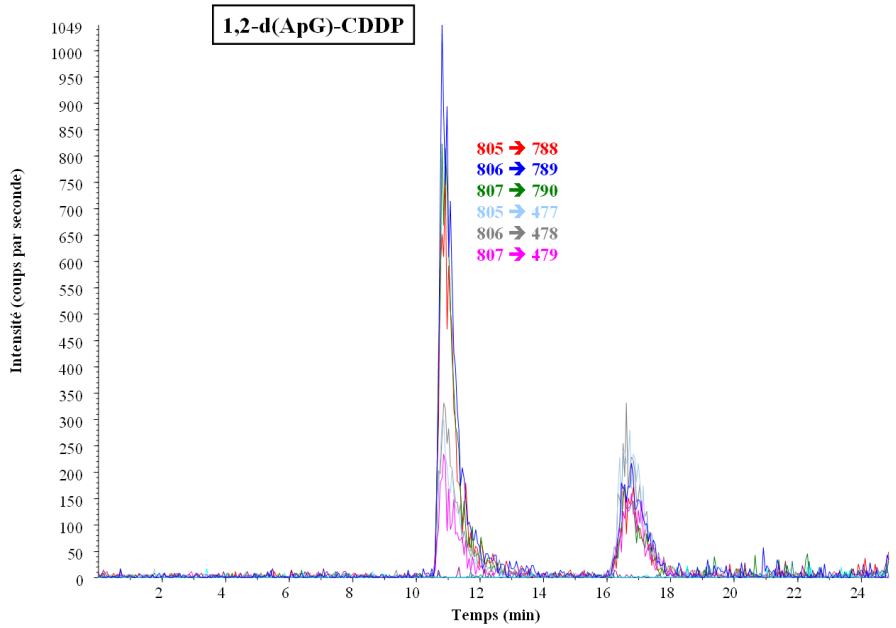


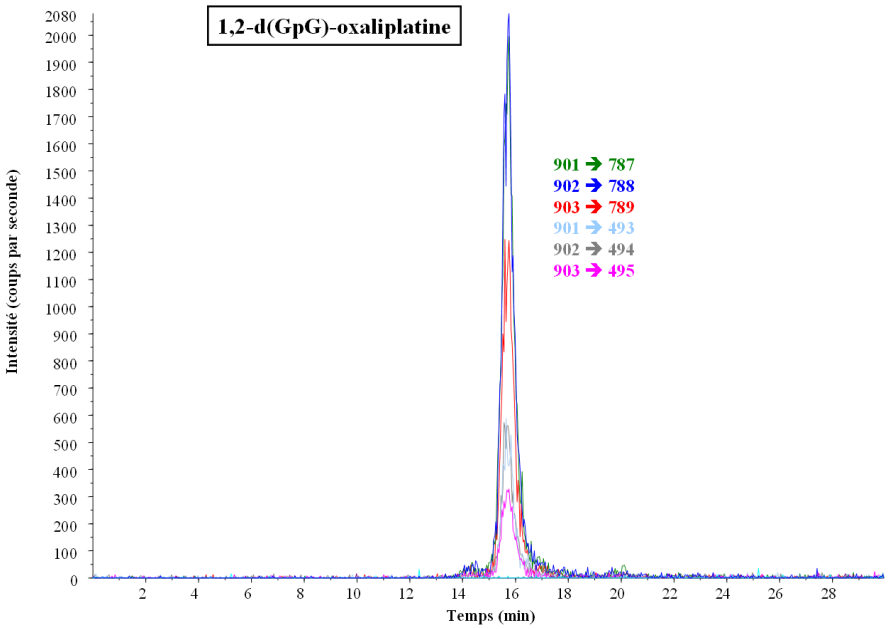


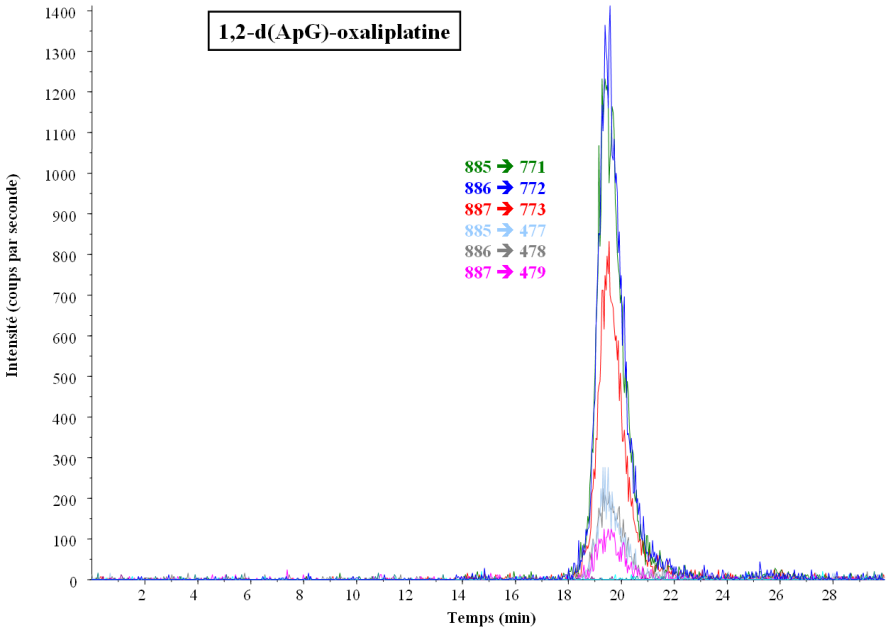

Nucléosides issus de la digestion d'ADN génomique de cellules traitées
C
G
T
Absorbance UV (%)
Temps (min)

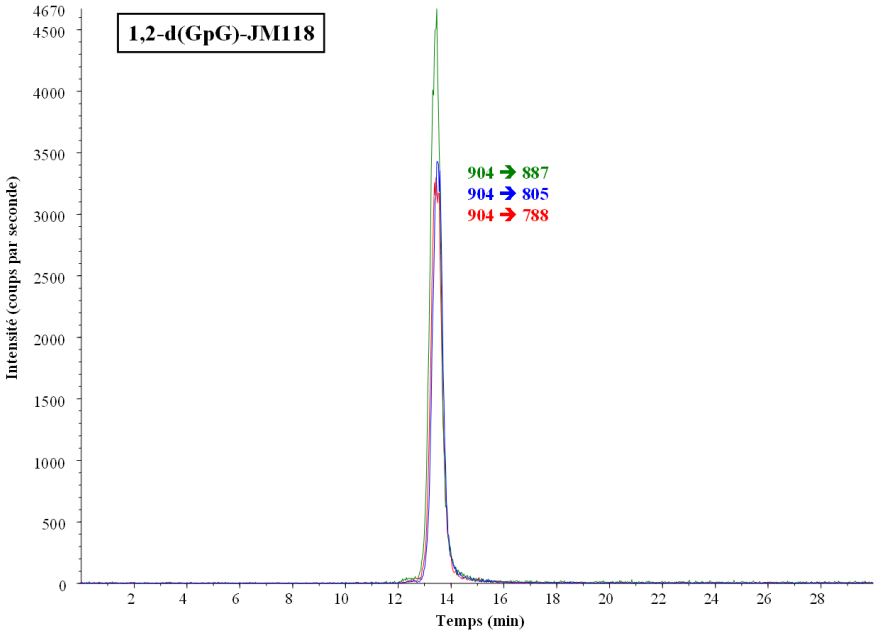
Spectres SM/SM

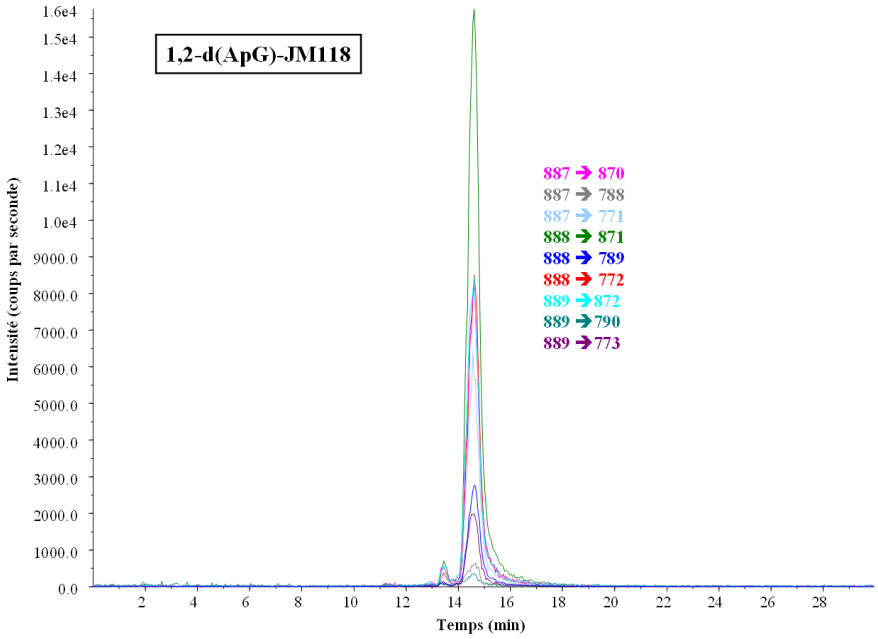


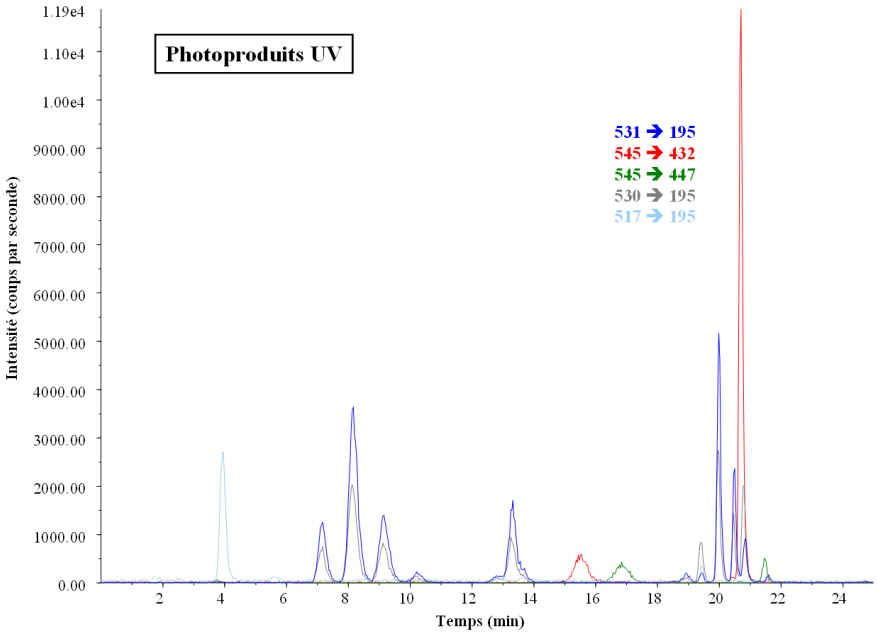



1,2-d(GpG)-oxaliplatine
901 → 787
902 → 788
903 → 789
901 → 493
902 → 494
903 → 495
Intensité (coups par seconde)
Temps (min)


1,2-d(ApG)-oxaliplatine
885 → 771
886 → 772
887 → 773
885 → 477
886 → 478
887 → 479
Intensité (coups par seconde)
Temps (min)


1,2-d(GpG)-JM118
904 → 887
904 → 805
904 → 788
Intensité (coups par seconde)
Temps (min)


1,2-d(ApG)-JM118
887 → 870
887 → 788
887 → 771
888 → 871
888 → 789
888 → 772
889 → 872
889 → 790
889 → 773
Intensité (coups par seconde)
Temps (min)


Photoproduits UV
531 → 195
545 → 432
545 → 447
530 → 195
517 → 195
Intensité (coups par seconde)
Temps (min)
1.19e4
1.10e4
1.00e4
9000.00
8000.00
7000.00
6000.00
5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
0.00
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24

Annexe 2 : Liste des communications et publications

Posters :

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., CHANTEGREL-GRACIA, J., CUNIN, V., FAVIER, A., SÈVE, M., SAUVAIGO, S. & BRETON J. (mars 2008). Design of a ligand-fishing method for the characterization of proteins associated with DNA lesions generated by cisplatine. 3èmes journées scientifiques du CLARA (Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes), Lyon (France).

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., CHANTEGREL-GRACIA, J., KUHN, L., FAVIER, A., SÈVE, M., SAUVAIGO, S. & BRETON, J. (janvier 2009). Design of a ligand-fishing method for the characterization of proteins associated with DNA lesions generated by cisplatine. 8th winter research conferences, CERLIB (Club d'Étude des Radicaux Libres en Biologie), Les Houches (France).

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., FUCHS, J., GUAIS, E., KUHN, L., GASPARUTTO, D., LIVACHE, T., FAVIER, A., SÈVE, M., SAUVAIGO, S. & BRETON, J. (mai 2009). Design of original tools for the characterization of proteins interacting with DNA lesions generated by platinum-based anticancer agents. Workshop « Proteomic Characterization of Macromolecular Complexes Involved in DNA Metabolism », ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology), Trieste (Italie).

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., COUTÉ, Y., KRAUT, A., PIETRAS, E., FAVIER, A., SÈVE, M., LIVACHE, T., GASPARUTTO, D., SAUVAIGO, S. & BRETON, J. (mars 2010). Proteomics and SPRi biochips: application to the screening of proteins interacting with DNA lesions induced by platinum antitumor compounds. 5èmes journées scientifiques du CLARA, Lyon (France).

Présentations orales :

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., FUCHS, J., GUAIS, E., KRAUT, A., FAVIER, A., SÈVE, M., LIVACHE, T., BECUWE, P., GASPARUTTO, D., SAUVAIGO, S. & BRETON, J. (août 2009). Proteomics and SPRi applied to platinated DNA interactome studies. 10th international conference on environmental mutagens (ICEM) organized by the IAEMS (International Association of Environmental Mutagen Societies), Florence (Italie).

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., PIETRAS-BARBIER, E., KRAUT, A., COUTÉ, Y., FUCHS, J., LIVACHE, T., GASPARUTTO, D., SAUVAIGO, S. & BRETON J. (octobre 2010). Biomolecular tools to identify members of the platinated DNA interactome. 12th International meeting and workshop of the SBCM (Society for Biochromatography and Nanoseparations), Ecully (France).

Article scientifique :

BOUNAIX MORAND du PUCH, C., PIETRAS, E., KRAUT, A., COUTÉ, Y., FUCHS, J., BUHOT, A., LIVACHE, T., SÈVE, M., FAVIER, A., DOUKI, T., GASPARUTTO, D., SAUVAIGO, S. & BRETON, J. (2010). TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs. Submitted to *Arch Biochem Biophys*.

TOX4 and its binding partners recognize DNA adducts generated by platinum anticancer drugs

Christophe Bounaix Morand du Puch[1], Ewa Barbier[1], Alexandra Kraut[2], Yohann Couté[2], Julia Fuchs[3], Arnaud Buhot[3], Thierry Livache[3], Michel Sève[4], Alain Favier[1], Thierry Douki[1], Didier Gasparutto[1], Sylvie Sauvaigo[1] and Jean Breton[1*]

[1] CEA Grenoble, INAC, SCIB (UMR E_3 CEA-Université Joseph Fourier, CNRS FRE3200) – Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques; 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble cedex 09, France

[2] CEA Grenoble, iRTSV, Laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes (INSERM U880 / Université Joseph Fourier); 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble cedex 09, France

[3] CEA Grenoble, INAC, SPrAM (UMR 5819 CNRS-CEA-UJF) ; 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble cedex 09, France

[4] INSERM U823, Institut A. Bonniot, BP 170, 38 042 Grenoble cedex 9, France

*Corresponding author : Dr Jean Breton, CEA / INAC / Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble cedex 09, France

Tel: +33 (0)4 38 78 56 01, Fax: +33(0)4 38 78 50 90, e-mail: jean.breton@cea.fr

Abbreviations used: CPD: cyclobutane pyrimidine dimers ; DRP: damage-response protein; DSB: double-strand breaks; HMG: high mobility group; HMGB1: high mobility group protein B1; ICL: interstrand crosslinks; LCP1: epidermal Langerhans cell protein 1; NER: nucleotide excision repair; PNUTS: phosphatase 1 nuclear targeting subunit; SPRi: surface plasmon resonance imaging; TOX4: TOX HMG box family member 4; TRF2:telomeric

repeat factor 2; hUBF: human upstream binding factor; WDR82: WD repeat-containing protein 82; (6-4)-PP: (6-4)-photoproducts.

Abstract

Platinating agents are commonly prescribed anticancer drugs damaging DNA. Induced lesions are recognized by a wide range of proteins. These are involved in cellular mechanisms such as DNA repair, mediation of cytotoxicity or chromatin remodelling. They therefore constitute crucial actors to understand pharmacology of these drugs. To expand our knowledge about this subproteome, we developed a ligand fishing trap coupled to high throughput proteomic tools. This trap is made of damaged plasmids attached to magnetic beads, and was exposed to cell nuclear extracts. Retained proteins were identified by nanoHPLC coupled to tandem mass spectrometry. This approach allowed us to establish a list of 38 proteins interacting with DNA adducts generated by cisplatin, oxaliplatin and satraplatin. Some of them were already known interactome members like High Mobility Group Protein 1 (HMGB1) or the human Upstream Binding Factor (hUBF), but we also succeeded in identifying unexpected proteins such as TOX HMG box family member 4 (TOX4), phosphatase 1 nuclear targeting subunit (PNUTS), and WD repeat-containing protein 82 (WDR82), members of a recently discovered complex. Interaction between TOX4 and platinated DNA was subsequently validated by Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi). These interactions highlight new cellular responses to DNA damage induced by chemotherapeutic agents.

Keywords

Platinum anticancer drugs; PNUTS; TOX4; WDR82; SPRi; DNA lesions.

1. Introduction

Cisplatin was the first member of platinum-based compounds approved as an anticancer drug in 1978 [1]. This molecule is still widely used to treat patients suffering from tumoral diseases such as testicular, upper aero-digestive tract, lung or ovarian cancers. In order to circumvent adverse side effects or to enlarge the panel of targeted tumors, further research led to the development and approbation of carboplatin and oxaliplatin, the latter being often used in chemotherapeutic regimen to treat colorectal tumors. Hundreds of other platinating agents are still in the pipelines at research or clinical trial stages, including compounds such as satraplatin or picoplatin [2]. Following intracellular activation, the main mechanism of action of these molecules consists in forming DNA lesions such as intra- and interstrand crosslinks (ICL), the most common being 1,2-d(GpG) and 1,2-d(ApG) intrastrand adducts [3]. These damages impair transcription and replication, and generally cause a cell-cycle arrest to provide a time frame for DNA repair. When the damage extent exceeds repair capacities, apoptosis is induced. These cellular and molecular events involve a wide range of proteins that interact with DNA lesions or with subsequent DNA distortions and constitute the "platinated DNA interactome". These include damage response proteins (DRP) but also other factors whose ordinary targets are not DNA lesions.

Xeroderma pigmentosum Complementation Group C (XPC) is an important member of this subproteome as it binds to platinum adducts during the recognition step of the global genome repair subpathway of nucleotide excision repair (NER). Among the other well-studied members also stand the High Mobility Group (HMG) proteins, whose affinity for platinum adducts has been known for years [4]. Indeed, HMGB1 was one of the first proteins identified as being able to interact with platinated DNA [5]. The biological repercussions of HMGB1 binding are still controversial, as some published works demonstrated a subsequent

facilitation of DNA repair whereas others suggest a shielding effect towards NER factors [6]. A second example is hUBF. This ribosomal RNA transcription factor is hijacked from its natural binding site by cisplatin lesions, for which it demonstrates a strong affinity [7]. Lists of other proteins already characterized as capable of recognizing DNA platinum adducts are accessible in dedicated reviews [8]. Discovery of these protein-DNA interactions already brought crucial data for the understanding of platinating agents pharmacology. In order to establish the cartography of damaged DNA-interacting proteins, protocols using proteomic tools were recently designed for DNA lesions such as double strand breaks [9], abasic sites [10], oxidative damage [11] and DNA crosslinks generated by platinating agents [12, 13]. The aim of our work was to optimize one of these approaches combining a ligand fishing system and high throughput proteomics, to allow us to trap and identify new proteins interacting with DNA alterations. Our tool is made of plasmids damaged by one of three different platinum drugs (cisplatin, oxaliplatin or the satraplatin metabolite JM118) and immobilized onto magnetic beads. This system was exposed to HeLa (cervical cancer cell line) and MDA-MB231 (breast cancer cell line) nuclear extracts, and retained proteins were identified by proteomics. This strategy allowed selection of relevant candidates that were validated by immunoassays and SPRi. Identified proteins may improve our understanding of molecular and cellular responses to this particular type of anticancer drugs.

