

**Utilisation de l'essai comète et du biomarqueur  $\gamma$ -H2AX pour détecter  
les dommages induits à l'ADN cellulaire par le  
5-bromodéoxyuridine post-irradiation.**

par

**Carole La Madeleine**

Département de radiobiologie et médecine nucléaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en radiobiologie

Août 2009

Liste des évaluateurs:

Darel Hunting PhD

Directeur de recherche  
Département de médecine nucléaire et radiobiologie  
Faculté de médecine et des sciences de la santé

Léon Sanche PhD

Directeur de recherche  
Département de médecine nucléaire et radiobiologie  
Faculté de médecine et des sciences de la santé

Richard Wagner PhD

Membre du programme  
Département de médecine nucléaire et radiobiologie  
Faculté de médecine et des sciences de la santé

Guylain Boissonneault PhD

Membre extérieur au programme  
Département de biochimie  
Faculté de médecine et des sciences de la santé



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-65625-9  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-65625-9

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

*C'est au moment où nous y attendons le moins que la vie nous propose un défi destiné à tester notre courage et notre volonté de changement ; alors, il est inutile de feindre que rien n'arrive ou de se défilier en disant que nous ne sommes pas encore prêts.*

**Coelho, Paulo**

*À Léa*

*Pour illuminer notre vie chaque jour*

*À Dany*

*Pour sa présence, son soutien et son amour*

## Résumé

Ce travail de mémoire a été réalisé par Carole La Madeleine au département de radiobiologie et médecine nucléaire. Il a pour titre : **Utilisation de l'essai comète et du biomarqueur  $\gamma$ -H2AX pour détecter les dommages induits à l'ADN cellulaire par le 5-bromodéoxyuridine post-irradiation.**

Ce mémoire est présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en radiobiologie (2009). Un jury a révisé les informations contenues dans ce mémoire. Il était composé de professeurs de la Faculté de médecine et des sciences de la santé soit : Darel Hunting PhD, directeur de recherche (département de médecine nucléaire et radiobiologie), Léon Sanche PhD, directeur de recherche (département de médecine nucléaire et radiobiologie), Richard Wagner PhD, membre du programme (département de médecine nucléaire et radiobiologie) et Guylain Boissonneault PhD, membre extérieur au programme (département de biochimie).

Le 5-bromodéoxyuridine (BrdU), un analogue halogéné de la thymidine reconnu depuis les années 60 comme étant un excellent radiosensibilisateur. L'hypothèse la plus répandue au sujet de l'effet radiosensibilisant du BrdU est qu'il augmente le nombre de cassures simple et double brin lorsqu'il est incorporé dans l'ADN de la cellule et exposé aux radiations ionisantes. Toutefois, de nouvelles recherches semblent remettre en question les observations précédentes. Ces dernières études ont confirmé que le BrdU est un bon radiosensibilisateur, car il augmente les dommages radio-induits dans l'ADN. Mais, c'est en étant incorporé dans une région simple brin que le BrdU radiosensibilise

l'ADN. Ces recherches ont également révélé pour la première fois un nouveau type de dommages produits lors de l'irradiation de l'ADN contenant du BrdU : les dimères interbrins. Le but de ces travaux de recherche est de déterminer si la présence de bromodéoxyuridine dans l'ADN augmente l'induction de bris simple et / ou double brin chez les cellules irradiées en utilisant de nouvelles techniques plus sensibles et spécifiques que celles utilisées auparavant. Pour ce faire, les essais comètes et la détection des foci H2AX phosphorylée pourraient permettre d'établir les effets engendrés par le BrdU au niveau cellulaire. Notre hypothèse (basée sur des résultats préliminaires effectués dans notre laboratoire) est que l'irradiation de l'ADN cellulaire en présence de BrdU augmentera le nombre de bris simple brin sans toutefois augmenter le nombre de bris double brin. Les résultats présentés dans ce mémoire semblent corroborer cette hypothèse. Les nouvelles méthodes d'analyse, soient l'essai comète et la détection des foci  $\gamma$ -H2AX remettent en question ce qui a été dit sur le BrdU au sujet de l'induction des cassures double brin depuis plusieurs années.