2. Materials and methods

2.1 Protein sources

Two different protein sources were used in our study. HeLa nuclear extracts were purchased from CIL Biotech (Mons, Belgium). MDA-MB231 extracts were prepared in our laboratory. This cell line was a gift from Prof. Philippe Becuwe (University of Nancy, France). Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% (v/v) fetal calf serum and 800 µg/ml geneticin (Invitrogen) at 37 °C under 5% CO_2. Cells were passaged or harvested at ~80% confluence. Nuclear extracts were prepared as previously described [14].

2.2 Ligand fishing

2.2.1 Probe synthesis

Principle for this step was adapted from [15]. Plasmid pBlueScript II SK (-) (Stratagene) was linearised using restriction enzymes ClaI and BamHI (NEB). The larger fragment obtained was purified with Quick Spin G-50 sephadex columns (Roche), precipitated and resuspended in water.

Cohesive ends obtained through ClaI and BamHI restrictions allowed 3’ labeling of the plasmids by biotinylated dATP using Klenow polymerase (NEB), biotin-14-dATP (Invitrogen). Alpha-thio 2’dNTPs (Trilink biotechnologies) or normal dNTPs (GE Healthcare) were added to fill in the remaining part of the overhangs. Biotinylated DNA was purified by isopropanol/sodium acetate precipitation.

Biotinylated plasmids (100µg) were exposed at 37°C in the dark to either 67 µM cisplatin (Bayer Pharma) for 2h, 200µM oxaliplatin (Sanofi Aventis) for 4h, or 67 µM JM118 (kindly provided by Agennix) for 2h. Probes were then precipitated, resuspended in water and stored at -20°C. These conditions generated homogenous levels of adducts : 7 1,2-d(ApG) and 35 1,2-d(GpG) crosslinks / plasmid for cisplatin, 2 1,2-d(ApG) and 22 1,2-d(GpG) crosslinks / plasmid for oxaliplatin, 5 1,2-d(ApG) and 31 1,2-d(GpG) crosslinks / plasmid for JM118. UVC-damaged plasmid probes were also employed in our study. These probes were prepared with biotinylated plasmids following a method previously described [16], which allowed the generation of 12 (6-4)-photoproducts ((6-4)-PP) and 26 cyclobutane pyrimide dimers (CPD) per plasmid. Adduct levels were measured by HPLC-MS/MS (1100 Agilent chromatographic system coupled to SCIEX API 3000 electrospray triple quadrupolar spectrometer, multiple reaction monitoring analysis) after plasmid digestion to obtain a mix of normal deoxynucleosides and monophosphate adducts. The amount of each lesion was determined by using an external calibration obtained by the injection of known amounts of the authentic compound. Normal nucleosides were quantified by HPLC-UV with a detector set at 260nm placed at the outlet of the column. Representative spectra for both UV and mass detections are available in supplementary Fig. 1.

Probes were finally attached to magnetic beads (Dynabeads kilobaseBINDER, Invitrogen) according to the manufacturer instructions, using 500 µg beads for 10 µg damaged plasmids. Functionalised beads were finally rinsed twice with water, then stored in water at 4°C.

2.2.2 Ligand fishing

Buffer A (final concentrations: 40mM Hepes-KOH pH7.8, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5mM DTT) was used to equilibrate functionalised beads. In a 100 µL final volume, 1.2 µg of DNA probes, 120 µg of fish sperm DNA (Roche), and 100 µg of nuclear extracts were

mixed in buffer A. Samples were incubated under shaking for 45 min at 37°C. Supernatant was eliminated using a magnetic tray, and beads were rinsed twice with 100 µL of rinsing buffer: 1M (high stringency), 150mM (intermediate stringency) or 50mM (low stringency) NaCl, 20mM Hepes-KOH pH7.8, 5mM $MgCl_2$, 0.025% Nonidet-P-40. Proteins were finally released in 20 µL of Laemmli buffer (Tris-HCl pH6.8 25 mM, SDS 2%, glycerol 4%, β-mercaptoethanol 5%, bromophenol blue 0.0008%) by heating at 90°C for 10 min.

2.3 Proteomic analyses

Proteins contained in ligand fishing eluates were stacked by SDS-PAGE in a 2 mm-high band and stained with Coomassie blue. Protein bands were manually excised from the gels, proteins digested in-gel with trypsin, and resulting peptides extracted using a sample preparation robot (EVO150, Tecan) as previously described [17]. Extracted peptides were analysed by nano-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap Discovery, Thermo Fischer) and identified using Mascot software (Matrix Science) and the Uniprot database (*Homo sapiens* taxonomy) as described in [18]. Proteins identified with a minimum score of 35 were automatically validated using IRMa software [19]. Proteins showing a score > 70 and a number of identified peptides ≥ 2 are provided in supplementary Table 1. Functions of identified proteins were assessed using Generic GO Term Mapper (http://go.princeton.edu).

2.4 Western blot

Proteins obtained by ligand fishing were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and analysed by Western blot using the following monoclonal antibodies: rabbit anti-HMGB1 (Abcam), rabbit anti-PNUTS (Abcam), rabbit anti-TOX4 (Abcam) and mouse anti-β actin (Sigma). Secondary antibodies were monkey anti-rabbit and anti-mouse coupled

to horseradish-peroxydase (GE Healthcare). ECL Plus and Hyperfilm ECL (GE Healthcare) were used to detect the bands.

2.5 SPRi

2.5.1 DNA probe synthesis and control

The design of SPRi ODN probes is illustrated on Fig.3. Sequences employed are detailed in Table 1. Four Zip ODNs were grafted on the chip, allowing localization of each type of short damaged or control ODNs on specific areas of the gold layer (DNA damaged with cisplatin, oxaliplatin and JM118, and undamaged DNA). Long 40-base sequences complementary to Zip and damaged probes were used to obtain the double-stranded structure. The short sequences bearing DNA crosslinks were adapted from [20]. Short damaged ODNs were synthesized using the phosphoramidite chemistry carried out on an Applied Biosystems 392 DNA synthesizer. Target ODNs (20 nmol) were site-specifically damaged by overnight incubation at 37°C with cisplatin, oxaliplatin or JM118 (150 nmol), then purified by RP-HPLC. Correct masses were measured by MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker) measurements. 5'-pyrrole-modified-Zip and long complementary sequences were obtained from Eurogentec.

2.5.2 Grafting of DNA probes

SPRi biochips were made of glass prisms covered with a 50 nm gold layer (GenOptics), onto which DNA probes were grafted. Electro-copolymerization of these probes using pyrrole chemistry was performed according to [21], except that the electric pulse voltage was 2.4V. This voltage was applied by a potentiostat galvanostat PG 263 (Princeton Applied Research).

Quality of spotting was assessed by controlling electrochemical charges of each spot. All sequences were grafted in triplicate.

2.5.3 Target/probe hybridization and interaction analysis

Duplex of damaged targets ODNs (275 nM) was obtained by mixing damaged/undamaged short ODN (275nM) with long complementary ODNs (250 nM) in buffer A already described in the ligand fishing section. Solution was heated for 5 min at 95°C, and cooled at room temperature to ensure hybridization. SPRi experiments were performed on a homemade system running under LabView software (GenOptics) for real-time data collection. Prism was placed in a heated cell allowing temperature control for target hybridization (37°C) and protein interaction (25°C). All steps were performed at a constant flow rate of 2.5 mL/h in buffer A. SPRi chip surface was first blocked with 1% BSA in buffer A. Damaged ODNs were subsequently injected for final hybridization with zip sequences. Tested proteins were HMGB1 and TOX4 full length recombinant proteins (Abnova) and ultrapure BSA (USB), injected at 20 nM in buffer A. Proteins were separated from the probes with a 1.5M NaCl solution. At the end of each experiment the biochip was regenerated with a 0.1M NaOH solution, rinsed with water, dried with argon and stored at 4°C.

3. Results

3.1 Ligand fishing

The list of proteins isolated from HeLa nuclear extracts by our ligand fishing approach was obtained after proper optimizations of crucial parameters including (i) levels of platinum DNA damage within grafted probes (1,2-(d(GpG) and 1,2-d(ApG) crosslinks levels were respectively of ≈ 22-35 and ≈ 3-11 lesions / plasmid depending on the platinating agent), (ii) plasmidic probes concentration / beads quantity ratio (iii) beads blocking and (iv) methods and buffers used to wash the trap and to release proteins before identification. The sharpest criterion was the releasing protocol. Methods aiming at reducing the proportion of non specific proteins binding (mainly those adsorbed on magnetic beads), including the use of endonucleases to digest the DNA fishing probes, led to poorly reproducible results (data not shown). Actually, the best results were obtained by releasing the proteins directly within Laemmli buffer. Beads without DNA and beads grafted with undamaged plasmids were used as controls to discriminate between interesting candidates and non specific proteins identified in the proteomic experiments. After optimizations, each experiment was performed twice, both using low and intermediate stringency rinsing buffers to extend the range of potentially retained proteins (we observed that the highest salt concentration was a too stringent condition and caused loss of proteins of interest). Four different analyses per plasmid probe were therefore performed. The extensive list of identified proteins obtained by proteomics for each experiment and condition (including controls) is available as supplementary Table 1. A summary of these results is described in Fig.1 and Table 2. Taking only into account reliably identified proteins (i.e. with sufficient proteomic scores and peptide numbers in two independent experiments), 38 of them were specifically retained by platinated probes, 47% of which possess a known DNA binding activity according to the Gene Ontology annotation.

Nine out of the 38 proteins are already known members of the platinated DNA interactome (namely HMGB1, HMGB2, HMGB3, hUBF, SSRP1, SPT16, Ku70, SMCA4 and DNA ligase III). To our knowledge, the 29 other candidates had never been described before as associated with platinum-damaged DNA. Twelve out of the 38 proteins were recovered from ligand fishing reactions with the 3 different damaging agents, while 26 proteins were retained by only one or two types of damaged probes. Oxaliplatin adducts were those that retained the greatest number of unique protein (11), as opposed to cisplatin (5) and JM118 (3).

Our proteomics results were tested and confirmed by Western blot analyses of the ligand fishing eluate for 3 identified candidates (Fig. 2): HMGB1 as a well-known platinum adduct-interacting protein, but also TOX4 and PNUTS as original candidates linked to each others in recently published works [22, 23]. Also, capture of TOX4 (6 peptides, score 273), PNUTS (7 peptides, score 319) and WDR82 (7 peptides, score 269) onto the cisplatin-damaged probes was observed using MDA-MB231 nuclear extracts as a second source of proteins. No additional original candidate was identified with these extracts. However, we noticed the presence of TFAM (18 peptides, score 543), another well-known platinum adduct-recognizing factor [4] that was absent from the protein list obtained with HeLa extracts.

The affinity of HMGB1 for another type of bulky adducts, namely UV-induced pyrimidine dimers, has already been reported [24]. We thus evaluated by proteomics the binding of TOX4 and PNUTS from HeLa nuclear extracts onto a UVC-damaged plasmid probe. As a positive control, we also monitored the binding of DNA Damage-Binding protein 2 (DDB2) on these probes. DDB2 is a member of the UV-DDB complex responsible for UV-damage recognition and triggers the recruitment of NER machinery. Neither TOX4 nor PNUTS were captured with this particular trap, while DDB2 was (9 peptides, score 345). The MDA-MB231 nuclear extracts (in which DDB2 is absent) were also employed with the UVC-

damaged probe. Once again, TOX4 and PNUTS were absent, demonstrating that their interaction with these particular lesions is not impaired by a shielding mechanism of DDB2. We introduced thio-dNTPs at the extremities of our probes to avoid their degradation by nucleases present in the nuclear extracts [25]. In order to check that the identification of TOX4 and PNUTS was not an artifact originating from the formation of adducts on the internucleotide thiophosphate groups, we carried out an experiment with normal dNTPs to fill in the 5' and 3' ends of the plasmids. Western blot analyses confirmed the trapping of TOX4 and PNUTS (supplementary Fig. 2 A).

Also, high stringency washes (salt concentration ≥ 1M) are generally employed when using probes that capture proteins thanks to the formation of a covalent bond. It is not the case for the protocol we developed, and high stringency buffers revealed less efficient: HMGB1 signal was reduced (supplementary Fig. 2 B), while that of TOX4 and PNUTS was abolished. This is the reason why we relied on intermediate and low stringencies, thereby preserving these interactions, but also the presence of non-specific proteins. This explains the large number of total proteins found in each sample (between 92 and 194, supplementary Table 1). Appropriate controls (undamaged DNA grafted onto the beads, and beads alone) are therefore indispensable to sort relevant candidates from all the identified proteins.

3.2 SPRi

SPRi is a versatile tool allowing the simultaneous, label-free and real-time study of biomolecular interactions [26]. We used this approach to assess in parallel interactions between recombinant purified proteins and four different double stranded DNA probes: oligodeoxynucleotides (ODNs) bearing 1,2-d(GpG) cisplatin, oxaliplatin and JM118 crosslinks and ODNs without lesion. These damaged ODNs were synthesized, purified, controlled and grafted onto SPRi biochips. The tested proteins were successively HMGB1

(positive control), TOX4 (original candidate selected from proteomic results) and BSA (negative control). These experiments were performed at least twice with two different SPRi biochips for each protein. TOX4 showed a significant but lower capacity to bind platinated probes in comparison with HMGB1 (Fig. 3). It also showed a stronger affinity for all 1,2-d(GpG) crosslinks tested in comparison with non-damaged ODNs. Our repeated experiments did not demonstrate clear differences in binding affinity for TOX4 among the 3 platinated lesions tested. We nonetheless noticed that in our experimental conditions, HMGB1 recognizes cisplatin and JM118 crosslinks with a stronger affinity than oxaliplatin lesions.

4. Discussion

Proteomics methods applied to the identification of proteins recognizing DNA lesions constitute a recent research area. Various approaches have been developed to study these groups of proteins. Regarding lesions induced by platinating agents, Stansfield *et al*. [27] used protein microarrays incubated with cisplatin-modified fluorescent ODNs. Using this tool, the authors identified new interactions such as an association between cisplatin-modified DNA and Aurora kinase A. The most common strategy consists in trapping proteins using site-specifically damaged DNA immobilized on a solid phase such as magnetic beads. Extensive lists of proteins interacting with 1,2-instrastrand crosslinks, 1,3-instrastrand crosslinks and ICL were thus recently obtained by photocrosslinking proteins onto the photoactive cisplatin analogue Pt-BP6 inserted in duplex or dumbbell probes [12, 13, 28]. These original methods allowed the highlighting of new proteins interacting with platinum adducts, such as PARP-1. To carry out our experiments, we chose a different type of DNA probe consisting in 3 kb linearized plasmids exposed to three platinating agents: cisplatin, oxaliplatin or JM118. This strategy offers the following advantages: (i) a longer DNA sequence potentially allowing association with large protein complexes (ii) presence of several lesions/plasmid enhancing the quantity of trapped proteins and therefore the sensitivity of the method (iii) presence of the whole spectrum of lesions generated by the real pharmacological agent. Dealing with this last point, it must be emphasized that our probes contain a mixture of different crosslinks distributed all along the sequence rather than one well characterized alteration at a specific site. These differences with other ligand fishing probes may explain some discrepancies observed with the abovementioned studies [12, 13]. Indeed, when comparing the lists of proteins identified in our study with previously published works, we can observe the presence of common elements (HMGB1, HMGB2, HMGB3, hUBF, DNA ligase III, Ku70) but also of

proteins specific to our study. For instance, we succeeded in trapping both SSRP1 (not found by other global methods but already known to interact with platinated DNA) and SPT16, but also more original candidates such as WDR82, PNUTS or TOX4. In addition to the identification of novel proteins involved in platinum adducts recognition, we have also demonstrated the binding of already known candidates to satraplatin lesions. Limited clinical development work is currently being done with satraplatin, which may be ultimately used as an oral chemotherapeutic drug [29]. Binding of HMGB1 to JM118-related DNA lesions was already demonstrated [30]. In this work, we showed that DNA ligase III, hUBF, SSRP1, SPT16 and HMGB2 also interact with JM118 lesions.

Among proteins listed in Table 2, we must underline the absence of known repair factors from the NER pathway. Nevertheless, we noticed the presence of Ku70 and MDC1, proteins recruited to DSB [31], and ARF6, a factor implicated in cell motility but also capable of interacting with Ku70 [32]. In addition, a large portion of our list comprises chromatin remodelling factors, including HMGB factors but also other proteins involved in this process: RuvBL2, SMARCA5, TLK1, MTA2, SMC3. Interactions between these candidates and platinum DNA damage require further validation using complementary methods.

For our study, we selected TOX4, also called epidermal Langerhans Cell Protein 1 (LCP1). Indeed, this protein has never been directly linked to processes associated with damaged DNA. TOX4 belongs to the HMG domain proteins family [33]. Several HMG-box proteins have an established capacity to bind DNA damaged by platinating agents through their HMG domain, a DNA binding motif made of 3 alpha helices [3, 34]. Depending on the HMG protein, this binding has been associated with a wide range of molecular mechanisms such as shielding toward DNA repair factors, recruitment of DNA repair factors or hijacking of transcription factors. The TOX subfamily of HMG-box proteins has been recently discovered and the biological role of TOX4 is far from being elucidated. Its N-terminus domain was

characterized as a strong transcription activator [23]. Its identification as a platinated-DNA interacting protein suggests it may be hijacked from its main role by adducts as it is the case for hUBF. Additionally, we identified TOX4 using the same ligand fishing strategy in nuclear extracts of another cell line (MDA-MB231, breast cancer). To bring complementary clues of TOX4 / damaged DNA interaction, we confirmed proteomic data using Western blot and took advantage of the SPRi method. This approach had already been used in our team to analyse interactions between oxidative DNA lesions and base excision repair proteins [35]. Here, it allowed the assessment of recombinant TOX4 binding on ODNs bearing 1,2-d(GpG) crosslinks, and showed that platinated drugs induced lesions are recognized with a higher affinity than ODNs without DNA damage. These parallel interactions studies also showed that binding of TOX4 was weaker than that of HMGB1 for the 3 lesions and non-damaged DNA.

Using our ligand fishing strategy on HeLa nuclear extracts but also on MDA-MB231 nuclear extracts, we identified PNUTS (also called PPP1R10) and WDR82. PNUTS inhibits protein phosphatases PPP1CA and PPP1CC, binds to nucleic acids and plays a role in mechanisms such as cell proliferation and apoptosis by regulating key actors such as pRb [36] and p53 [37]. Our bait also trapped the WDR82 protein, involved in histone methylation and initiation of transcription. Interestingly, an association between PNUTS and TOX4 has recently been demonstrated, followed by another study showing the formation of a PNUTS/TOX4/WDR82 complex possibly involved in chromatin structuration during the mitosis/interphase transition. PNUTS/TOX4 interaction suppresses the transcriptional activity of TOX4. It would be of great interest to find out if the interaction between damaged DNA and PNUTS is affecting its biological properties, and if the biological role of the PNUTS/TOX4/WDR82 complex is modified by platinating agents. Moreover, it would be interesting to test if PNUTS and WDR82 directly bind platinated crosslinks or only through their interaction with TOX4.

In addition, two telomeric proteins were identified by our assay: telomeric repeat-binding factor 2 (TRF2) and RIF1. A recent publication by Kim *et al*. [38] suggests that TRF2 directly interacts with PNUTS, this association playing a role in telomere length regulation. TRF2 is a member of the shelterin complex in charge of telomere protection from end-to-end fusion process or DNA damage sensors. Using telomere mimicking ODNs, Ourliac-Garnier *et al*. [39] found a decreased affinity of TRF2 towards platinated sequences in comparison with intact ODNs. In addition, telomere chromatin immunoprecipitation indicated a 60% decrease of TRF2 binding when cells were treated by cisplatin. This discrepancy with our results may be explained by differences of DNA probes sequences or DNA adducts patterns. The decrease in telomere/TRF2 association in cisplatine-treated cells may also be explained by a reduction of the available pool of TRF2 being once again hijacked by cisplatin adducts in non-telomeric DNA. Demonstration of these assumptions and a better understanding of relationships between DNA lesions and TRF2 have to be further assessed.

Our study brought results that partially overlap those of other teams, but also comprise several new candidates. This emphasizes the usefulness of carrying out complementary methods rather than one single approach to tend toward a complete cartography of the factors capable of interacting with damaged DNA. Following validation, these new members of the protein network surrounding platinated DNA lesions may be of great interest to go further in the understanding of the pharmacology of these therapeutic drugs and improve it in terms of efficiency, resistance overcoming and side effects limitations. These proteins might also constitute future targets for their potentialisation. These interactions could even find therapeutic applications in non cancerous diseases: low dose cisplatin regimens are for example tested as HMGB1 intracellular sequestration methods to prevent the release of this pro-inflammatory mediator [40]. Future directions include the adaptation of the presented tools to allow the screening of platinated DNA-interacting proteins within a chromatin context

[41], which would permit to take into account the complex environment that might interfere with other proteins/damaged DNA interactions. More generally, both the ligand fishing system and the SPRi biochip developed for this study may be applied to screen interactomes associated with other types of DNA lesions generated by other anticancer drugs, radiations or environmental mutagenic compounds.

References

[1] L. Kelland, Nat Rev Cancer 7 (2007) 573-584.
[2] B.A. Teicher, Clin Cancer Res 14 (2008) 1610-1617.
[3] D. Wang, S.J. Lippard, Nat Rev Drug Discov 4 (2005) 307-320.
[4] C.S. Chow, J.P. Whitehead, S.J. Lippard, Biochemistry 33 (1994) 15124-15130.
[5] E.N. Hughes, B.N. Engelsberg, P.C. Billings, J Biol Chem 267 (1992) 13520-13527.
[6] S.S. Lange, K.M. Vasquez, Mol Carcinog 48 (2009) 571-580.
[7] D.K. Treiber, X. Zhai, H.M. Jantzen, J.M. Essigmann, Proc Natl Acad Sci U S A 91 (1994) 5672-5676.
[8] Y. Jung, S.J. Lippard, Chem Rev 107 (2007) 1387-1407.
[9] N. Hegarat, G.M. Cardoso, F. Rusconi, J.C. Francois, D. Praseuth, Nucleic Acids Res 35 (2007) e92.
[10] R.A. Rieger, E.I. Zaika, W. Xie, F. Johnson, A.P. Grollman, C.R. Iden, D.O. Zharkov, Mol Cell Proteomics 5 (2006) 858-867.
[11] M. Winnacker, V. Welzmiller, R. Strasser, T. Carell, Chembiochem 11 (2010) 1345-1349.
[12] E.R. Guggenheim, D. Xu, C.X. Zhang, P.V. Chang, S.J. Lippard, Chembiochem 10 (2009) 141-157.
[13] G. Zhu, S.J. Lippard, Biochemistry 48 (2009) 4916-4925.
[14] M.I. Olnes, R.N. Kurl, Biotechniques 17 (1994) 828-829.
[15] A. Gérard, S.E. Polo, D. Roche, G. Almouzni, L.C. Judith, M. Paul, Methods in Enzymology, Academic Press, 2006, pp. 358-374.
[16] J.F. Millau, A.L. Raffin, S. Caillat, C. Claudet, G. Arras, N. Ugolin, T. Douki, J.L. Ravanat, J. Breton, T. Oddos, C. Dumontet, A. Sarasin, S. Chevillard, A. Favier, S. Sauvaigo, Lab Chip 8 (2008) 1713-1722.
[17] M. Jaquinod, F. Villiers, S. Kieffer-Jaquinod, V. Hugouvieux, C. Bruley, J. Garin, J. Bourguignon, Mol Cell Proteomics 6 (2007) 394-412.
[18] B. Bernay, M.C. Gaillard, V. Guryca, A. Emadali, L. Kuhn, A. Bertrand, I. Detraz, C. Carcenac, M. Savasta, E. Brouillet, J. Garin, J.M. Elalouf, Mol Cell Proteomics 8 (2009) 946-958.
[19] V. Dupierris, C. Masselon, M. Court, S. Kieffer-Jaquinod, C. Bruley, Bioinformatics 25 (2009) 1980-1981.
[20] Q. He, U.M. Ohndorf, S.J. Lippard, Biochemistry 39 (2000) 14426-14435.
[21] J.B. Fiche, J. Fuchs, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache, Anal Chem 80 (2008) 1049-1057.
[22] J.H. Lee, J. You, E. Dobrota, D.G. Skalnik, J Biol Chem 285 (2010) 24466-24476.
[23] S.J. Lee, J.K. Lee, Y.S. Maeng, Y.M. Kim, Y.G. Kwon, Exp Mol Med 41 (2009) 189-200.
[24] E.A. Pasheva, I.G. Pashev, A. Favre, J Biol Chem 273 (1998) 24730-24736.
[25] J.A. Mello, J.G. Moggs, G. Almouzni, Methods Mol Biol 314 (2006) 477-487.
[26] S. Scarano, M. Mascini, A.P. Turner, M. Minunni, Biosens Bioelectron 25 (2010) 957-966.
[27] H.E. Stansfield, B.P. Kulczewski, K.E. Lybrand, E.R. Jamieson, J Biol Inorg Chem 14 (2009) 193-199.
[28] C.X. Zhang, P.V. Chang, S.J. Lippard, J Am Chem Soc 126 (2004) 6536-6537.
[29] H. Choy, C. Park, M. Yao, Clin Cancer Res 14 (2008) 1633-1638.
[30] A. Vaisman, S.E. Lim, S.M. Patrick, W.C. Copeland, D.C. Hinkle, J.J. Turchi, S.G. Chaney, Biochemistry 38 (1999) 11026-11039.

[31] T.A. Mochan, M. Venere, R.A. DiTullio, Jr., T.D. Halazonetis, Cancer Res 63 (2003) 8586-8591.
[32] J.K. Schweitzer, C. D'Souza-Schorey, Exp Cell Res 311 (2005) 74-83.
[33] E. O'Flaherty, J. Kaye, BMC Genomics 4 (2003) 13.
[34] U.M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard, Nature 399 (1999) 708-712.
[35] C. Corne, J.B. Fiche, D. Gasparutto, V. Cunin, E. Suraniti, A. Buhot, J. Fuchs, R. Calemczuk, T. Livache, A. Favier, Analyst 133 (2008) 1036-1045.
[36] G. De Leon, T.C. Sherry, N.A. Krucher, Cancer Biol Ther 7 (2008) 833-841.
[37] S.J. Lee, C.J. Lim, J.K. Min, J.K. Lee, Y.M. Kim, J.Y. Lee, M.H. Won, Y.G. Kwon, Cell Death Differ 14 (2007) 1106-1116.
[38] H. Kim, O.H. Lee, H. Xin, L.Y. Chen, J. Qin, H.K. Chae, S.Y. Lin, A. Safari, D. Liu, Z. Songyang, Nat Struct Mol Biol 16 (2009) 372-379.
[39] I. Ourliac-Garnier, A. Poulet, R. Charif, S. Amiard, F. Magdinier, K. Rezai, E. Gilson, M.J. Giraud-Panis, S. Bombard, J Biol Inorg Chem 15 (2010) 641-654.
[40] P. Pan, J. Cardinal, R. Dhupar, M.R. Rosengart, M.T. Lotze, D.A. Geller, T.R. Billiar, A. Tsung, J Leukoc Biol 86 (2009) 625-632.
[41] B. Wu, C.A. Davey, Chem Biol 15 (2008) 1023-1028.

Acknowledgments

We thank R Bombera for his help in the optimization of SPRi, C Saint-Pierre for ODN controls and JL Ravanat for his expertise in mass spectrometry. We are also thankful to Agennix for providing JM118. This work was supported by a grant from “La Ligue contre le Cancer, comité de la Drôme”.

Research highlights

- TOX4/PNUTS/WDR82 complex interacts with DNA damaged by anticancer platinum drugs
- SPRi shows that TOX4 affinity for platinum adducts is weaker than that of HMGB1
- Plasmid probes and proteomics allow identification of damaged DNA interactome

Figure captions

Fig. 1. Proteomics results: numbers of proteins reliably identified in the different ligand fishing assays

Indicated numbers are limited to proteins identified in two distinct experiments with Mascot scores > 75 and numbers of identified peptides ≥ 2. Results obtained with low and high stringency buffers are mixed.

Fig. 2. Confirmation of proteomics identification by Western-blotting performed on ligand fishing eluates

β-actin is used as a loading control. This protein is adsorbed on magnetic beads and is therefore released in all ligand fishing eluates.

Fig. 3. SPR imaging

(A) Probes design (B) SPRi sensorgrams obtained with 20 nM TOX4 (tested candidate), HMGB1 (protein already known to interact with platinated DNA) and BSA (negative control).

Figure 1

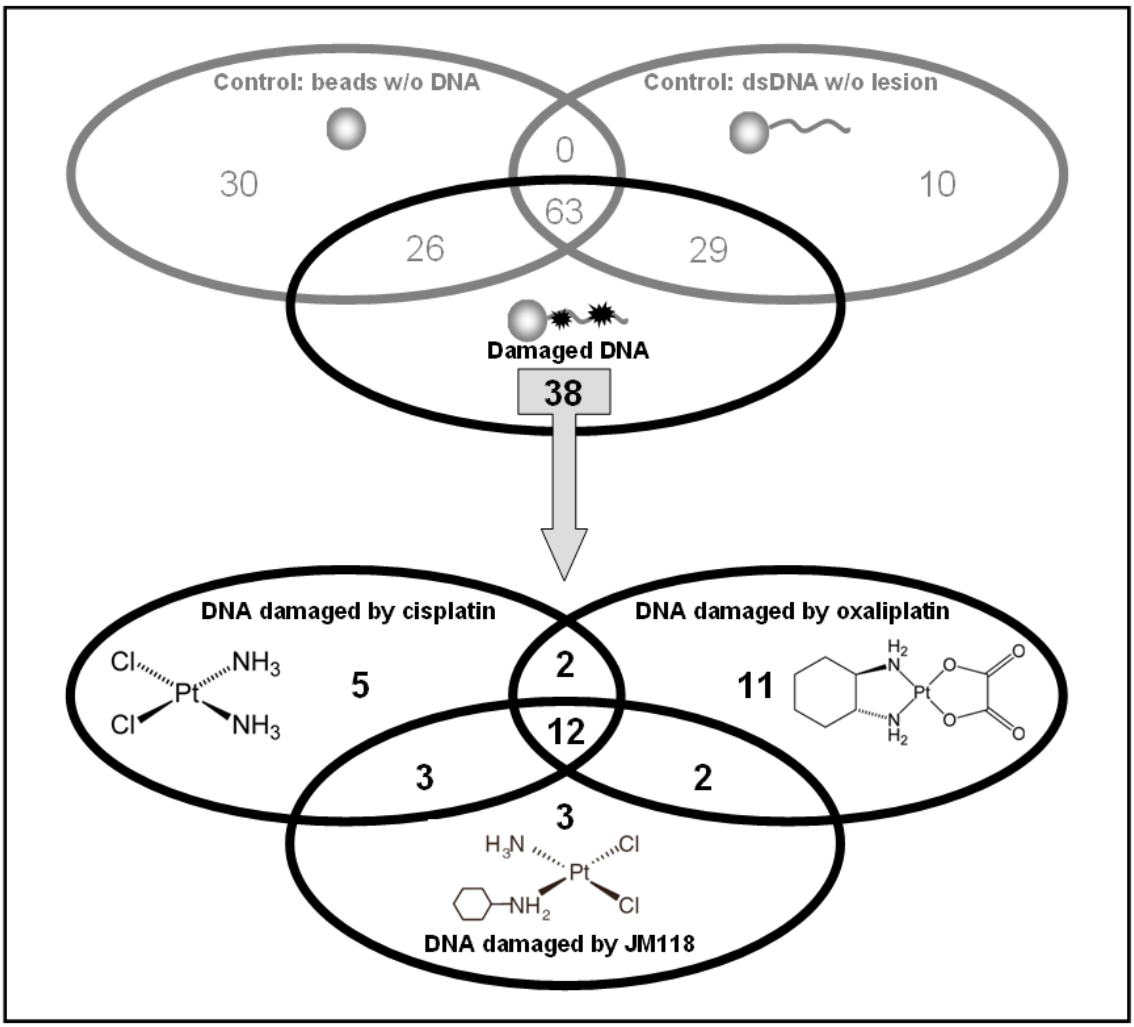

Control: beads w/o DNA
Control: dsDNA w/o lesion
30
0
63
10
26
29
Damaged DNA
38
DNA damaged by cisplatin
DNA damaged by oxaliplatin
5
2
11
12
3
2
3
DNA damaged by JM118

Figure 2

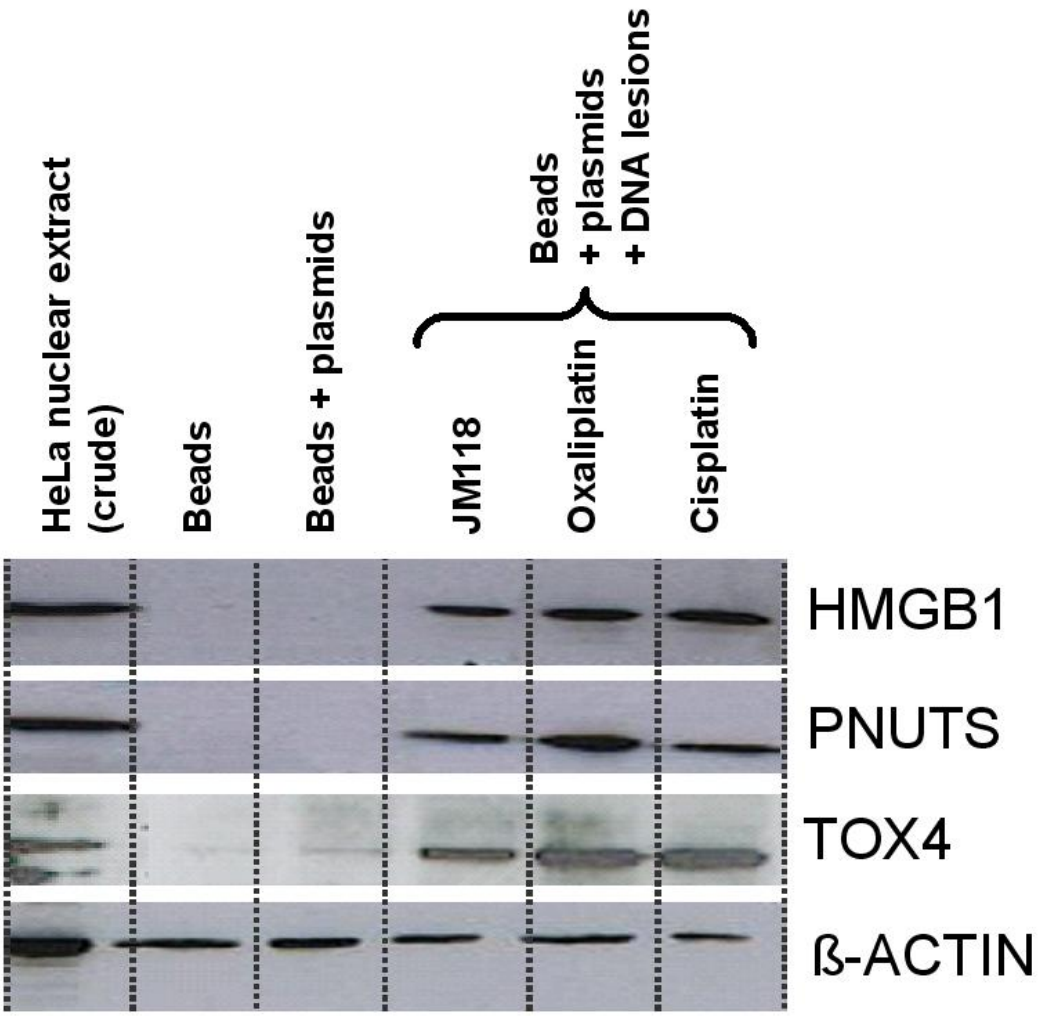

HeLa nuclear extract (crude)
Beads
Beads + plasmids
Beads + plasmids + DNA lesions
JM118
Oxaliplatin
Cisplatin
HMGB1
PNUTS
TOX4
ß-ACTIN

Figure 3

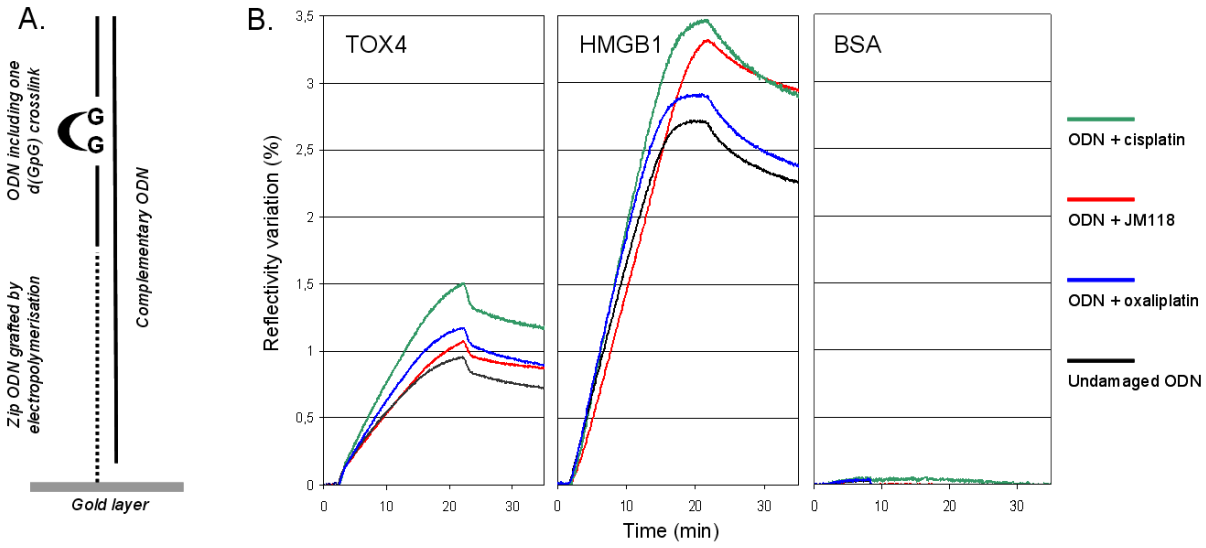

A.
ODN including one d(GpG) crosslink
G
G
Complementary ODN
Zip ODN grafted by electropolymerisation
Gold layer
B.
TOX4
HMGB1
BSA
Reflectivity variation (%)
Time (min)
ODN + cisplatin
ODN + JM118
ODN + oxaliplatin
Undamaged ODN

Table captions

Table 1. Sequences of oligonucleotides utilized to construct the SPRi probes

Table 2. Proteins specifically identified with plasmidic probes damaged with cisplatin (CDDP), oxaliplatin (OxaliPt) and JM118

The list is restricted to proteins reliably identified in two distinct ligand-fishing / proteomics experiments (for more detailed lists, see supplementary Table 1). Candidates whose affinity for platinum adducts had not been shown previously are highlighted in bold.