L'ensemble de ces nouveaux résultats effectué à l'aide de cellules ayant incorporées du BrdU sont en corrélation avec de précédents résultats obtenus dans notre laboratoire sur des oligonucléotides bromés. Ils réaffirment que l'irradiation combinée au BrdU augmente l'induction de bris simple brin mais pas de bris double brin. L'investigation approfondie des mécanismes d'action non élucidés du BrdU au niveau cellulaire et son utilisation à des moments stratégiques pendant le traitement de radiothérapie pourraient accroître son efficacité à des fins d'utilisation clinique.

**Mots clés :** 5-bromodéoxyuridine, dimères interbrins, dommage à l'ADN, essai comète, H2AX, radiosensibilisateur, radiothérapie

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>I</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>III</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>V</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>VI</b>
<b>Résumé</b> .....	
<b>I. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. La radiothérapie</b> .....	<b>1</b>
<b>I.2. Les dommages et conséquences du rayonnement ionisant sur l'ADN</b> .....	<b>1</b>
I.2.1. Rayonnement ionisant et effets sur la matière.....	1
I.2.2. Effets des radiations ionisantes sur l'ADN .....	2
I.2.3. Signalisation cellulaire en réponse aux radiations ionisantes.....	4
I.2.4. Réparation des dommages à l'ADN .....	7
<b>I.3. Utilisation de radiosensibilisateur en radiothérapie</b> .....	<b>10</b>
I.3.1. 5-Bromodéoxyuridine.....	10
I.3.2. BrdU et mécanismes d'action .....	11
I.3.3. BrdU et cellules.....	13
I.3.4. Remise en question des effets des radiations sur un ADN bromé .....	14
<b>I.4. Essai comète</b> .....	<b>15</b>
I.4.1. Comète alcaline.....	16
I.4.2. Comète neutre.....	17
<b>I.5. Biomarqueur des bris double brin de l'ADN : gamma H2AX</b> .....	<b>17</b>
I.5.1. Chromatine .....	17
I.5.2. Les histones .....	18
I.5.3. Modifications post-traductionnelles des histones.....	20
I.5.4. Les variantes des histones.....	21
I.5.5. Structure et fonctions de la protéine H2AX.....	21
I.5.6. Induction de la forme phosphorylée de H2AX.....	22
I.5.7. Activation des autres protéines par $\gamma$ -H2AX.....	24
<b>I.6. Hypothèses et objectifs du projet de recherche</b> .....	<b>25</b>
<b>II. Matériel et methods</b> .....	<b>26</b>
<b>II.1. Cellules et drogues</b> .....	<b>26</b>
<b>II.2. Quantification du pourcentage d'incorporation du BrdU</b> .....	<b>27</b>
II.2.1. Étape d'extraction.....	27
II.2.2. Étape de précipitation .....	28
II.2.3. Digestion enzymatique pour l'analyse HPLC .....	28
II.2.4. Analyse .....	29
<b>II.3. Croissance cellulaire</b> .....	<b>30</b>
<b>II.4. Irradiation des cellules</b> .....	<b>30</b>