Table 1

Target		5’-CCT CTC TGG ACC TTC C-3’
Zip probes	Zip4	5’-Py-(5T)-TGC GGG TAC AGC ACC TAC CTT GCG-3’
	Zip6	5’-Py-(5T)-GAC CGG TAT GCG ACC TGG TAT GCG-3’
	Zip7	5’-Py-(5T)-TGC GAT CGC AGC GGT AAC CTG ACC-3’
	Zip9	5’-Py-(5T)-GAC CAT CGT GCG GGT AGG TAG ACC-3’
Complementary sequences	Zip4c	5’- GGA AGG TCC AGA GAG GCG CAA GGT AGG TGC TGT ACC CGC A -3’
	Zip6c	5’- GGA AGG TCC AGA GAG GCG CAT ACC AGG TCG CAT ACC GGT C -3’
	Zip7c	5’- GGA AGG TCC AGA GAG GGG TCA GGT TAC CGC TGC GAT CGC A -3’
	Zip9c	5’- GGA AGG TCC AGA GAG GGG TCT ACC TAC CCG CAC GAT GGT C -3’

Table 2

Protein Name (Uniprot)	Entry Name (Uniprot)	Number of identified peptides (min-max)	Mascot scores (min-max)	Cisplatin S+	Cisplatin S-	Oxaliplatin S+	Oxaliplatin S-	JM118 S+	JM118 S-	Protein functions
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus ACIN1	**ACINU_HUMAN**	**2 - 3**	**103 - 156**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Component of a complex responsible for exon junction during RNA maturation**
ADP-ribosylation factor 6 ARF6	**ARF6_HUMAN**	**2 - 3**	**97 – 181**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Involved in cell motility ; essential for cytokinesis**
60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	**CH60_HUMAN**	**3 - 4**	**144 - 264**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**	**Involved in protein folding and import inside the mitochondrion**
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	**DDX46_HUMAN**	**2**	**77 - 121**	**X**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Responsible for mRNA processing (splicing)**
DNA ligase 3	DNLI3_HUMAN	2 - 7	96 - 436	-	-	X	-	X	X	DNA repair (base excision repair and double strand breaks repair)
HEATR1	**HEAT1_HUMAN**	**2 - 12**	**75 - 710**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**X**	**-**
High mobility group box 1 HMGB1	HMGB1_HUMAN	11 - 16	472 - 1168	X	X	X	X	X	X	Regulation of chromatin structure and transcription, inflammation mediator
HMGB2	HMGB2_HUMAN	3 - 11	137 - 611	X	X	X	X	X	X	Regulation of chromatin structure and transcription
HMGB3	HMGB3_HUMAN	2 - 6	92 - 389	X	X	X	-	-	-	DNA binding and unwinding
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 IF2a	**IF2A_HUMAN**	**2 - 3**	**83 - 120**	**-**	**-**	**-**	**X**	**X**	**-**	**Translation initiation**
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 IF2b	**IF2B_HUMAN**	**2 - 3**	**96 - 178**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**	
Ras GTPase-activating-like protein IQGA1	**IQGA1_HUMAN**	**2 - 4**	**95 - 246**	**X**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Potentially involved in cytoskeleton reorganization**

Leucine-rich repeat-containing protein 40 LRRC40	LRC40_HUMAN	2	87 - 95	-	-	X	-	-	-	-
Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 MDC1	MDC1_HUMAN	2 - 4	99 - 208	-	-	X	-	-	-	Recruited at site of double-strand breaks (DSB) ; required for DNA damage checkpoint (S phase and G_2/M transition)
Metastasis-associated protein MTA2	MTA2_HUMAN	2	80 - 136	-	-	X	-	-	-	Transcription repression via chromatin reomdeling and histone deacetylation
Nucleolar protein 11 NOL11	NOL11_HUMAN	2 - 4	99 - 176	-	-	X	-	-	-	-
Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2/NOL1	NOP2_HUMAN	2 - 3	90 - 226	-	-	-	-	X	-	-
Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein PICALM	PICAL_HUMAN	2 - 5	93 - 253	X	-	X	-	X	-	Mediates clathrin-vesicle assembly
Pinin	PININ_HUMAN	2	80 - 92	-	-	X	-	-	-	Transcriptional activator of the E-cadherin gene
Serine/threonine-protein phosphatase 1 subunit 10 PNUTS	PP1RA_HUMAN	2 - 12	90 - 653	X	X	X	X	X	X	Phosphatases inhibition, regulation of cell proliferation and apoptosis
PC4 and SFRS1-interacting protein PSIP1	PSIP1_HUMAN	2 - 3	120 -162	-	-	X	-	-	-	Transcriptional coactivator involved in neuroepithelial stem cell differentiation and neurogenesis
Telomere-associated protein RIF1	RIF1_HUMAN	2 - 8	103 – 583	X	-	-	-	X	X	Negative regulator of telomere elongation ; prevents replication in presence of DSB
U2 small nuclear ribonucleoprotein A' SNRPA1	RU2A_HUMAN	2	89 – 96	-	-	X	-	-	-	-
RuvB-like 2 RUVBL2 (reptin)	RUVB2_HUMAN	2 - 4	83 - 260	-	-	-	-	X	-	Activator of ATM-mediated DNA damage checkpoint ; chromatin

										remodelling (member of the TIP60/NuA4 complex)
Septin-2	**SEPT2_HUMAN**	**2 - 5**	**98 - 281**	**-**	**X**	**-**	**X**	**-**	**X**	**Cytoskeleton organization**
Structural maintenance of chromosomes protein 3 SMC3	**SMC3_HUMAN**	**2 - 7**	**92 - 397**	**X**	**-**	**-**	**X**	**X**	**X**	**Involved in chromosome cohesion during cell cycle and in DNA repair**
Transcription activator BRG1	SMCA4_HUMAN	2	76 – 157	X	-	-	-	X	-	Transcriptional activator
SMARCA5	**SMCA5_HUMAN**	**2 - 3**	**106 - 140**	**-**	**-**	**-**	**-**	**X**	**-**	**Helicase with nucleosome-remodeling activity**
Chromatin-specific transcription elongation factor SPT16	SP16H_HUMAN	6 - 18	403 - 1292	X	X	X	X	X	X	Nucleosome reorganization
Signal recognition particle 68 kDa protein SRP68	**SRP68_HUMAN**	**2 - 5**	**85 - 278**	**X**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**	Targets secretory proteins to the rough endoplasmic reticulum membrane
Structure-specific recognition protein 1 SSRP1	SSRP1_HUMAN	5 - 12	254 - 625	X	X	X	X	X	X	Nucleosome reorganization
Telomeric repeat-binding factor 2 TRF2	**TERF2_HUMAN**	**2 - 5**	**129 - 254**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**-**	**Responsible for protection of telomeres**
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1 TLK1	**TLK1_HUMAN**	**2**	**92 - 113**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**	**Involved in nucleosome sliding, chromatine remodeling and DNA repair**
TOX high mobility group box family member 4 TOX4	**TOX4_HUMAN**	**2 - 6**	**111 - 381**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**-**	**Transcription activator ; involved in thymocytes differentiation**
Human upstream binding factor hUBF	UBF1_HUMAN	6 - 22	340 - 1264	X	X	X	X	X	X	Ribosomal RNA transcription factor
WD repeat-containing protein 82 WDR82	**WDR82_HUMAN**	**2 - 7**	**140 - 430**	**X**	**-**	**X**	**-**	**-**	**X**	**Histone methylation**
X-ray repair cross-complementing protein 6 / Ku70	XRCC6_HUMAN	2	73 - 92	X	-	-	-	-	-	Helicase activity ; involved in chromosome translocation and double-strand break repair
Zinc finger protein 638 ZN638	**ZN638_HUMAN**	**2 – 3**	**104 – 153**	**-**	**-**	**X**	**-**	**-**	**-**	**Binds to cytidine clusters in double-stranded DNA**

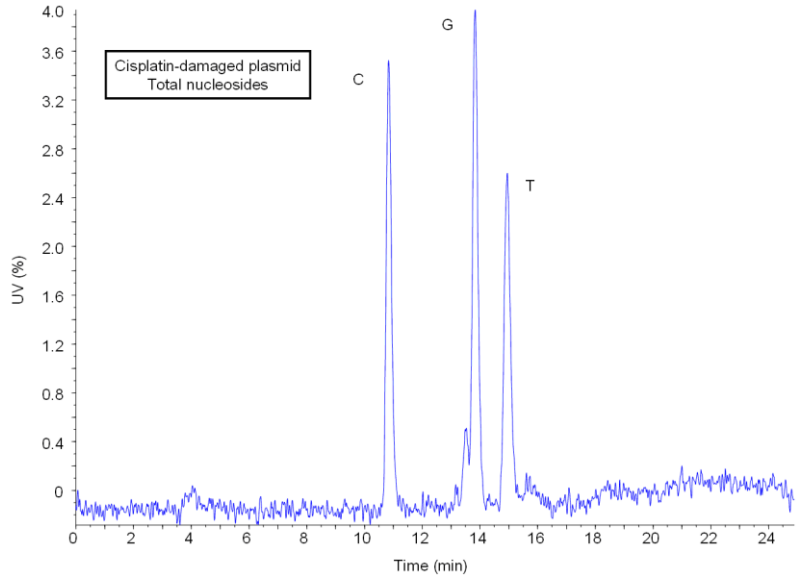
Supplementary information

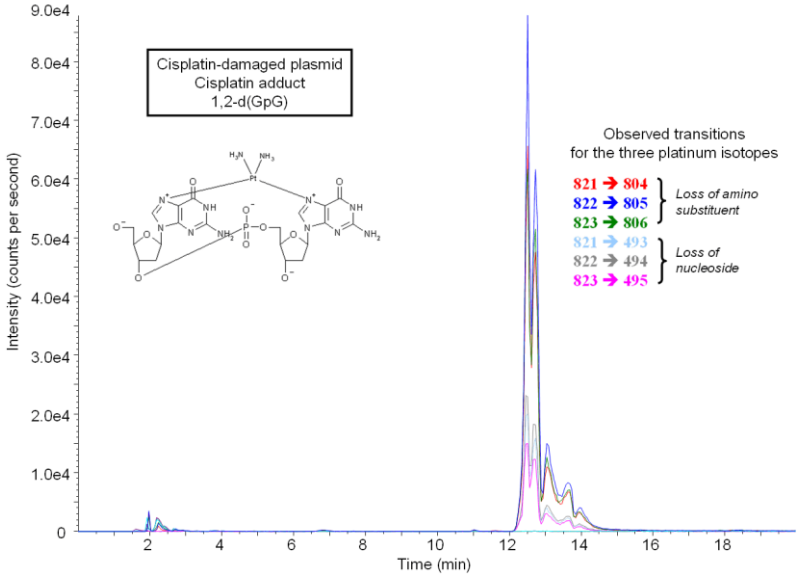
Fig. S1. HPLC UV chromatograms (normal nucleosides) and mass spectra (platinum adducts) obtained during the characterization of the plasmid probes damaged by cisplatin, oxaliplatin, JM118 or UVC radiations.

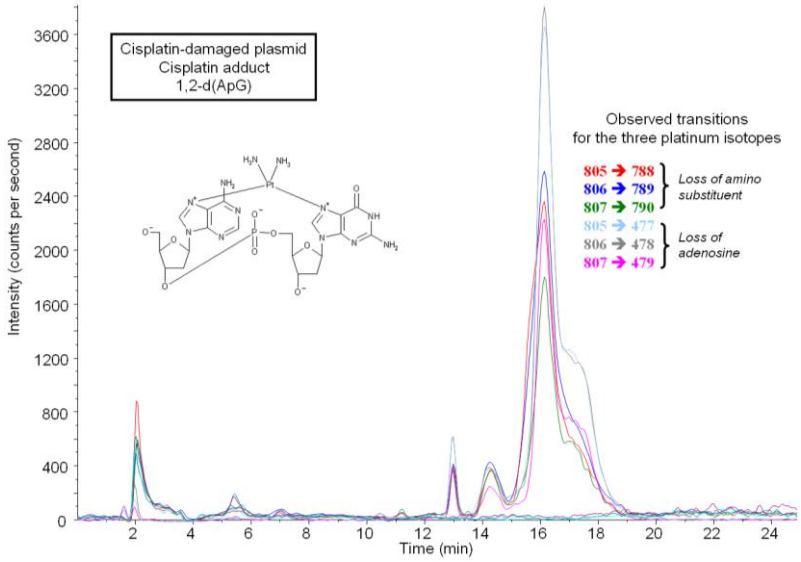
Fig. S2. (A) TOX4 and PNUTS are captured by the probes independently of the presence of thio-dNTPs ; (B) Presence of HMGB1 onto the probes is reduced when increasing wash stringency.

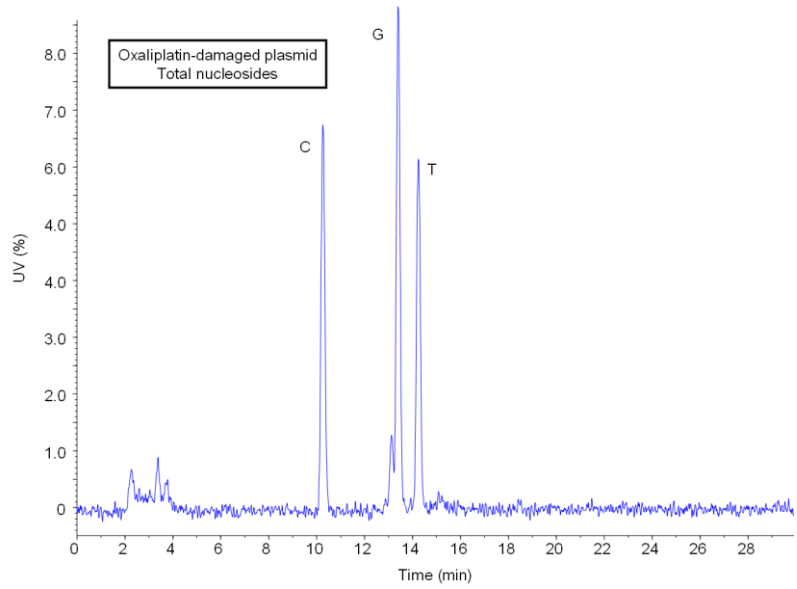
Table S1. This table is providing the details of proteomics results. These data are useful to check the validity of protein identification and to screen the wide panel of proteins which have been identified in all conditions tested but not retained for discussion in the main paper.

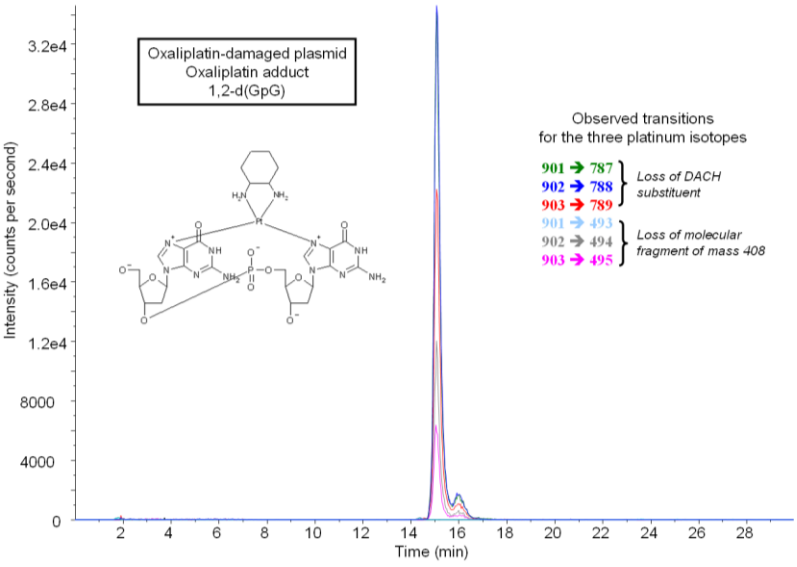
Figure S1

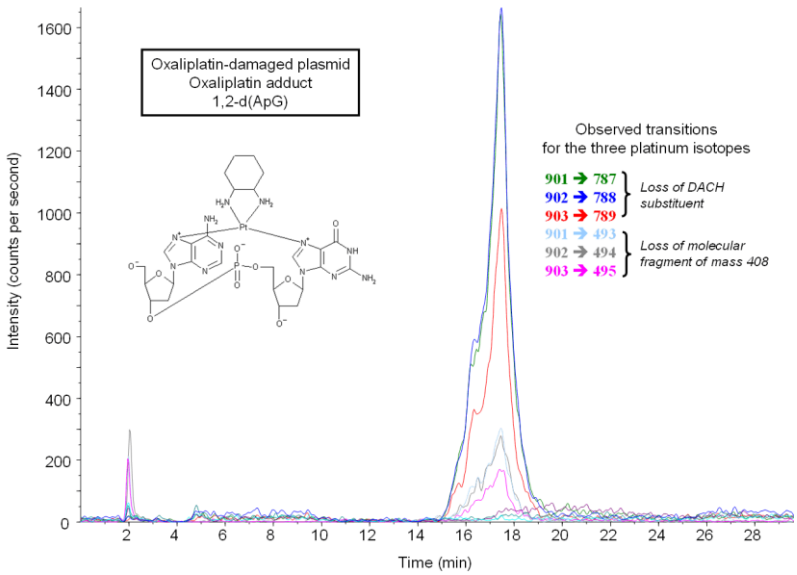

Cisplatin-damaged plasmid
Total nucleosides
C
G
T
UV (%)
Time (min)

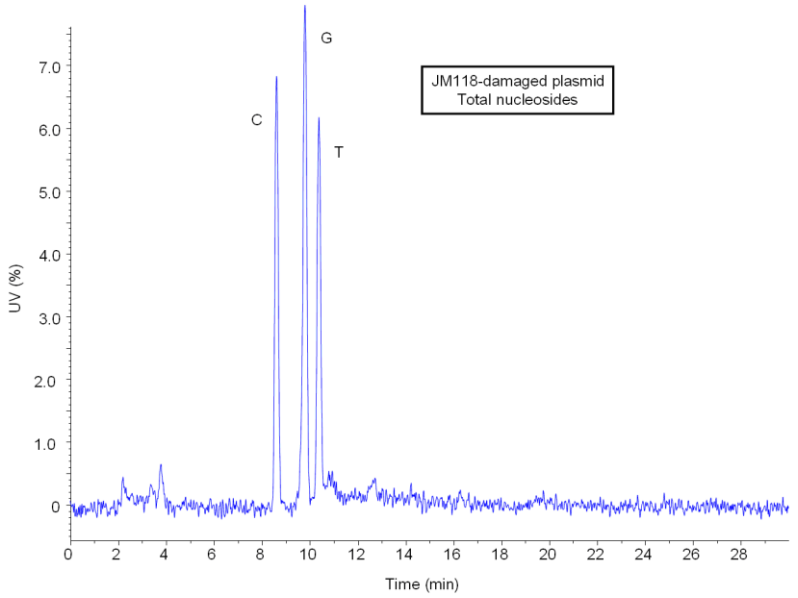

Cisplatin-damaged plasmid
Cisplatin adduct
1,2-d(GpG)
Observed transitions
for the three platinum isotopes
821 → 804
822 → 805
823 → 806
Loss of amino substituent
821 → 493
822 → 494
823 → 495
Loss of nucleoside
Intensity (counts per second)
Time (min)

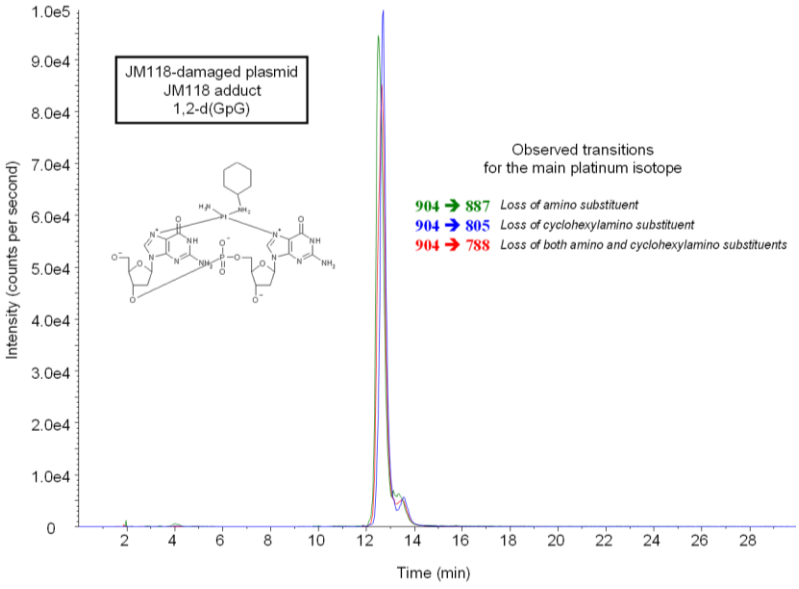

Cisplatin-damaged plasmid
Cisplatin adduct
1,2-d(ApG)
Observed transitions
for the three platinum isotopes
805 → 788
806 → 789
807 → 790
Loss of amino substituent
805 → 477
806 → 478
807 → 479
Loss of adenosine
Intensity (counts per second)
Time (min)

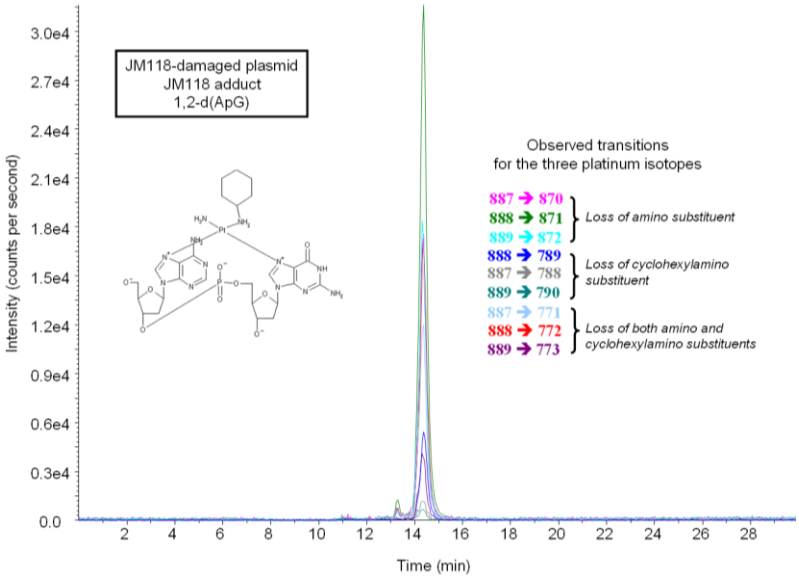

Oxaliplatin-damaged plasmid
Total nucleosides
G
C
T
UV (%)
Time (min)