<b>II.5.</b>	<b>Essais clonogéniques .....</b>	<b>31</b>
<b>II.6.</b>	<b>Captation des électrons aqueux.....</b>	<b>32</b>
<b>II.7.</b>	<b>Essai comète.....</b>	<b>32</b>
II.7.1.	Préparation des lames .....	32
II.7.2.	Lyse et migration.....	33
II.7.3.	Coloration et analyse .....	35
<b>II.8.</b>	<b>Révélation des bris à l'aide d'un oligonucléotide bromé .....</b>	<b>35</b>
II.8.1.	Marquage en 5'.....	35
II.8.2.	Traitement des échantillons.....	36
II.8.3.	Désalage.....	37
II.8.4.	Analyse des bris.....	37
<b>II.9.</b>	<b>Analyse de <math>\gamma</math>-H2AX.....</b>	<b>37</b>
II.9.1.	Analyse par décompte de foci (immunohistochimie).....	38
II.9.2.	Analyse par cytométrie de flux.....	39
<b>III.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>41</b>
<b>III.1.</b>	<b>Taux d'incorporation du BrdU .....</b>	<b>41</b>
<b>III.2.</b>	<b>Croissance cellulaire .....</b>	<b>42</b>
<b>III.3.</b>	<b>Survie cellulaire après traitement au BrdU et TdR.....</b>	<b>45</b>
<b>III.4.</b>	<b>Captation des électrons aqueux.....</b>	<b>46</b>
<b>III.5.</b>	<b>Formation de cassures simple brin à l'ADN .....</b>	<b>49</b>
III.5.1.	Comète alcaline .....	49
III.5.2.	Gel d'oligonucléotides bromés.....	55
<b>III.6.</b>	<b>Formation de cassures double brin à l'ADN.....</b>	<b>56</b>
III.6.1.	Comète neutre .....	57
III.6.2.	Biomarqueur $\gamma$ -H2AX.....	60
III.6.2.1.	Détection de foci $\gamma$ -H2AX sur lame.....	61
III.6.2.2.	Détection de $\gamma$ -H2AX par cytométrie de flux.....	62
<b>III.7.</b>	<b>Utilisation du fluorochrome SYBR gold versus le fluorochrome PI .....</b>	<b>66</b>
<b>III.8.</b>	<b>Effet de l'irradiation des cellules sur lame pour l'essai comète.....</b>	<b>67</b>
<b>IV.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>69</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Radiosensibilisation par le BrdU.....</b>	<b>70</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Méthodes d'analyse des bris .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Détection des cassures simple et double brin par l'essai comète .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.4.</b>	<b>Détection des cassures double brin à l'aide du biomarqueur <math>\gamma</math>-H2AX .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Choix du fluorochrome pour l'essai comète (SYBR gold et PI) .....</b>	<b>78</b>
<b>IV.6.</b>	<b>Effet de l'irradiation des cellules sur lame.....</b>	<b>79</b>
<b>V.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>80</b>
	<b>Remerciements .....</b>	<b>83</b>
	<b>Références.....</b>	<b>87</b>



## Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique des effets directs et indirects.....	4
Figure 2: Voie de signalisation d'ATM (MRN). .....	5
Figure 3: Représentation schématique de l'interaction de la protéine ATM.....	6
Figure 4: Réparation des dommages double brin. ....	9
Figure 5: Structure chimique de la molécule 5-Bromodéoxyuridine (BrdU).....	11
Figure 6: Réactions engendrées suite à l'irradiation d'une molécule bromée.....	12
Figure 7: Phosphorylation du BrdU par la thymidine kinase et incorporation au brin d'ADN par l'ADN polymérase. ....	13
Figure 8: Niveaux de condensation de l'ADN. ....	18
Figure 9: Représentation schématique de l'assemblage des octamères. ....	20
Figure 10: Principales variantes d'histone et leurs modifications post-traductionnelles. .	21
Figure 11: Profil du chromatogramme au HPLC. L'image du haut représente le standard de nucléoside et l'image du bas un échantillon contenant 2 $\mu$ M BrdU.....	29
Figure 12: Séquence oligonucléotidique. ....	36
Figure 13: Comparaison de la croissance des cellules cancéreuses CHO-K1.....	44
Figure 14: Effet du BrdU ou du TdR sur la survie cellulaire en fonction de la dose d'irradiation (Gy). ....	46
Figure 15: Effet de la présence ou non d'acétone sur la survie des cellules en fonction de la dose d'irradiation. ....	49
Figure 16: Détection des dommages simple brin par la méthode Collins pH 10 après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation. ....	51
Figure 17: Images de comètes (méthode Collins pH 10) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation. ....	52
Figure 18: Détection de dommages simple brin par la méthode Olive pH 12 après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation. ....	53
Figure 19: Images de comètes (méthode Olive pH 12) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation. ....	54

Figure 20: Images de comètes (méthode Olive pH>13) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation. ....	55
Figure 21: Observation des dommages sur un oligonucléotide contenant ou non une molécule de brome en présence de solutions de lyse utilisées lors des différents essais comètes. ....	56
Figure 22: Détection de dommages double brin par la méthode neutre après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation. ....	58
Figure 23: Images de comètes (méthode neutre) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation.....	59
Figure 24: Images de comètes (méthode neutre) démontrant différents niveaux de cassures d'ADN sans irradiation. ....	59
Figure 25: Image représentant une cassure double brin. ....	61
Figure 26: Formation de foci $\gamma$ -H2AX après exposition au BrdU et aux radiations. ....	62
Figure 27: Représentation schématique du cycle cellulaire de cellules CHO-K1. ....	64
Figure 28: Histogrammes représentant l'expression de $\gamma$ -H2AX. ....	64
Figure 29 : Représentation graphique de l'intensité des foci $\gamma$ -H2AX chez des cellules traitées au BrdU et exposées aux radiations de 0 à 8 Gy.....	66
Figure 30 : Images de comètes (méthode Olive pH 12).....	67
Figure 31 : Image de comète (méthode neutre). ....	68

## Liste des tableaux

Tableau 1: Comparaison du nombre et du type de lésions produites dans l'ADN.....	8
Tableau 2: Taux de remplacement de la thymidine par le BrdU. ....	42
Tableau 3: Toxicité du BrdU et TdR après irradiation des cellules traitées avec ou sans acétone. ....	48
Tableau 4: Résultats chiffrés de l'expression de $\gamma$ -H2AX. ....	65
Tableau 5: Représente la quantité de sel, le pH et la présence ou non d'EDTA composant les solutions de lyse des trois versions comètes alcalines. ....	74

## Liste des abréviations

AbrU	Bromodeoxyuridine substituted oligonucleotide
ATM	Ataxia telangiectasia mutée
AT	Non-bromodeoxyuridine substituted oligonucleotide
Br <sup>•</sup>	Atome de brome radicalaire
Br <sup>-</sup>	Atome de brome anionique
BrdU	5-bromodéoxyuridine
BrdUrd	5-bromodéoxyuridine
BrdUMP	5-bromodéoxyuridine monophosphate
BrdUDP	5-bromodéoxyuridine diphosphate
BrdUTP	5-bromodéoxyuridine triphosphate
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
CH <sub>3</sub>	Groupement méthyle
dUrd <sup>•</sup>	Radical déoxyuridinyle
dUrd <sup>-</sup>	Anion déoxyuridinyle
e <sup>-</sup>	Électron
e <sub>aq</sub> <sup>-</sup>	Électron aqueux
EDTA	Acide éthylène diaminetétraacétique
FACScan®	Marque déposée de Becton Dickinson pour cytomètre à flux
FBS	Sérum fœtal bovin
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
Gy	Gray (J.Kg <sup>-1</sup> )
H <sup>-</sup>	Anion hydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HR	Recombinaison homologue
ICL	Interstrand cross-links
LMP	Low melting point
NHEJ	Nonhomologous end-joining

OH <sup>-</sup>	Anion hydroxyle
PBS	Phosphate buffer saline
PE	Plating efficiency
PIKK	Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinases
PPi	Pyrophosphate
TBE	Tris/Borate/EDTA
TEL	Transfert d'énergie linéaire