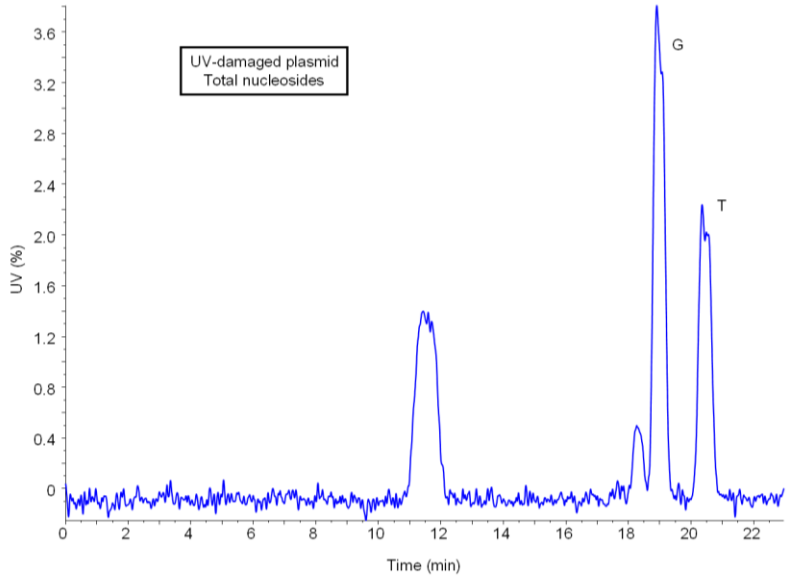

Oxaliplatin-damaged plasmid
Oxaliplatin adduct
1,2-d(GpG)
Observed transitions
for the three platinum isotopes
901 → 787
902 → 788
903 → 789
Loss of DACH substituent
901 → 493
902 → 494
903 → 495
Loss of molecular fragment of mass 408
Intensity (counts per second)
Time (min)


Oxaliplatin-damaged plasmid
Oxaliplatin adduct
1,2-d(ApG)
Observed transitions
for the three platinum isotopes
901 → 787
902 → 788
903 → 789
Loss of DACH substituent
901 → 493
902 → 494
903 → 495
Loss of molecular fragment of mass 408
Intensity (counts per second)
Time (min)


JM118-damaged plasmid
Total nucleosides
C
G
T
UV (%)
Time (min)


JM118-damaged plasmid
JM118 adduct
1,2-d(GpG)
Observed transitions
for the main platinum isotope
904 → 887 Loss of amino substituent
904 → 805 Loss of cyclohexylamino substituent
904 → 788 Loss of both amino and cyclohexylamino substituents
Intensity (counts per second)
Time (min)


JM118-damaged plasmid
JM118 adduct
1,2-d(ApG)
Observed transitions
for the three platinum isotopes
887 → 870
888 → 871
889 → 872
Loss of amino substituent
888 → 789
887 → 788
889 → 790
Loss of cyclohexylamino substituent
887 → 771
888 → 772
889 → 773
Loss of both amino and cyclohexylamino substituents
Intensity (counts per second)
Time (min)


UV-damaged plasmid
Total nucleosides
G
T
UV (%)
Time (min)

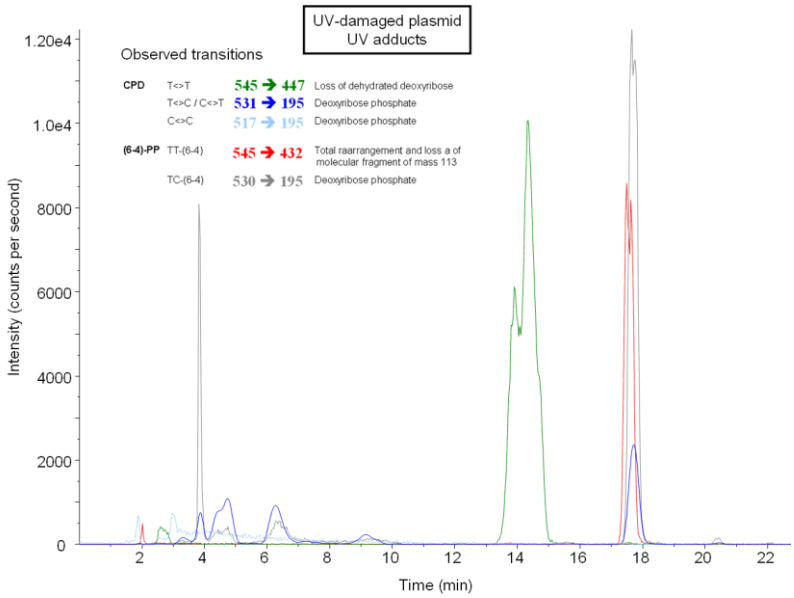
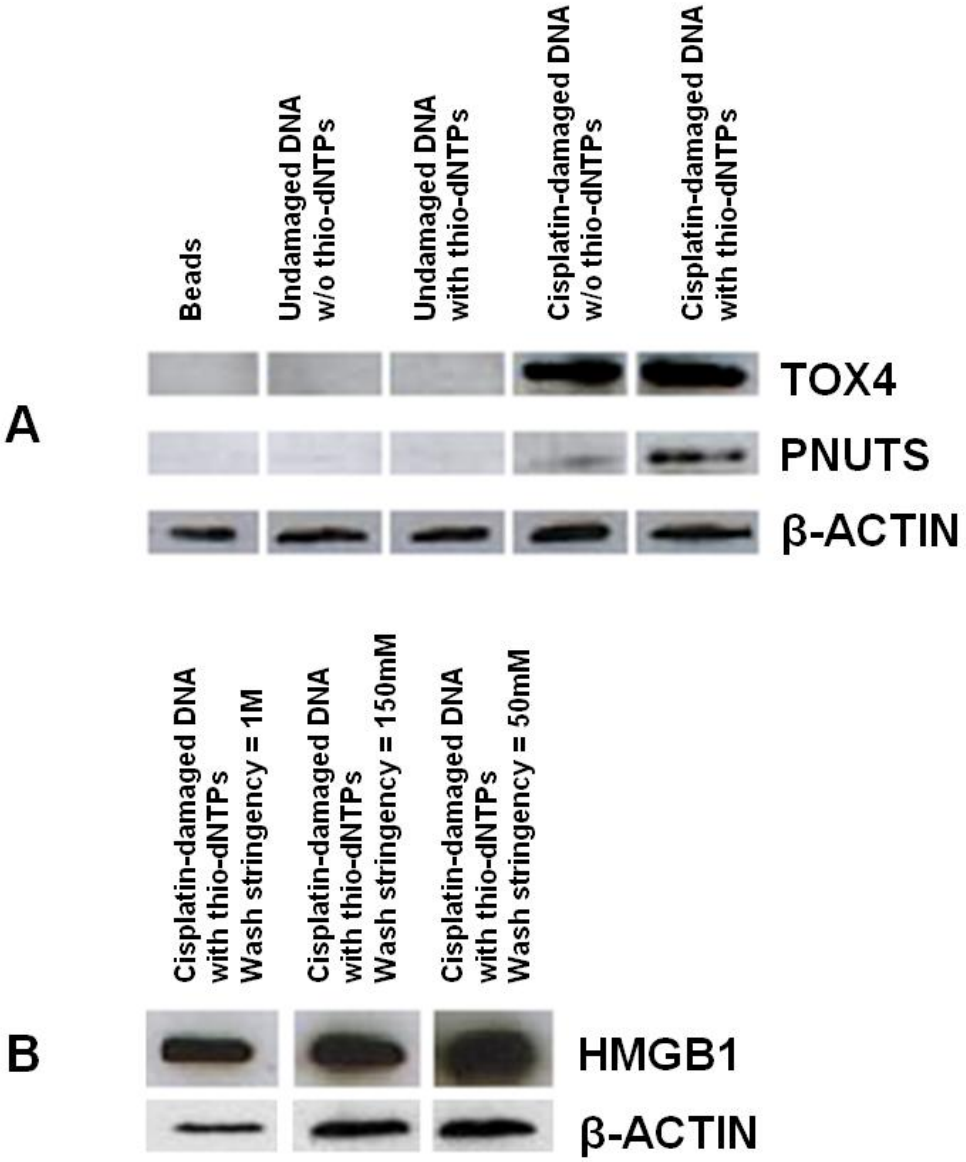

UV-damaged plasmid
UV adducts
Observed transitions
CPD T<>T 545 → 447 Loss of dehydrated deoxyribose
T<>C / C<>T 531 → 195 Deoxyribose phosphate
C<>C 517 → 195 Deoxyribose phosphate
(6-4)-PP TT-(6-4) 545 → 432 Total raarrangement and loss a of molecular fragment of mass 113
TC-(6-4) 530 → 195 Deoxyribose phosphate
Intensity (counts per second)
Time (min)

Figure S2


A
Beads
Undamaged DNA w/o thio-dNTPs
Undamaged DNA with thio-dNTPs
Cisplatin-damaged DNA w/o thio-dNTPs
Cisplatin-damaged DNA with thio-dNTPs
TOX4
PNUTS
β-ACTIN
B
Cisplatin-damaged DNA with thio-dNTPs Wash stringency = 1M
Cisplatin-damaged DNA with thio-dNTPs Wash stringency = 150mM
Cisplatin-damaged DNA with thio-dNTPs Wash stringency = 50mM
HMGB1
β-ACTIN

BIBLIOGRAPHIE

ADHIKARI, S., KENNEL, S. J., ROY, G., MITRA, P. S., MITRA, S. & ROY, R. (2008). Discrimination of lesion removal of N-methylpurine-DNA glycosylase revealed by a potent neutralizing monoclonal antibody. *DNA Repair (Amst)* **7,** 31-39.

ADHIKARI, S., UREN, A. & ROY, R. (2009). Excised damaged base determines the turnover of human N-methylpurine-DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* **8,** 1201-1206.

ADIMOOLAM, S. & FORD, J. M. (2003). p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* **2,** 947-954.

AEBI, S., KURDIHAIDAR, B., GORDON, R., CENNI, B., ZHENG, H., FINK, D., CHRISTEN, R. D., BOLAND, C. R., KOI, M., FISHEL, R. & HOWELL, S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Research* **56,** 3087-3090.

AJIMA, K., MURAKAMI, T., MIZOGUCHI, Y., TSUCHIDA, K., ICHIHASHI, T., IIJIMA, S. & YUDASAKA, M. (2008). Enhancement of in vivo anticancer effects of cisplatin by incorporation inside single-wall carbon nanohorns. *ACS Nano* **2,** 2057-2064.

ALDERDEN, R. A., HALL, M. D. & HAMBLEY, T. W. (2006). The Discovery and Development of Cisplatin. *Journal of Chemical Education* **83,** 728.

ALLEN, P. B., KWON, Y. G., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. (1998). Isolation and characterization of PNUTS, a putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit. *J Biol Chem* **273,** 4089-4095.

ALT, A., LAMMENS, K., CHIOCCHINI, C., LAMMENS, A., PIECK, J. C., KUCH, D., HOPFNER, K. P. & CARELL, T. (2007). Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta. *Science* **318,** 967-970.

AMORINO, G. P., FREEMAN, M. L., CARBONE, D. P., LEBWOHL, D. E. & CHOY, H. (1999). Radiopotentiation by the oral platinum agent, JM216: role of repair inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **44,** 399-405.

ANDREWS, P. A., SCHIEFER, M. A., MURPHY, M. P. & HOWELL, S. B. (1988). Enhanced potentiation of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by prolonged glutathione depletion. *Chemico-Biological Interactions* **65,** 51-58.

ANG, W. H., KHALAILA, I., ALLARDYCE, C. S., JUILLERAT-JEANNERET, L. & DYSON, P. J. (2005). Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance. *J Am Chem Soc* **127,** 1382-1383.

ANTONARAKIS, E. S. & EMADI, A. (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol* **66,** 1-9.

ARNESANO, F. & NATILE, G. (2009). Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews* **253,** 2070-2081.

ARORA, S., KOTHANDAPANI, A., TILLISON, K., KALMAN-MALTESE, V. & PATRICK, S. M. (2010). Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* **9,** 745-753.

ATAIAN, Y. & KREBS, J. E. (2006). Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. *Biochem Cell Biol* **84,** 490-504.

BAGCHI, S. & RAYCHAUDHURI, P. (2010). Damaged-DNA Binding Protein-2 Drives Apoptosis Following DNA Damage. *Cell Div* **5,** 3.

BANCROFT, D. P., LEPRE, C. A. & LIPPARD, S. J. (1990). Pt-195 Nmr Kinetic and Mechanistic Studies of Cis-Diamminedichloroplatinum and Trans-Diamminedichloroplatinum(Ii) Binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society* **112,** 6860-6871.

BARAKAT, B. M., WANG, Q. E., HAN, C., MILUM, K., YIN, D. T., ZHAO, Q., WANI, G., ARAFA, E. S., EL-MAHDY, M. A. & WANI, A. A. (2009). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int J Cancer* **127,** 977-988.

BARNES, K. R., KUTIKOV, A. & LIPPARD, S. J. (2004). Synthesis, characterization, and cytotoxicity of a series of estrogen-tethered platinum(IV) complexes. *Chem Biol* **11,** 557-564.

BARTEK, J., IGGO, R., GANNON, J. & LANE, D. P. (1990). Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene* **5,** 893-899.

BAUER, A., CHAUVET, S., HUBER, O., USSEGLIO, F., ROTHBACHER, U., ARAGNOL, D., KEMLER, R. & PRADEL, J. (2000). Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J* **19,** 6121-6130.

BELL, D. N., LIU, J. J., TINGLE, M. D., RATTEL, B., MEYER, T. U. & MCKEAGE, M. J. (2008). Comparative protein binding, stability and degradation of satraplatin, JM118 and cisplatin in human plasma in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **35,** 1440-1446.

BERNAY, B., GAILLARD, M. C., GURYCA, V., EMADALI, A., KUHN, L., BERTRAND, A., DETRAZ, I., CARCENAC, C., SAVASTA, M., BROUILLET, E., GARIN, J. & ELALOUF, J. M. (2009). Discovering new bioactive neuropeptides in the striatum secretome using in vivo microdialysis and versatile proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8,** 946-958.

BIANCHI, M. E. & MANFREDI, A. A. (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* **220,** 35-46.

BIER, H. (1991). Circumvention of drug resistance in cisplatin-resistant sublines of the human squamous carcinoma cell line HLac 79 in vitro and in vivo. *Acta Otolaryngol* **111,** 797-806.

BILLINGS, P. C., DAVIS, R. J., ENGELSBERG, B. N., SKOV, K. A. & HUGHES, E. N. (1992). Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **188,** 1286-1294.

BINKS, S. P. & DOBROTA, M. (1990). Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol* **40,** 1329-1336.

BLOEMINK, M. J. & REEDIJK, J. (1996). Cisplatin and derived anticancer drugs: mechanism and current status of DNA binding. *Met Ions Biol Syst* **32,** 641-685.

BLOMMAERT, F. A., VAN DIJK-KNIJNENBURG, H. C., DIJT, F. J., DEN ENGELSE, L., BAAN, R. A., BERENDS, F. & FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M. (1995). Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells. *Biochemistry* **34,** 8474-8480.

BODNAR, A. G., OUELLETTE, M., FROLKIS, M., HOLT, S. E., CHIU, C. P., MORIN, G. B., HARLEY, C. B., SHAY, J. W., LICHTSTEINER, S. & WRIGHT, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279,** 349-352.

BOISDRON-CELLE, M., LEBOUIL, A., ALLAIN, P. & GAMELIN, E. (2001). Pharmacokinetic properties of platinium derivatives. *Bull Cancer* **88,** S14-19.

BOOTH, V., KOTH, C. M., EDWARDS, A. M. & ARROWSMITH, C. H. (2000). Structure of a conserved domain common to the transcription factors TFIIS, elongin A, and CRSP70. *J Biol Chem* **275,** 31266-31268.

BROCCOLI, D., SMOGORZEWSKA, A., CHONG, L. & DE LANGE, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17,** 231-235.

BRUHN, S. L., PIL, P. M., ESSIGMANN, J. M., HOUSMAN, D. E. & LIPPARD, S. J. (1992). Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89,** 2307-2311.

BUIJS, J. & FRANKLIN, G. C. (2005). SPR-MS in functional proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* **4,** 39-47.

BUONOMO, S. B., WU, Y., FERGUSON, D. & DE LANGE, T. (2009). Mammalian Rif1 contributes to replication stress survival and homology-directed repair. *J Cell Biol* **187,** 385-398.

BURGER, H., ZOUMARO-DJAYOON, A., BOERSMA, A. W., HELLEMAN, J., BERNS, E. M., MATHIJSSEN, R. H., LOOS, W. J. & WIEMER, E. A. (2010). Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br J Pharmacol* **159,** 898-908.

BURNOUF, D., GAUTHIER, C., CHOTTARD, J. C. & FUCHS, R. P. (1990). Single d(ApG)/cis-diamminedichloroplatinum(II) adduct-induced mutagenesis in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87,** 6087-6091.

CALDECOTT, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* **9,** 619-631.

CHANG, I. Y., KIM, M. H., KIM, H. B., LEE, D. Y., KIM, S. H., KIM, H. Y. & YOU, H. J. (2005). Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* **327,** 225-233.

CHAO, C. C., HUANG, S. L., HUANG, H. M. & LIN-CHAO, S. (1991). Cross-resistance to UV radiation of a cisplatin-resistant human cell line: overexpression of cellular factors that recognize UV-modified DNA. *Mol Cell Biol* **11,** 2075-2080.

CHEN, C. S., KOROBKOVA, E., CHEN, H., ZHU, J., JIAN, X., TAO, S. C., HE, C. & ZHU, H. (2008). A proteome chip approach reveals new DNA damage recognition activities in Escherichia coli. *Nat Methods* **5,** 69-74.

CHENG, F., HOU, J., CHEN, Y. Y., ZHOU, Y., ZHANG, H. T., BI, L. J. & ZHANG, X. E. (2010). Functional interaction between MutL and 3'-5' Exonuclease X in Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys***,** in press.

CHENG, K., PENG, S., XU, C. & SUN, S. (2009). Porous hollow Fe(3)O(4) nanoparticles for targeted delivery and controlled release of cisplatin. *J Am Chem Soc* **131,** 10637-10644.

CHO, H. J., KIM, J. K., KIM, K. D., YOON, H. K., CHO, M. Y., PARK, Y. P., JEON, J. H., LEE, E. S., BYUN, S. S., LIM, H. M., SONG, E. Y., LIM, J. S., YOON, D. Y., LEE, H. G. & CHOE, Y. K. (2006). Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* **237,** 56-66.

CHOW, C. S., WHITEHEAD, J. P. & LIPPARD, S. J. (1994). HMG domain proteins induce sharp bends in cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* **33,** 15124-15130.

CHU, G. & CHANG, E. (1988). Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* **242,** 564-567.

CHU, G. & CHANG, E. (1990). Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87,** 3324-3327.

CHU, G. & YANG, W. (2008). Here comes the sun: recognition of UV-damaged DNA. *Cell* **135**, 1172-1174.

CHVALOVA, K., SARI, M. A., BOMBARD, S. & KOZELKA, J. (2008). LEF-1 recognition of platinated GG sequences within double-stranded DNA. Influence of flanking bases. *J Inorg Biochem* **102,** 242-250.

CITTERIO, E., VAN DEN BOOM, V., SCHNITZLER, G., KANAAR, R., BONTE, E., KINGSTON, R. E., HOEIJMAKERS, J. H. & VERMEULEN, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* **20,** 7643-7653.

CLUGSTON, C. K., MCLAUGHLIN, K., KENNY, M. K. & BROWN, R. (1992). Binding of human single-stranded DNA binding protein to DNA damaged by the anticancer drug cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* **52,** 6375-6379.

COHEN, S. M., JAMIESON, E. R. & LIPPARD, S. J. (2000). Enhanced binding of the TATA-binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2-cross-links. *Biochemistry* **39,** 8259-8265.

COIN, F., FRIT, P., VIOLLET, B., SALLES, B. & EGLY, J. M. (1998). TATA binding protein discriminates between different lesions on DNA, resulting in a transcription decrease. *Mol Cell Biol* **18,** 3907-3914.

COLEY, H. M., SARJU, J. & WAGNER, G. (2008). Synthesis and characterization of platinum(II) oxadiazoline complexes and their in vitro antitumor activity in platinum-sensitive and -resistant cancer cell lines. *J Med Chem* **51,** 135-141.

CORNE, C., FICHE, J. B., GASPARUTTO, D., CUNIN, V., SURANITI, E., BUHOT, A., FUCHS, J., CALEMCZUK, R., LIVACHE, T. & FAVIER, A. (2008). SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes. *Analyst* **133,** 1036-1045.

CRUL, M., VAN WAARDENBURG, R. C., BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. (2002). DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat Rev* **28,** 291-303.

CULLEN, K. J., YANG, Z., SCHUMAKER, L. & GUO, Z. (2007). Mitochondria as a critical target of the chemotheraputic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr* **39,** 43-50.

D'AGOSTINO, V. G., MINOPRIO, A., TORRERI, P., MARINONI, I., BOSSA, C., PETRUCCI, T. C., ALBERTINI, A. M., RANZANI, G. N., BIGNAMI, M. & MAZZEI, F. (2010). Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. *DNA Repair (Amst)* **9,** 700-707.

DABHOLKAR, M., BOSTICK-BRUTON, F., WEBER, C., BOHR, V. A., EGWUAGU, C. & REED, E. (1992). ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **84,** 1512-1517.

DAMSMA, G. E., ALT, A., BRUECKNER, F., CARELL, T. & CRAMER, P. (2007). Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nat Struct Mol Biol* **14,** 1127-1133.

DANFORD, A. J., WANG, D., WANG, Q., TULLIUS, T. D. & LIPPARD, S. J. (2005). Platinum anticancer drug damage enforces a particular rotational setting of DNA in nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102,** 12311-12316.

DAS, D. & SCOVELL, W. M. (2001). The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex. *Journal of Biological Chemistry* **276,** 32597-32605.

DE LEON, G., SHERRY, T. C. & KRUCHER, N. A. (2008). Reduced expression of PNUTS leads to activation of Rb-phosphatase and caspase-mediated apoptosis. *Cancer Biol Ther* **7,** 833-841.

DEN ELZEN, N. R. & O'CONNELL, M. J. (2004). Recovery from DNA damage checkpoint arrest by PP1-mediated inhibition of Chk1. *EMBO J* **23,** 908-918.

DEVARAJAN, P., SAVOCA, M., CASTANEDA, M. P., PARK, M. S., ESTEBAN-CRUCIANI, N., KALINEC, G. & KALINEC, F. (2002). Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* **174,** 45-54.

DHAR, S. & LIPPARD, S. J. (2009). Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106,** 22199-22204.

DIEHL, M. C., IDOWU, M. O., KIMMELSHUE, K. N., YORK, T. P., JACKSON-COOK, C. K., TURNER, K. C., HOLT, S. E. & ELMORE, L. W. (2010). Elevated TRF2 in advanced breast cancers with short telomeres. *Breast Cancer Res Treat,* in press.

DIGNAM, J. D., LEBOVITZ, R. M. & ROEDER, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11,** 1475-1489.

DRAGHICI, S., KHATRI, P., EKLUND, A. C. & SZALLASI, Z. (2006). Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet* **22,** 101-109.

DUCKETT, D. R., DRUMMOND, J. T., MURCHIE, A. I., REARDON, J. T., SANCAR, A., LILLEY, D. M. & MODRICH, P. (1996). Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93,** 6443-6447.

DUPIERRIS, V., MASSELON, C., COURT, M., KIEFFER-JAQUINOD, S. & BRULEY, C. (2009). A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics* **25,** 1980-1981.

EASTMAN, A. (1990). Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* **2,** 275-280.

ECKARDT, J. R., BENTSION, D. L., LIPATOV, O. N., POLYAKOV, I. S., MACKINTOSH, F. R., KARLIN, D. A., BAKER, G. S. & BREITZ, H. B. (2009). Phase II study of picoplatin as second-line therapy for patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **27,** 2046-2051.

EINHORN, L. H. (2002). Curing metastatic testicular cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99,** 4592-4595.

FAIVRE, S., CHAN, D., SALINAS, R., WOYNAROWSKA, B. & WOYNAROWSKI, J. M. (2003). DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* **66,** 225-237.

FELDBERG, R. S. & GROSSMAN, L. (1976). A DNA binding protein from human placenta specific for ultraviolet damaged DNA. *Biochemistry* **15,** 2402-2408.

FERRY, K. V., HAMILTON, T. C. & JOHNSON, S. W. (2000). Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ercc1-xpf. *Biochemical Pharmacology* **60,** 1305-1313.

FEUERHAHN, S. & EGLY, J. M. (2008). Tools to study DNA repair: what's in the box? *Trends Genet* **24,** 467-474.

FICHE, J. B., FUCHS, J., BUHOT, A., CALEMCZUK, R. & LIVACHE, T. (2008). Point mutation detection by surface plasmon resonance imaging coupled with a temperature scan method in a model system. *Anal Chem* **80,** 1049-1057.

FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M., VAN DER VEER, J. L., DEN HARTOG, J. H., LOHMAN, P. H. & REEDIJK, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **24,** 707-713.

FINK, D., NEBEL, S., AEBI, S., ZHENG, H., CENNI, B., NEHME, A., CHRISTEN, R. D. & HOWELL, S. B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* **56,** 4881-4886.

FISCHER, S. J., BENSON, L. M., FAUQ, A., NAYLOR, S. & WINDEBANK, A. J. (2008). Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. *Neurotoxicology* **29,** 444-452.

FISHER, R. P. & CLAYTON, D. A. (1988). Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol Cell Biol* **8,** 3496-3509.

FITCH, M. E., CROSS, I. V., TURNER, S. J., ADIMOOLAM, S., LIN, C. X., WILLIAMS, K. G. & FORD, J. M. (2003a). The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* **2,** 819-826.

FITCH, M. E., NAKAJIMA, S., YASUI, A. & FORD, J. M. (2003b). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* **278,** 46906-46910.

FORD, J. M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53. *Mutat Res* **577,** 195-202.

FORDYCE, C., FESSENDEN, T., PICKERING, C., JUNG, J., SINGLA, V., BERMAN, H. & TLSTY, T. (2010). DNA damage drives an activin a-dependent induction of cyclooxygenase-2 in premalignant cells and lesions. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **3,** 190-201.

FOURRIER, L., BROOKS, P. & MALINGE, J. M. (2003). Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. *J Biol Chem* **278,** 21267-21275.

FOUSTERI, M. & MULLENDERS, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* **18,** 73-84.

FOUSTERI, M., VERMEULEN, W., VAN ZEELAND, A. A. & MULLENDERS, L. H. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* **23,** 471-482.

FRELON, S., DOUKI, T., RAVANAT, J. L., POUGET, J. P., TORNABENE, C. & CADET, J. (2000). High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* **13,** 1002-1010.

FRIED, M. & CROTHERS, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9,** 6505-6525.

FRIEDBERG, E. C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* **1,** 22-33.

FUCHS, J. (2009). Étude physico-chimique des puces à ADN : stabilité du duplex d'ADN, détection des mutations pontuelles et au-delà. In *Mémoire pour la thèse de doctorat - Ecole doctorale de Physique*. Université Joseph Fourier-Grenoble I, Grenoble.

FUERTES, M. A., ALONSO, C. & PEREZ, J. M. (2003). Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* **103,** 645-662.

FUJIWARA, Y., MASUTANI, C., MIZUKOSHI, T., KONDO, J., HANAOKA, F. & IWAI, S. (1999). Characterization of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein. *J Biol Chem* **274,** 20027-20033.

FULDA, S., LOS, M., FRIESEN, C. & DEBATIN, K. M. (1998). Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* **76,** 105-114.

GAILLARD, P. H., MARTINI, E. M., KAUFMAN, P. D., STILLMAN, B., MOUSTACCHI, E. & ALMOUZNI, G. (1996). Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell* **86,** 887-896.

GATELY, D. P. & HOWELL, S. B. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* **67,** 1171-1176.

GELASCO, A. & LIPPARD, S. J. (1998). NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* **37,** 9230-9239.

GÉRARD, A., POLO, S. E., ROCHE, D., ALMOUZNI, G., JUDITH, L. C. & PAUL, M. (2006). Methods for Studying Chromatin Assembly Coupled to DNA Repair. In *Methods in Enzymology*, vol. 409, pp. 358-374. Academic Press.

GERRY, N. P., WITOWSKI, N. E., DAY, J., HAMMER, R. P., BARANY, G. & BARANY, F. (1999). Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* **292,** 251-262.

GOMEZ, M., WU, J., SCHREIBER, V., DUNLAP, J., DANTZER, F., WANG, Y. & LIU, Y. (2006). PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* **17,** 1686-1696.

GRIFFITH, J. D., COMEAU, L., ROSENFIELD, S., STANSEL, R. M., BIANCHI, A., MOSS, H. & DE LANGE, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97,** 503-514.

GUGGENHEIM, E. R., ONDRUS, A. E., MOVASSAGHI, M. & LIPPARD, S. J. (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity facilitates the dissociation of nuclear proteins from platinum-modified DNA. *Bioorg Med Chem* **16,** 10121-10128.

GUGGENHEIM, E. R., XU, D., ZHANG, C. X., CHANG, P. V. & LIPPARD, S. J. (2009). Photoaffinity isolation and identification of proteins in cancer cell extracts that bind to platinum-modified DNA. *Chembiochem* **10,** 141-157.

GUILLONNEAU, F., GUIEYSSE, A. L., LE CAER, J. P., ROSSIER, J. & PRASEUTH, D. (2001). Selection and identification of proteins bound to DNA triple-helical structures by combination of 2D-electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **29,** 2427-2436.

GUMINSKI, A. D., BALLEINE, R. L., CHIEW, Y. E., WEBSTER, L. R., TAPNER, M., FARRELL, G. C., HARNETT, P. R. & DEFAZIO, A. (2006). MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* **100,** 239-246.

GUMINSKI, A. D., HARNETT, P. R. & DEFAZIO, A. (2002). Scientists and clinicians test their metal-back to the future with platinum compounds. *Lancet Oncol* **3,** 312-318.

GUO, C. Y., BRAUTIGAN, D. L. & LARNER, J. M. (2002). Ionizing radiation activates nuclear protein phosphatase-1 by ATM-dependent dephosphorylation. *J Biol Chem* **277,** 41756-41761.

HAH, S. S., HENDERSON, P. T. & TURTELTAUB, K. W. (2010). Towards biomarker-dependent individualized chemotherapy: exploring cell-specific differences in oxaliplatin-DNA adduct distribution using accelerator mass spectrometry. *Bioorg Med Chem Lett* **20,** 2448-2451.

HAMBLEY T.W., B.-P. S. J., DAVIES M.S., DIAKOS C.I., ER H.M., FENTON R.R., LING E.C., & E.M., R. (1998). Steric Determinants of Pt/DNA Interactions and Anticancer Activity. *Metal-Based Drugs* **5,** 10.

HAMBLEY, T. W. (1997). The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* **166,** 181-223.

HAMBLEY, T. W., BERNERS-PRICE, S. J., DAVIES, M. S., DIAKOS, C. I., ER, H. M., FENTON, R. R., LING, E. C. & REZLER, E. M. (1998). Steric Determinants of Pt/DNA Interactions and Anticancer Activity. *Met Based Drugs* **5,** 197-206.

HARDER, H. C., SMITH, R. G. & LEROY, A. F. (1976). Template primer inactivation by cis- and trans-dichlorodiammine platinum for human DNA polymerase alpha, beta, and Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase, as a mechanism of cytotoxicity. *Cancer Res* **36,** 3821-3829.

HARDY, C. F., SUSSEL, L. & SHORE, D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6,** 801-814.

HARTMAN, A. R. & FORD, J. M. (2002). BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nat Genet* **32,** 180-184.

HARTWIG, J. F. & LIPPARD, S. J. (1992). DNA binding properties of [Pt(NH3)(C6H11NH2)Cl2], a metabolite of an orally active platinum anticancer drug. *Journal of the American Chemical Society* **114,** 5646-5654.

HAYES, S., SHIYANOV, P., CHEN, X. & RAYCHAUDHURI, P. (1998). DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol Cell Biol* **18,** 240-249.

HE, Q., LIANG, C. H. & LIPPARD, S. J. (2000a). Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97,** 5768-5772.

HE, Q., OHNDORF, U. M. & LIPPARD, S. J. (2000b). Intercalating residues determine the mode of HMG1 domains A and B binding to cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* **39,** 14426-14435.

HEGARAT, N., CARDOSO, G. M., RUSCONI, F., FRANCOIS, J. C. & PRASEUTH, D. (2007). Analytical biochemistry of DNA--protein assemblies from crude cell extracts. *Nucleic Acids Res* **35,** e92.

HEGARAT, N., FRANCOIS, J. C. & PRASEUTH, D. (2008). Modern tools for identification of nucleic acid-binding proteins. *Biochimie* **90,** 1265-1272.

HEY, T., LIPPS, G. & KRAUSS, G. (2001). Binding of XPA and RPA to damaged DNA investigated by fluorescence anisotropy. *Biochemistry* **40,** 2901-2910.

HIRANO, Y., FUKUNAGA, K. & SUGIMOTO, K. (2009). Rif1 and rif2 inhibit localization of tel1 to DNA ends. *Mol Cell* **33,** 312-322.

HO, S. W., JONA, G., CHEN, C. T., JOHNSTON, M. & SNYDER, M. (2006). Linking DNA-binding proteins to their recognition sequences by using protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103,** 9940-9945.

HOFFMANN, J. S., PILLAIRE, M. J., GARCIA-ESTEFANIA, D., LAPALU, S. & VILLANI, G. (1996). In vitro bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase beta and human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase is highly mutagenic. *J Biol Chem* **271,** 15386-15392.

HOLZER, A. K., MANOREK, G. H. & HOWELL, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* **70,** 1390-1394.

HOU, X. M., ZHANG, X. H., WEI, K. J., JI, C., DOU, S. X., WANG, W. C., LI, M. & WANG, P. Y. (2009). Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic Acids Res* **37,** 1400-1410.

HOWELL, S. B., SAFAEI, R., LARSON, C. A. & SAILOR, M. J. (2010). Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* **77,** 887-894.

HROMAS, R. A., NORTH, J. A. & BURNS, C. P. (1987). Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* **36,** 197-201.

HUBER, O., MENARD, L., HAURIE, V., NICOU, A., TARAS, D. & ROSENBAUM, J. (2008). Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. *Cancer Res* **68,** 6873-6876.

HUGHES, E. N., ENGELSBERG, B. N. & BILLINGS, P. C. (1992). Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. *J Biol Chem* **267,** 13520-13527.

HWANG, B. J., FORD, J. M., HANAWALT, P. C. & CHU, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96,** 424-428.

HWANG, B. J., TOERING, S., FRANCKE, U. & CHU, G. (1998). p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity. *Mol Cell Biol* **18,** 4391-4399.

IMAMURA, T., IZUMI, H., NAGATANI, G., ISE, T., NOMOTO, M., IWAMOTO, Y. & KOHNO, K. (2001). Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem* **276,** 7534-7540.

ISACKSON, P. J., FISHBACK, J. L., BIDNEY, D. L. & REECK, G. R. (1979). Preferential affinity of high molecular weight high mobility group non-histone chromatin proteins for single-stranded DNA. *J Biol Chem* **254,** 5569-5572.

ISE, T., NAGATANI, G., IMAMURA, T., KATO, K., TAKANO, H., NOMOTO, M., IZUMI, H., OHMORI, H., OKAMOTO, T., OHGA, T., UCHIUMI, T., KUWANO, M. & KOHNO, K. (1999). Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. *Cancer Res* **59,** 342-346.

ISHIGUCHI, H., IZUMI, H., TORIGOE, T., YOSHIDA, Y., KUBOTA, H., TSUJI, S. & KOHNO, K. (2004). ZNF143 activates gene expression in response to DNA damage and binds to cisplatin-modified DNA. *Int J Cancer* **111,** 900-909.

ISHIHAMA, Y., ODA, Y., TABATA, T., SATO, T., NAGASU, T., RAPPSILBER, J. & MANN, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* **4,** 1265-1272.

JAQUINOD, M., VILLIERS, F., KIEFFER-JAQUINOD, S., HUGOUVIEUX, V., BRULEY, C., GARIN, J. & BOURGUIGNON, J. (2007). A proteomics dissection of Arabidopsis thaliana vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics* **6,** 394-412.

JASON-MOLLER, L., MURPHY, M. & BRUNO, J. (2006). Overview of Biacore systems and their applications. *Curr Protoc Protein Sci***,** Chapter 19:Unit 19.13.

JAVERI, A., HUANG, X. X., BERNERD, F., MASON, R. S. & HALLIDAY, G. M. (2008). Human 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1 protein and gene are expressed more abundantly in the superficial than basal layer of human epidermis. *DNA Repair* **7,** 1542-1550.

JAYARAMAN, L., MOORTHY, N. C., MURTHY, K. G., MANLEY, J. L., BUSTIN, M. & PRIVES, C. (1998). High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* **12,** 462-472.

JHA, S. & DUTTA, A. (2009). RVB1/RVB2: Running Rings around Molecular Biology. *Molecular Cell* **34,** 521-533.

JI, Y., ZHANG, P., LU, Y. & MA, D. (2006). Expression of MTA2 gene in ovarian epithelial cancer and its clinical implication. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **26,** 359-362.

JIANG, C. C., MAO, Z. G., AVERY-KIEJDA, K. A., WADE, M., HERSEY, P. & ZHANG, X. D. (2009). Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* **30,** 197-204.

JONES, C. J. & WOOD, R. D. (1993). Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* **32,** 12096-12104.

JONSSON, U., FAGERSTAM, L., IVARSSON, B., JOHNSSON, B., KARLSSON, R., LUNDH, K., LOFAS, S., PERSSON, B., ROOS, H., RONNBERG, I. & ET AL. (1991). Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* **11,** 620-627.

JORGENSEN, T. J., CHEN, K., CHASOVSKIKH, S., ROY, R., DRITSCHILO, A. & UREN, A. (2009). Binding kinetics and activity of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 on oligo-deoxyribonucleotide substrates. *J Mol Recognit* **22,** 446-452.

JUNG, Y., LEE, S., BANG, S., KIM, S., CHOI, K., LEE, C., LEE, S. G., KIM, C. J., SONG, K. & LEE, I. (2004). TRF2 is in neuroglial cytoplasm and induces neurite-like processes. *FEBS Lett* **557,** 129-132.

JUNG, Y. & LIPPARD, S. J. (2006). RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled polymerase. *J Biol Chem* **281,** 1361-1370.

JUNG, Y. & LIPPARD, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* **107,** 1387-1407.

JUNG, Y., MIKATA, Y. & LIPPARD, S. J. (2001). Kinetic studies of the TATA-binding protein interaction with cisplatin-modified DNA. *J Biol Chem* **276,** 43589-43596.

KAMENSEK, U., SERSA, G., VIDIC, S., TEVZ, G., KRANJC, S. & CEMAZAR, M. (2010). Irradiation, Cisplatin, and 5-Azacytidine Upregulate Cytomegalovirus Promoter in Tumors and Muscles: Implementation of Non-invasive Fluorescence Imaging. *Mol Imaging Biol***,** in press.

KARTALOU, M. & ESSIGMANN, J. M. (2001a). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* **478,** 23-43.

KARTALOU, M. & ESSIGMANN, J. M. (2001b). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* **478,** 1-21.

KARTALOU, M., SAMSON, L. D. & ESSIGMANN, J. M. (2000). Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* **39,** 8032-8038.

KASPARKOVA, J. & BRABEC, V. (1995). Recognition of DNA interstrand cross-links of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer by DNA-binding proteins. *Biochemistry* **34,** 12379-12387.

KASPARKOVA, J., POSPISILOVA, S. & BRABEC, V. (2001). Different recognition of DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer by tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* **276,** 16064-16069.

KATAYAMA, H., SASAI, K., KAWAI, H., YUAN, Z. M., BONDARUK, J., SUZUKI, F., FUJII, S., ARLINGHAUS, R. B., CZERNIAK, B. A. & SEN, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* **36,** 55-62.