## **I. Introduction**

### **I.1. La radiothérapie**

La radiothérapie est aujourd'hui le traitement le plus répandu pour traiter le cancer. Au cours de l'évolution de leur maladie, environ 50 % des personnes atteintes du cancer vont recevoir de la radiothérapie (TANEJA *et al.*, 2004; HOLLER *et al.*, 2009). Cette thérapie est utilisée pour réduire le volume d'une tumeur avant une chirurgie ou comme traitement curatif. Ce type de traitements consiste à détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité de se multiplier, car les cellules saines ont un système de réparation plus fonctionnel que les cellules tumorales. Ce sont des lésions générées dans la cellule et plus particulièrement au niveau de l'ADN qui mènent à la mort cellulaire. C'est au Canada, au début des années 50, que le premier appareil au Cobalt 60 pour le traitement des malades atteints du cancer a été conçu et mis au point. Aujourd'hui, les rayonnements ionisants proviennent plutôt des accélérateurs linéaires.

### **I.2. Les dommages et conséquences du rayonnement ionisant sur l'ADN**

#### **I.2.1. Rayonnement ionisant et effets sur la matière**

Le rayonnement gamma est constitué d'ondes électromagnétiques qui se propagent dans la matière en y déposant de l'énergie tout au long de leur trajet. Ce type de rayonnement a la propriété de créer des ions et des radicaux libres réactifs. En traversant les tissus sains ou cancéreux, le rayonnement gamma endommage l'ADN cellulaire par plusieurs phénomènes physiques et chimiques. L'atteinte de l'ADN

provoquera la formation de radicaux instables. Ces derniers seront responsables de lésions soit :

1. des dommages aux bases : simples, multiples et interbrins;
2. des dommages aux sucres : cassures simple brin, cassures double brin et de modifications au désoxyribose.

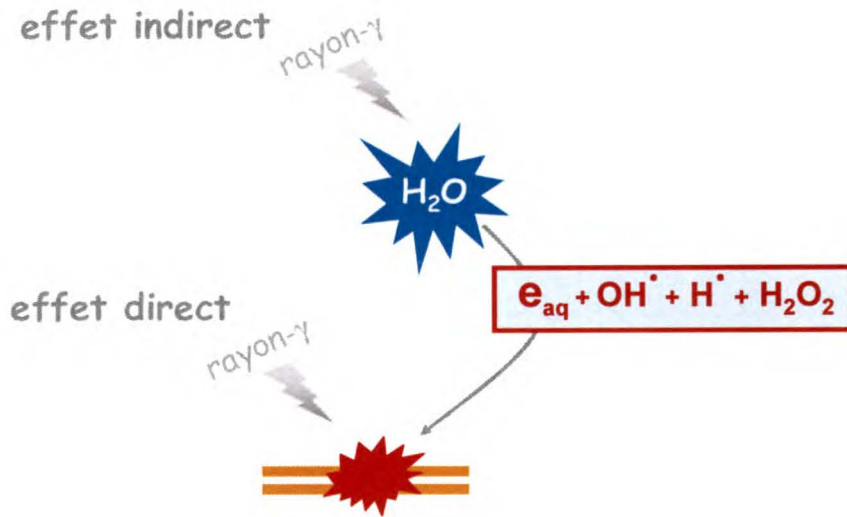
Ces phénomènes découlent du transfert d'énergie du photon à la matière. Ils sont plus précisément définis par la notion de TEL (quantité d'énergie déposée par unité de longueur de trajectoire). Comme l'efficacité biologique relative (EBR) est reliée au TEL, on peut caractériser le pouvoir d'agression biologique des différents types de radiation. Lorsque le rayonnement gamma dépose son énergie, il y a formation d'ionisation dans la matière. Dans le cas d'un TEL faible, les grappes d'ionisation seront dispersées. Il y aura également présence de radicaux très réactifs au sein de la matière tout en présentant une EBR importante. Le rayonnement gamma induit l'ionisation et l'excitation de l'eau ainsi que des molécules d'intérêt biologique. Son pouvoir de pénétration dans la matière est également élevé. Le cobalt <sup>60</sup> émet deux photons d'une énergie de 1,17 et 1,33 MeV (HALL, 2000).

### **I.2.2. Effets des radiations ionisantes sur l'ADN**

Deux types d'effets sont produits lors de l'interaction des rayons ionisants avec l'ADN : l'effet direct et l'effet indirect (figure 1). L'effet direct résulte d'une interaction directe de la molécule d'ADN avec les photons et les électrons produits par le rayonnement. Dans le cas de l'effet indirect, l'interaction se produit entre les espèces

réactives (provenant de la radiolyse de l'eau) et l'ADN. Au niveau cellulaire, c'est l'effet indirect qui prédomine lors du rayonnement gamma et serait de l'ordre de 50 à 70% (VON SONNTAG, 2005). Ces différentes interactions avec l'ADN auront pour effet d'induire plusieurs types de lésions pouvant être fatales pour une cellule (GULSTON *et al.*, 2004). De tous les dommages, ce sont les lésions cluster, comme les bris double brin qui sont les plus néfastes. Difficilement réparables par les différents mécanismes de réparation cellulaire, les cassures double brin peuvent entraîner de l'instabilité génétique, des mutations de gène prédisposant la cellule à une transformation néoplasique ou éventuellement la mort cellulaire (MADIGAN *et al.*, 2002). Les radiations ionisantes, entre autres rayon-X, rayon- $\gamma$ , exposent l'ADN à la formation de cassures double brin, mais ce genre de lésions peut également être d'origine physiologique comme pendant la méiose, la réplication et la recombinaison V(D)J. Ce mécanisme de réparation assure l'évolution d'un système immunitaire diversifié fonctionnel par le réarrangement somatique des gènes entraînant par le fait même la formation de cassures de l'ADN (DE VILLARTAY, 1999).





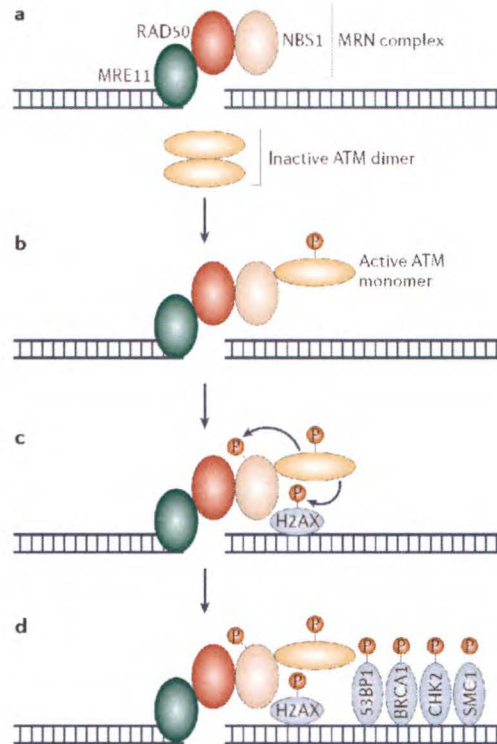
**Figure 1:** Représentation schématique des effets directs et indirects.

Effets principaux d'interaction causés suite à une irradiation ionisante sur l'ADN.

### I.2.3. Signalisation cellulaire en réponse aux radiations ionisantes

La protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated) est impliquée dans la signalisation des lésions double brin de l'ADN, engendrées entre autre par les radiations ionisantes (STIFF *et al.*, 2004). Cette protéine fait partie de la famille des phosphoinositols 3-kinases (Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinases) impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, le trafic intracellulaire et le maintien de l'intégrité du génome (KHANNA *et al.*, 2001). ATM est la principale protéine qui enclenche une cascade de signalisation en réponse aux cassures double brin de l'ADN. Lors de la formation d'un bris, le changement de structure de la chromatine induirait la mobilisation d'ATM au site endommagé (REDON *et al.*, 2002) par l'intermédiaire d'un complexe de protéines appelé MRN (figure 2). Lorsqu'une

cassure survient, ce complexe composé de trois protéines (Mre11/Rad50/Nbs1) est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM.