KATTAN, Z., MARCHAL, S., BRUNNER, E., RAMACCI, C., LEROUX, A., MERLIN, J. L., DOMENJOUD, L., DAUCA, M. & BECUWE, P. (2008). Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS One* **3,** e2002.

KAZANTSEV, A., MU, D., NICHOLS, A. F., ZHAO, X., LINN, S. & SANCAR, A. (1996). Functional complementation of xeroderma pigmentosum complementation group E by replication protein A in an in vitro system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93,** 5014-5018.

KEENEY, S., EKER, A. P., BRODY, T., VERMEULEN, W., BOOTSMA, D., HOEIJMAKERS, J. H. & LINN, S. (1994). Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damage-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 4053-4056.

KELLAND, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7,** 573-584.

KIDANI, A., IZUMI, H., YOSHIDA, Y., KASHIWAGI, E., OHMORI, H., TANAKA, T., KUWANO, M. & KOHNO, K. (2009). Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction. *Int J Oncol* **35,** 1435-1440.

KIM, H., LEE, O. H., XIN, H., CHEN, L. Y., QIN, J., CHAE, H. K., LIN, S. Y., SAFARI, A., LIU, D. & SONGYANG, Z. (2009). TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat Struct Mol Biol* **16,** 372-379.

KIM, J. K., PATEL, D. & CHOI, B. S. (1995). Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* **62,** 44-50.

KOBAYASHI, S., FURUKAWA, M., DOHI, C., HAMASHIMA, H., ARAI, T. & TANAKA, A. (1999). Topology effect for DNA structure of cisplatin: topological transformation of cisplatin-closed circular DNA adducts by DNA topoisomerase I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **47,** 783-790.

KOSTOVA, N., ZLATEVA, S., UGRINOVA, I. & PASHEVA, E. (2010). The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors. *Mol Cell Biochem* **337,** 251-258.

KREIVI, J. P., TRINKLE-MULCAHY, L., LYON, C. E., MORRICE, N. A., COHEN, P. & LAMOND, A. I. (1997). Purification and characterisation of p99, a nuclear modulator of protein phosphatase 1 activity. *FEBS Lett* **420,** 57-62.

KUNZ, C., SAITO, Y. & SCHAR, P. (2009). DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci* **66,** 1021-1038.

KURAOKA, I., KOBERTZ, W. R., ARIZA, R. R., BIGGERSTAFF, M., ESSIGMANN, J. M. & WOOD, R. D. (2000). Repair of an interstrand DNA cross-link initiated by ERCC1-XPF repair/recombination nuclease. *J Biol Chem* **275,** 26632-26636.

KUWAHARA, A., YAMAMORI, M., NISHIGUCHI, K., OKUNO, T., CHAYAHARA, N., MIKI, I., TAMURA, T., INOKUMA, T., TAKEMOTO, Y., NAKAMURA, T., KATAOKA, K. & SAKAEDA, T. (2009). Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Medical Sciences* **6,** 305-311.

LAADEM, A. & CVITKOVIC, E. (2001). Oxaliplatin: a first DACH-platinum in oncology. *Bull Cancer* **88,** S9-13.

LANDSVERK, H. B., KIRKHUS, M., BOLLEN, M., KUNTZIGER, T. & COLLAS, P. (2005). PNUTS enhances in vitro chromosome decondensation in a PP1-dependent manner. *Biochem J* **390,** 709-717.

LANGE, S. S., MITCHELL, D. L. & VASQUEZ, K. M. (2008). High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105,** 10320-10325.

LANGE, S. S. & VASQUEZ, K. M. (2009). HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Carcinog* **48,** 571-580.

LANSIAUX, A. & BAILLY, C. (2000). [JM216, an orally active platine derivative]. *Bull Cancer* **87,** 531-536.

LARSSON, N. G., WANG, J., WILHELMSSON, H., OLDFORS, A., RUSTIN, P., LEWANDOSKI, M., BARSH, G. S. & CLAYTON, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18,** 231-236.

LEE, J. H. & SKALNIK, D. G. (2008). Wdr82 is a C-terminal domain-binding protein that recruits the Setd1A Histone H3-Lys4 methyltransferase complex to transcription start sites of transcribed human genes. *Mol Cell Biol* **28,** 609-618.

LEE, J. H., TATE, C. M., YOU, J. S. & SKALNIK, D. G. (2007). Identification and characterization of the human Set1B histone H3-Lys4 methyltransferase complex. *J Biol Chem* **282,** 13419-13428.

LEE, J. H., YOU, J., DOBROTA, E. & SKALNIK, D. G. (2010). Identification and characterization of a novel human PP1 phosphatase complex. *J Biol Chem* **285,** 24466-24476.

LEE, J. W., PARK, J. K., LEE, S. H., KIM, S. Y., CHO, Y. B. & KUH, H. J. (2006). Anti-tumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs* **17,** 377-384.

LEE, S. J., LEE, J. K., MAENG, Y. S., KIM, Y. M. & KWON, Y. G. (2009). Langerhans cell protein 1 (LCP1) binds to PNUTS in the nucleus: implications for this complex in transcriptional regulation. *Exp Mol Med* **41,** 189-200.

LI, G. M. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* **18,** 85-98.

LI, J., WANG, Q. E., ZHU, Q., EL-MAHDY, M. A., WANI, G., PRAETORIUS-IBBA, M. & WANI, A. A. (2006). DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity. *Cancer Res* **66,** 8590-8597.

LI, L., LIU, X., GLASSMAN, A. B., KEATING, M. J., STROS, M., PLUNKETT, W. & YANG, L. Y. (1997). Fludarabine triphosphate inhibits nucleotide excision repair of cisplatin-induced DNA adducts in vitro. *Cancer Res* **57,** 1487-1494.

LIEDBERG, B., NYLANDER, C. & LUNSTRÖM, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **4,** 299-304.

LIEDERT, B., MATERNA, V., SCHADENDORF, D., THOMALE, J. & LAGE, H. (2003). Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G(2)-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *Journal of Investigative Dermatology* **121,** 172-176.

LILLEY, D. M. J. (1996). Cisplatin adducts in DNA: distortion and recognition. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1,** 3.

LIPPARD, S. J. (1982). New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH3)2Cl2]. *Science* **218,** 1075-1082.

LIU, P. & DEMPLE, B. (2010). DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environ Mol Mutagen* **51,** 417-426.

LIU, Y., VIRSHUP, D. M., WHITE, R. L. & HSU, L. C. (2002). Regulation of BRCA1 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 1alpha. *Cancer Res* **62,** 6357-6361.

LIVACHE, T., ROGET, A., DEJEAN, E., BARTHET, C., BIDAN, G. & TEOULE, R. (1994). Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res* **22,** 2915-2921.

LOEBER, R. L., MICHAELSON-RICHIE, E. D., CODREANU, S. G., LIEBLER, D. C., CAMPBELL, C. R. & TRETYAKOVA, N. Y. (2009). Proteomic analysis of DNA-protein cross-linking by antitumor nitrogen mustards. *Chem Res Toxicol* **22,** 1151-1162.

LOPEZ-CRAPEZ, E., MALINGE, J. M., GATCHITCH, F., CASANO, L., LANGLOIS, T., PUGNIERE, M., ROQUET, F., MATHIS, G. & BAZIN, H. (2008). A homogeneous resonance energy transfer-based assay to monitor MutS/DNA interactions. *Anal Biochem* **383,** 301-306.

LOVEJOY, K. S. & LIPPARD, S. J. (2009). Non-traditional platinum compounds for improved accumulation, oral bioavailability, and tumor targeting. *Dalton Trans* **48,** 10651-10659.

MAILLARD, O., SOLYOM, S. & NAEGELI, H. (2007). An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol* **5,** e79.

MAILLART, E., BRENGEL-PESCE, K., CAPELA, D., ROGET, A., LIVACHE, T., CANVA, M., LEVY, Y. & SOUSSI, T. (2004). Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction. *Oncogene* **23,** 5543-5550.

MANDIC, A., HANSSON, J., LINDER, S. & SHOSHAN, M. C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* **278,** 9100-9106.

MARÉCHAL, V. (2003). La double vie de la protéine HMGB1: composant structural de la chromatine et cytokine pro-inflammatoire. *Revue Française des Laboratoires* **357,** 41-47.

MARTIN, L. P., HAMILTON, T. C. & SCHILDER, R. J. (2008). Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* **14,** 1291-1295.

MCCAULEY, M. J., ZIMMERMAN, J., MAHER, L. J. & WILLIAMS, M. C. (2007). HMGB binding to DNA: Single and double box motifs. *Journal of Molecular Biology* **374,** 993-1004.

MCKEAGE, M. J., MISTRY, P., WARD, J., BOXALL, F. E., LOH, S., O'NEILL, C., ELLIS, P., KELLAND, L. R., MORGAN, S. E., MURRER, B. & ET AL. (1995). A phase I and pharmacology study of an oral platinum complex, JM216: dose-dependent pharmacokinetics with single-dose administration. *Cancer Chemother Pharmacol* **36,** 451-458.

MELLO, J. A., ACHARYA, S., FISHEL, R. & ESSIGMANN, J. M. (1996). The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol* **3,** 579-589.

MELLO, J. A., MOGGS, J. G. & ALMOUZNI, G. (2006). Analysis of DNA repair and chromatin assembly in vitro using immobilized damaged DNA substrates. *Methods Mol Biol* **314,** 477-487.

MICHAUD, W. A., NICHOLS, A. C., MROZ, E. A., FAQUIN, W. C., CLARK, J. R., BEGUM, S., WESTRA, W. H., WADA, H., BUSSE, P. M., ELLISEN, L. W. & ROCCO, J. W. (2009). Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **15,** 1645-1654.

MIKNYOCZKI, S. J., JONES-BOLIN, S., PRITCHARD, S., HUNTER, K., ZHAO, H., WAN, W., ATOR, M., BIHOVSKY, R., HUDKINS, R., CHATTERJEE, S., KLEIN-SZANTO, A., DIONNE, C. & RUGGERI, B. (2003). Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* **2,** 371-382.

MILLAU, J. F., RAFFIN, A. L., CAILLAT, S., CLAUDET, C., ARRAS, G., UGOLIN, N., DOUKI, T., RAVANAT, J. L., BRETON, J., ODDOS, T., DUMONTET, C., SARASIN, A., CHEVILLARD, S., FAVIER, A. & SAUVAIGO, S. (2008). A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip* **8,** 1713-1722.

MINIG, V., KATTAN, Z., VAN BEEUMEN, J., BRUNNER, E. & BECUWE, P. (2009). Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **284,** 14165-14176.

MITKOVA, E., UGRINOVA, I., PASHEV, I. G. & PASHEVA, E. A. (2005). The inhibitory effect of HMGB-1 protein on the repair of cisplatin-damaged DNA is accomplished through the acidic domain. *Biochemistry* **44,** 5893-5898.

MOCHAN, T. A., VENERE, M., DITULLIO, R. A., JR. & HALAZONETIS, T. D. (2003). 53BP1 and NFBD1/MDC1-Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage. *Cancer Res* **63,** 8586-8591.

MOCQUET, V. & EGLY, J. M. (2006). Repair by excision - a mechanism in a line of clarification. *Biofutur* **271,** 40-43.

MOCQUET, V., KROPACHEV, K., KOLBANOVSKIY, M., KOLBANOVSKIY, A., TAPIAS, A., CAI, Y., BROYDE, S., GEACINTOV, N. E. & EGLY, J. M. (2007). The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions. *EMBO J* **26,** 2923-2932.

MOGGS, J. G., SZYMKOWSKI, D. E., YAMADA, M., KARRAN, P. & WOOD, R. D. (1997). Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* **25,** 480-491.

MONTES DE OCA, R., SHOEMAKER, C. J., GUCEK, M., COLE, R. N. & WILSON, K. L. (2009). Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners. *PLoS One* **4,** e7050.

MOURET, S., CHARVERON, M., FAVIER, A., CADET, J. & DOUKI, T. (2008). Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin. *DNA Repair (Amst)* **7,** 704-712.

MUGGIA, F. (2009). Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **112,** 275-281.

NAG, A., BONDAR, T., SHIV, S. & RAYCHAUDHURI, P. (2001). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21,** 6738-6747.

NEHER, T. M., RECHKUNOVA, N. I., LAVRIK, O. I. & TURCHI, J. J. (2010). Photo-cross-linking of XPC-Rad23B to cisplatin-damaged DNA reveals contacts with both strands of the DNA duplex and spans the DNA adduct. *Biochemistry* **49,** 669-678.

NICHOLS, A. F., ITOH, T., GRAHAM, J. A., LIU, W., YAMAIZUMI, M. & LINN, S. (2000). Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J Biol Chem* **275,** 21422-21428.

NISHIKAWA, T., OKAMURA, H., NAGADOI, A., KONIG, P., RHODES, D. & NISHIMURA, Y. (2001). Solution structure of a telomeric DNA complex of human TRF1. *Structure* **9,** 1237-1251.

NOUSPIKEL, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* **66,** 994-1009.

O'FLAHERTY, E. & KAYE, J. (2003). TOX defines a conserved subfamily of HMG-box proteins. *BMC Genomics* **4,** 13.

OBERSCHMIDT, O., HANAUSKE, A. R., PAMPILLON, C., SWEENEY, N. J., STROHFELDT, K. & TACKE, M. (2007). Antiproliferative activity of Titanocene Y against tumor colony-forming units. *Anticancer Drugs* **18,** 317-321.

OHNDORF, U. M., ROULD, M. A., HE, Q., PABO, C. O. & LIPPARD, S. J. (1999). Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* **399,** 708-712.

OKABE, J., EGUCHI, A., MASAGO, A., HAYAKAWA, T. & NAKANISHI, M. (2000). TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells. *Hum Mol Genet* **9,** 2639-2650.

OLNES, M. I. & KURL, R. N. (1994). Isolation of nuclear extracts from fragile cells: a simplified procedure applied to thymocytes. *Biotechniques* **17,** 828-829.

OPRESKO, P. L., FAN, J., DANZY, S., WILSON, D. M., 3RD & BOHR, V. A. (2005). Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic Acids Res* **33,** 1230-1239.

OURLIAC-GARNIER, I., CHARIF, R. & BOMBARD, S. (2009). Telomeres and telomerases: potential targets for platinum complexes. In *Metal complex-DNA interactions*. ed. HADJILIADIS, N. & SLETTEN, E., pp. 209-234. Wiley.

OURLIAC-GARNIER, I., POULET, A., CHARIF, R., AMIARD, S., MAGDINIER, F., REZAI, K., GILSON, E., GIRAUD-PANIS, M. J. & BOMBARD, S. (2010). Platination of telomeric DNA by cisplatin disrupts recognition by TRF2 and TRF1. *J Biol Inorg Chem* **15,** 641-654.

OURLIAC GARNIER, I. & BOMBARD, S. (2007). GG sequence of DNA and the human telomeric sequence react with cis-diammine-diaquaplatinum at comparable rates. *J Inorg Biochem* **101,** 514-524.

OZALP-YAMAN, S., DE HOOG, P., AMADEI, G., PITIE, M., GAMEZ, P., DEWELLE, J., MIJATOVIC, T., MEUNIER, B., KISS, R. & REEDIJK, J. (2008). Platinated copper(3-clip-phen) complexes as effective DNA-cleaving and cytotoxic agents. *Chemistry* **14,** 3418-3426.

PANOV, K. I., FRIEDRICH, J. K., RUSSELL, J. & ZOMERDIJK, J. C. (2006). UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J* **25,** 3310-3322.

PARK, D. J., NAKAMURA, H., CHUMAKOV, A. M., SAID, J. W., MILLER, C. W., CHEN, D. L. & KOEFFLER, H. P. (1994). Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* **9,** 1899-1906.

PARK, M. S., DE LEON, M. & DEVARAJAN, P. (2002). Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* **13,** 858-865.

PASHEVA, E. A., PASHEV, I. G. & FAVRE, A. (1998). Preferential binding of high mobility group 1 protein to UV-damaged DNA. Role of the COOH-terminal domain. *J Biol Chem* **273,** 24730-24736.

PASTUKH, V., SHOKOLENKO, I., WANG, B., WILSON, G. & ALEXEYEV, M. (2007). Human mitochondrial transcription factor A possesses multiple subcellular targeting signals. *FEBS J* **274,** 6488-6499.

PAYNE, A. & CHU, G. (1994). Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutat Res* **310,** 89-102.

PEKLAK-SCOTT, C., SMITHERMAN, P. K., TOWNSEND, A. J. & MORROW, C. S. (2008). Role of glutathione S-transferase P1-1 in the cellular detoxification of cisplatin. *Mol Cancer Ther* **7,** 3247-3255.

PENG, A., LEWELLYN, A. L., SCHIEMANN, W. P. & MALLER, J. L. (2010). Repo-man controls a protein phosphatase 1-dependent threshold for DNA damage checkpoint activation. *Curr Biol* **20,** 387-396.

PERABO, F. G. E. & MULLER, S. C. (2007). New agents for treatment of advanced transitional cell carcinoma. *Annals of Oncology* **18,** 835-843.

PETRAK, J., IVANEK, R., TOMAN, O., CMEJLA, R., CMEJLOVA, J., VYORAL, D., ZIVNY, J. & VULPE, C. D. (2008). Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* **8,** 1744-1749.

PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29,** e45.

PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26,** 509-515.

PIETROWSKA, M., KOLODZIEJCZYK, I. & WIDLAK, P. (2006). Mitochondrial transcription factor A is the major protein in rodent hepatocytes that recognizes DNA lesions induced by N-acetoxy-acetylaminofluorene. *Acta Biochim Pol* **53,** 777-782.

PIETROWSKA, M. & WIDLAK, P. (2005). Characterization of a novel protein that specifically binds to DNA modified by N-acetoxy-acetylaminofluorene and cis-diamminedichloroplatinum. *Acta Biochim Pol* **52,** 867-874.

PIL, P. M. & LIPPARD, S. J. (1992). Specific Binding of Chromosomal Protein-Hmg1 to DNA Damaged by the Anticancer Drug Cisplatin. *Science* **256,** 234-237.

PIVONKOVA, H., BRAZDOVA, M., KASPARKOVA, J., BRABEC, V. & FOJTA, M. (2006). Recognition of cisplatin-damaged DNA by p53 protein: critical role of the p53 C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **339,** 477-484.

PRAETORIUS-IBBA, M., WANG, Q. E., WANI, G., EL-MAHDY, M. A., ZHU, Q., QIN, S. & WANI, A. A. (2007). Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. *DNA Repair (Amst)* **6,** 578-587.

PRESTON, T. J., HENDERSON, J. T., MCCALLUM, G. P. & WELLS, P. G. (2009). Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* **8,** 2015-2026.

RABIK, C. A. & DOLAN, M. E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33,** 9-23.

RAPIC-OTRIN, V., MCLENIGAN, M. P., BISI, D. C., GONZALEZ, M. & LEVINE, A. S. (2002). Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucleic Acids Res* **30,** 2588-2598.

RAPIC OTRIN, V., KURAOKA, I., NARDO, T., MCLENIGAN, M., EKER, A. P., STEFANINI, M., LEVINE, A. S. & WOOD, R. D. (1998). Relationship of the xeroderma pigmentosum group E DNA repair defect to the chromatin and DNA binding proteins UV-DDB and replication protein A. *Mol Cell Biol* **18,** 3182-3190.

REARDON, J. T., VAISMAN, A., CHANEY, S. G. & SANCAR, A. (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* **59,** 3968-3971.

REGULUS, P., DUROUX, B., BAYLE, P. A., FAVIER, A., CADET, J. & RAVANAT, J. L. (2007). Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 14032-14037.

RICH, T., ALLEN, R. L. & WYLLIE, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* **407,** 777-783.

RIEDL, T., HANAOKA, F. & EGLY, J. M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J* **22,** 5293-5303.

RIEGER, R. A., ZAIKA, E. I., XIE, W., JOHNSON, F., GROLLMAN, A. P., IDEN, C. R. & ZHARKOV, D. O. (2006). Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA. *Mol Cell Proteomics* **5,** 858-867.

ROBERTS, J. J. & THOMSON, A. J. (1979). The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **22,** 71-133.

ROSENBERG, B., VAN CAMP, L., GRIMLEY, E. B. & THOMSON, A. J. (1967). The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem* **242,** 1347-1352.

ROSENBERG, B., VANCAMP, L. & KRIGAS, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205,** 698-699.

ROSENBERG, B., VANCAMP, L., TROSKO, J. E. & MANSOUR, V. H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222,** 385-386.

RUDNEV, A. V., FOTEEVA, L. S., KOWOL, C., BERGER, R., JAKUPEC, M. A., ARION, V. B., TIMERBAEV, A. R. & KEPPLER, B. K. (2006). Preclinical characterization of anticancer gallium(III) complexes: solubility, stability, lipophilicity and binding to serum proteins. *J Inorg Biochem* **100,** 1819-1826.

SAHA, A., WITTMEYER, J. & CAIRNS, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7,** 437-447.

SANCHEZ-CANO, C. & HANNON, M. J. (2009). Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Trans* **48,** 10702-10711.

SCARANO, S., MASCINI, M., TURNER, A. P. & MINUNNI, M. (2010). Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens Bioelectron* **25,** 957-966.

SCHAR, P., FASI, M. & JESSBERGER, R. (2004). SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **32,** 3921-3929.

SCHWEITZER, J. K. & D'SOUZA-SCHOREY, C. (2005). A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. *Exp Cell Res* **311,** 74-83.

SCHWEIZER, U., HEY, T., LIPPS, G. & KRAUSS, G. (1999). Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA. *Nucleic Acids Res* **27,** 3183-3189.

SCHWERDT, G., FREUDINGER, R., SCHUSTER, C., SILBERNAGL, S. & GEKLE, M. (2003). Inhibition of mitochondria prevents cell death in kidney epithelial cells by intra- and extracellular acidification. *Kidney Int* **63,** 1725-1735.

SCRIMA, A., KONICKOVA, R., CZYZEWSKI, B. K., KAWASAKI, Y., JEFFREY, P. D., GROISMAN, R., NAKATANI, Y., IWAI, S., PAVLETICH, N. P. & THOMA, N. H. (2008). Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex. *Cell* **135,** 1213-1223.

SEDLETSKA, Y., FOURRIER, L. & MALINGE, J. M. (2007). Modulation of MutS ATP-dependent functional activities by DNA containing a cisplatin compound lesion (base damage and mismatch). *J Mol Biol* **369,** 27-40.

SEN, S. P. & DE BENEDETTI, A. (2006). TLK1B promotes repair of UV-damaged DNA through chromatin remodeling by Asf1. *BMC Mol Biol* **7,** 37.

SHIMKUS, M., LEVY, J. & HERMAN, T. (1985). A chemically cleavable biotinylated nucleotide: usefulness in the recovery of protein-DNA complexes from avidin affinity columns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82,** 2593-2597.

SHIYANOV, P., HAYES, S. A., DONEPUDI, M., NICHOLS, A. F., LINN, S., SLAGLE, B. L. & RAYCHAUDHURI, P. (1999). The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription. *Mol Cell Biol* **19,** 4935-4943.

SHRIVASTAV, M., DE HARO, L. P. & NICKOLOFF, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* **18,** 134-147.

SIDDIK, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22,** 7265-7279.

SILVERMAN, J., TAKAI, H., BUONOMO, S. B., EISENHABER, F. & DE LANGE, T. (2004). Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes Dev* **18,** 2108-2119.

SONG, K., JUNG, D., JUNG, Y., LEE, S. G. & LEE, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* **481,** 81-85.

SORENSON, C. M. & EASTMAN, A. (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* **48,** 4484-4488.

STANSFIELD, H. E., KULCZEWSKI, B. P., LYBRAND, K. E. & JAMIESON, E. R. (2009). Identifying protein interactions with metal-modified DNA using microarray technology. *J Biol Inorg Chem* **14,** 193-199.

STEWART, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol* **63,** 12-31.

STORDAL, B., PAVLAKIS, N. & DAVEY, R. (2007). Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* **33,** 347-357.

STOYANOVA, T., ROY, N., KOPANJA, D., BAGCHI, S. & RAYCHAUDHURI, P. (2009). DDB2 decides cell fate following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106,** 10690-10695.

STUBBERT, L. J., SMITH, J. M., HAMILL, J. D., ARCAND, T. L. & MCKAY, B. C. (2009). The anti-apoptotic role for p53 following exposure to ultraviolet light does not involve DDB2. *Mutat Res* **663,** 69-76.

SUGASAWA, K., NG, J. M., MASUTANI, C., IWAI, S., VAN DER SPEK, P. J., EKER, A. P., HANAOKA, F., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2,** 223-232.

SUGASAWA, K., OKUDA, Y., SAIJO, M., NISHI, R., MATSUDA, N., CHU, G., MORI, T., IWAI, S., TANAKA, K. & HANAOKA, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121,** 387-400.

SUN, N. K., SUN, C. L., LIN, C. H., PAI, L. M. & CHAO, C. C. (2010). Damaged DNA-binding protein 2 (DDB2) protects against UV irradiation in human cells and Drosophila. *J Biomed Sci* **17,** 27.

SUNAVALA-DOSSABHOY, G., BALAKRISHNAN, S. K., SEN, S., NUTHALAPATY, S. & DE BENEDETTI, A. (2005). The radioresistance kinase TLK1B protects the cells by promoting repair of double strand breaks. *BMC Mol Biol* **6,** 19.

SUNAVALA-DOSSABHOY, G. & DE BENEDETTI, A. (2009). Tousled homolog, TLK1, binds and phosphorylates Rad9; TLK1 acts as a molecular chaperone in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* **8,** 87-102.

SUNDQUIST, W. I., LIPPARD, S. J. & STOLLAR, B. D. (1987). Monoclonal antibodies to DNA modified with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84,** 8225-8229.

SVENSSON, R. U., BARNES, J. M., ROKHLIN, O. W., COHEN, M. B. & HENRY, M. D. (2007). Chemotherapeutic agents up-regulate the cytomegalovirus promoter: implications for bioluminescence imaging of tumor response to therapy. *Cancer Res* **67,** 10445-10454.

TAGUCHI, A., BLOOD, D. C., DEL TORO, G., CANET, A., LEE, D. C., QU, W., TANJI, N., LU, Y., LALLA, E., FU, C., HOFMANN, M. A., KISLINGER, T., INGRAM, M., LU, A., TANAKA, H., HORI, O., OGAWA, S., STERN, D. M. & SCHMIDT, A. M. (2000). Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405,** 354-360.

TAKAYAMA, Y., KOKURYO, T., YOKOYAMA, Y., ITO, S., NAGINO, M., HAMAGUCHI, M. & SENGA, T. (2010). Silencing of Tousled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Cancer Lett* **296,** 27-34.

TAN, T. & CHU, G. (2002). p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* **22,** 3247-3254.

TANG, J. & CHU, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)* **1,** 601-616.

TANG, X., HUI, Z. G., CUI, X. L., GARG, R., KASTAN, M. B. & XU, B. (2008). A novel ATM-dependent pathway regulates protein phosphatase 1 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **28,** 2559-2566.

THINNES, F. P. (2009). Human type-1 VDAC, a cisplatin target involved in either apoptotic pathway. *Molecular Genetics and Metabolism* **97,** 163-163.

THOMA, F. (2005). Repair of UV lesions in nucleosomes--intrinsic properties and remodeling. *DNA Repair (Amst)* **4,** 855-869.

THOMAS, J. O. & TRAVERS, A. A. (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **26,** 167-174.

TODD, R. C. & LIPPARD, S. J. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* **1,** 280-291.

TOH, Y. & NICOLSON, G. (2009). The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications. *Clinical and Experimental Metastasis* **26,** 215-227.

TREGO, K. S. & TURCHI, J. J. (2006). Pre-steady-state binding of damaged DNA by XPC-hHR23B reveals a kinetic mechanism for damage discrimination. *Biochemistry* **45,** 1961-1969.

TREIBER, D. K., ZHAI, X., JANTZEN, H. M. & ESSIGMANN, J. M. (1994). Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 5672-5676.

TRIMMER, E. E., ZAMBLE, D. B., LIPPARD, S. J. & ESSIGMANN, J. M. (1998). Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. *Biochemistry* **37,** 352-362.

TRINKLE-MULCAHY, L., ANDERSEN, J., LAM, Y. W., MOORHEAD, G., MANN, M. & LAMOND, A. I. (2006). Repo-Man recruits PP1 gamma to chromatin and is essential for cell viability. *J Cell Biol* **172,** 679-692.

TRINKLE-MULCAHY, L. & LAMOND, A. I. (2006). Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol* **18,** 623-631.

TURCHI, J. J. & HENKELS, K. (1996). Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. *J Biol Chem* **271,** 13861-13867.

TURCHI, J. J., HENKELS, K. M., HERMANSON, I. L. & PATRICK, S. M. (1999). Interactions of mammalian proteins with cisplatin-damaged DNA. *J Inorg Biochem* **77,** 83-87.

TURCHI, J. J., PATRICK, S. M. & HENKELS, K. M. (1997). Mechanism of DNA-dependent protein kinase inhibition by cis-diamminedichloroplatinum(II)-damaged DNA. *Biochemistry* **36,** 7586-7593.

UGRINOVA, I., ZLATEVA, S., PASHEV, I. G. & PASHEVA, E. A. (2009). Native HMGB1 protein inhibits repair of cisplatin-damaged nucleosomes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* **41,** 1556-1562.

URAMOTO, H., IZUMI, H., ISE, T., TADA, M., UCHIUMI, T., KUWANO, M., YASUMOTO, K., FUNA, K. & KOHNO, K. (2002). p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* **277,** 31694-31702.

VAISMAN, A., LIM, S. E., PATRICK, S. M., COPELAND, W. C., HINKLE, D. C., TURCHI, J. J. & CHANEY, S. G. (1999). Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. *Biochemistry* **38,** 11026-11039.

VAISMAN, A., VARCHENKO, M., UMAR, A., KUNKEL, T. A., RISINGER, J. I., BARRETT, J. C., HAMILTON, T. C. & CHANEY, S. G. (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res* **58,** 3579-3585.

VAN DER MERWE, A. (2001). Surface Plasmon Resonance. In *Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*. ed. HARDING, S. & CHOWDHRY, P. Z., pp. 137-170. Oxford University Press

VICHI, P., COIN, F., RENAUD, J. P., VERMEULEN, W., HOEIJMAKERS, J. H., MORAS, D. & EGLY, J. M. (1997). Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. *EMBO J* **16,** 7444-7456.

WAKASUGI, M., KASASHIMA, H., FUKASE, Y., IMURA, M., IMAI, R., YAMADA, S., CLEAVER, J. E. & MATSUNAGA, T. (2009). Physical and functional interaction between DDB and XPA in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* **37,** 516-525.

WANG, D. & LIPPARD, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4,** 307-320.

WANG, M., MAHRENHOLZ, A. & LEE, S. H. (2000). RPA stabilizes the XPA-damaged DNA complex through protein-protein interaction. *Biochemistry* **39,** 6433-6439.

WERNER, M. H., HUTH, J. R., GRONENBORN, A. M. & CLORE, G. M. (1995). Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* **81,** 705-714.

WETZEL, C. C. & BERBERICH, S. J. (1998). DNA binding activities of p53 protein following cisplatin damage of ovarian cells. *Oncol Res* **10,** 151-161.

WINNACKER, M., WELZMILLER, V., STRASSER, R. & CARELL, T. (2010). Development of a DNA photoaffinity probe for the analysis of 8-OxodG-binding proteins in a human proteome. *Chembiochem* **11,** 1345-1349.

WU, W., YAN, C., GAN, T., CHEN, Z., LU, X., DUERKSEN-HUGHES, P. J., ZHU, X. & YANG, J. (2010). Nuclear proteome analysis of cisplatin-treated HeLa cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis***,** in press.

XIN, H., LIU, D. & SONGYANG, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biol* **9,** 232.

YAHATA, H., KOBAYASHI, H., KAMURA, T., AMADA, S., HIRAKAWA, T., KOHNO, K., KUWANO, M. & NAKANO, H. (2002). Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **128,** 621-626.

YAMADA, M., O'REGAN, E., BROWN, R. & KARRAN, P. (1997). Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* **25,** 491-496.

YANEVA, J., LEUBA, S. H., VAN HOLDE, K. & ZLATANOVA, J. (1997). The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to cis-platinum-damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94,** 13448-13451.

YANG, D., VAN BOOM, S. S., REEDIJK, J., VAN BOOM, J. H. & WANG, A. H. (1995). Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis. *Biochemistry* **34,** 12912-12920.

YANG, W., ZENG, W., ZHOU, D. & SHI, Y. (2002). Cloning, expression, secondary structure characterization of HMG box 1 of hUBF from E. coli and its binding to DNA. *Biochim Biophys Acta* **1598,** 147-155.

YANG, Y., SASS, L. E., DU, C., HSIEH, P. & ERIE, D. A. (2005). Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **33,** 4322-4334.

YANG, Z., BU, Y., WANG, C., LIU, G. & SONG, F. (2010). Growth inhibition, morphology change, and cell cycle alterations in NFBD1-depleted human esophageal cancer cells. *Mol Cell Biochem* **342,** 1-6.

YANG, Z., FAUSTINO, P. J., ANDREWS, P. A., MONASTRA, R., RASMUSSEN, A. A., ELLISON, C. D. & CULLEN, K. J. (2000). Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **46,** 255-262.

YANG, Z., SCHUMAKER, L. M., EGORIN, M. J., ZUHOWSKI, E. G., GUO, Z. & CULLEN, K. J. (2006). Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* **12,** 5817-5825.

YARNELL, A. T., OH, S., REINBERG, D. & LIPPARD, S. J. (2001). Interaction of FACT, SSRP1, and the high mobility group (HMG) domain of SSRP1 with DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *J Biol Chem* **276,** 25736-25741.

YEATMAN, E, ASH & E, A. (1987). Surface plasmon microscopy. *Electron. Lett.* **23,** 2.

YOSHIDA, Y., IZUMI, H., ISE, T., URAMOTO, H., TORIGOE, T., ISHIGUCHI, H., MURAKAMI, T., TANABE, M., NAKAYAMA, Y., ITOH, H., KASAI, H. & KOHNO, K. (2002). Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **295,** 945-951.

YOSHIDA, Y., IZUMI, H., TORIGOE, T., ISHIGUCHI, H., ITOH, H., KANG, D. & KOHNO, K. (2003). P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* **63,** 3729-3734.

YOU, J. S., WANG, M. & LEE, S. H. (2003). Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **278,** 7476-7485.

YU, F., MEGYESI, J. & PRICE, P. M. (2008). Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **295,** F44-F52.

ZHAI, X., BECKMANN, H., JANTZEN, H. M. & ESSIGMANN, J. M. (1998). Cisplatin-DNA adducts inhibit ribosomal RNA synthesis by hijacking the transcription factor human upstream binding factor. *Biochemistry* **37,** 16307-16315.

ZHANG, C. X., CHANG, P. V. & LIPPARD, S. J. (2004). Identification of nuclear proteins that interact with platinum-modified DNA by photoaffinity labeling. *J Am Chem Soc* **126,** 6536-6537.

ZHANG, S., LOVEJOY, K. S., SHIMA, J. E., LAGPACAN, L. L., SHU, Y., LAPUK, A., CHEN, Y., KOMORI, T., GRAY, J. W., CHEN, X., LIPPARD, S. J. & GIACOMINI, K. M. (2006). Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res* **66,** 8847-8857.

ZHENG, Y. & SANCHE, L. (2009). Gold nanoparticles enhance DNA damage induced by anti-cancer drugs and radiation. *Radiat Res* **172,** 114-119.

ZHU, G., CHANG, P. & LIPPARD, S. J. (2010). Recognition of platinum-DNA damage by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **49,** 6177-6183.

ZHU, G. & LIPPARD, S. J. (2009). Photoaffinity labeling reveals nuclear proteins that uniquely recognize cisplatin-DNA interstrand cross-links. *Biochemistry* **48,** 4916-4925.

ZHU, X. D., NIEDERNHOFER, L., KUSTER, B., MANN, M., HOEIJMAKERS, J. H. & DE LANGE, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* **12,** 1489-1498.

ZORBAS, H. & KEPPLER, B. K. (2005). Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem* **6,** 1157-1166.

RÉSUMÉ

La présence de lésions sur l'ADN contribue à déstabiliser sa structure, bloquant certains processus vitaux pour la cellule. Ces altérations peuvent cependant avoir un intérêt thérapeutique, par exemple dans le cas de l'utilisation d'anticancéreux tels que les dérivés du platine. Les adduits volumineux qu'ils génèrent, s'ils ne sont pas réparés, entraînent la cellule vers l'apoptose. La compréhension de la réponse à ces anticancéreux passe par l'étude des protéines qui interagissent directement avec les dommages, et dont l'ensemble constitue l'interactome des lésions de l'ADN. Ce travail de thèse présente le développement d'outils destinés à compléter la liste des protéines associées aux adduits du platine. Dans un premier temps, nous avons utilisé un piège à protéines (*ligand fishing*) constitué de plasmides lésés fixés sur des billes magnétiques. Trois dérivés du platine ont été sélectionnés pour générer les lésions : le cisplatine (molécule *princeps*), l'oxaliplatine, et le satraplatine. Ce piège a permis d'obtenir, à partir d'extraits nucléaires issus de cellules cancéreuses HeLa et grâce à une identification par protéomique, une liste de candidats comprenant des protéines déjà connues (HMGB1, hUBF, complexe FACT), mais aussi 29 nouveaux membres de l'interactome. Parmi ceux-ci, nous avons relevé PNUTS, TOX4 et WDR82, qui constituent les sous-unités du complexe PTW/PP, très récemment découvert. La présence de ce complexe a été également validée sur un modèle d'adénocarcinome mammaire MDA MB 231, et les conséquences biologiques de son interaction avec les adduits du platine devront maintenant être précisées. Dans un second temps, nous avons mis au point une biopuce permettant d'étudier les interactions ADN lésé/protéine par SPRi. Les affinités respectives d'HMGB1 et du nouveau candidat TOX4 pour les adduits des trois dérivés du platine ont pu être ainsi confirmées. Dans un dernier temps, nous avons étudié le rôle de DDB2 (acteur de la reconnaissance des photoproduits UV) dans la prise en charge des adduits platinés. Les expérimentations menées sur les cellules MDA MB 231 exprimant DDB2 de façon différentielle nous ont permis de vérifier que cette protéine ne participe pas à la réparation des adduits du cisplatine, contribuant plutôt à potentialiser l'action cytotoxique de cet agent. Dans le futur, nos microsystèmes pourront être adaptés à l'étude de l'interactome d'autres lésions de l'ADN.

Mots clefs : lésions de l'ADN ; cisplatine ; oxaliplatine ; satraplatine ; protéines à boîte HMG ; *DNA damage binding protein 2* (DDB2) ; TOX4 ; SPRi.

SUMMARY

DNA lesions contribute to the alteration of DNA structure, thereby inhibiting essential cellular processes. Such alterations may be beneficial for chemotherapies, for example in the case of platinum anticancer agents. They generate bulky adducts that, if not repaired, ultimately cause apoptosis. A better understanding of the biological response to such molecules can be obtained through the study of proteins that directly interact with the damages. These proteins constitute the DNA lesions interactome. This thesis presents the development of tools aiming at increasing the list of platinum adduct-associated proteins. Firstly, we designed a ligand fishing system made of damaged plasmids immobilized onto magnetic beads. Three platinum drugs were selected for our study: cisplatin, oxaliplatin and satraplatin. Following exposure of the trap to nuclear extracts from HeLa cancer cells and identification of retained proteins by proteomics, we obtained already known candidates (HMGB1, hUBF, FACT complex) but also 29 new members of the platinated-DNA interactome. Among them, we noted the presence of PNUTS, TOX4 and WDR82, which associate to form the recently-discovered PTW/PP complex. Their capture was then confirmed with a second model, namely breast cancer cell line MDA MB 231, and the biological consequences of such an interaction now need to be elucidated. Secondly, we adapted a SPRi biochip to the study of platinum-damaged DNA/proteins interactions. Affinity of HMGB1 and newly characterized TOX4 for adducts generated by our three platinum drugs could be validated thanks to the biochip. Finally, we used our tools, as well as analytical chemistry and biochemistry methods, to evaluate the role of DDB2 (a factor involved in the recognition of UV-induced lesions) in the repair of cisplatin adducts. Our experiments using MDA MB 231 cells differentially expressing DDB2 showed that this protein is not responsible for the repair of platinum damages. Instead, it appears to act as a positive mediator of their cytotoxicity. In the near future, the abovementioned microsystems will be adapted to the study of the interactome of other DNA lesions.

Keywords : DNA lesions ; cisplatin ; oxaliplatin ; satraplatin ; HMG-box proteins ; DNA damage binding protein 2 (DDB2) ; TOX4 ; SPRi.