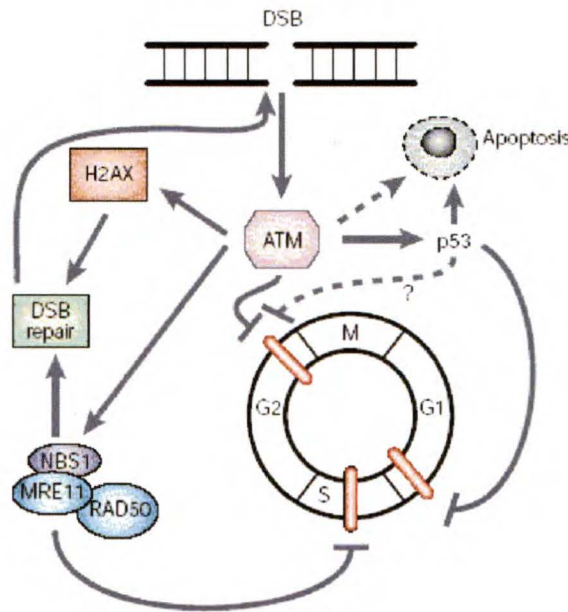


**Figure 2:** Voie de signalisation d'ATM (MRN).

Suite au dommage, plusieurs protéines interagissent afin de pouvoir réparer l'ADN. Proviens de Hu Yang *et al.*, 2006.

Normalement présent dans la cellule sous forme de dimère inactif, l'interaction d'ATM avec Nbs1 entraîne une auto phosphorylation au niveau de la sérine 1981 (BARTEK *et al.*, 2004). Cette dédimérisation active la protéine ATM qui phosphoryle ensuite une série de protéines (H2AX, Nbs1, 53BP1, Brca1, Chk2 et SMC1). Elle intervient en différents points du cycle cellulaire pour bloquer le cycle avant la réplication ou la mitose d'une cellule dont le patrimoine génétique est altéré (BAKKENIST et

KASTAN, 2003). L'arrêt du cycle attribue à la cellule le temps nécessaire pour effectuer la réparation de son ADN. ATM joue un rôle important dans la réponse cellulaire pour prévenir le cancer. Mais lorsque les dommages s'avèrent trop importants, la signalisation se ferait plutôt vers la voie p53 afin de faire entrer la cellule en apoptose (MCKINNON, 2004). Les lignées cellulaires déficientes en ATM, appelées cellules AT, démontrent un effet d'hypersensibilité aux radiations ionisantes mais pas aux rayonnements UV ou aux agents qui bloquent la réplication. Les cellules AT omettent l'arrêt du cycle cellulaire aux points de contrôle : G1-S, intra-S et G2-M (figure 3).



**Figure 3:** Représentation schématique de l'interaction de la protéine ATM.

ATM (supporté par d'autres protéines) contrôle le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire suite à un dommage. Provient de van Gent *et al.*, 2001.

Deux autres protéines ATR et DNA-PKcs font partie de la même famille avec une activité protéine kinase. Elles régulent la réparation de l'ADN à la fois de façon

indépendante et conjointe. Comme décrite précédemment, ATM joue un rôle en réponse à un stress environnemental ou radiolytique comme les radiations ionisantes. ATR (Ataxia-Telangiectasia Related) répond aux dommages causés par un stress réplicatif induit par les rayons UV (ABRAHAM, 2001). Mais comme les adduits occasionnés par les UV peuvent conduire à la formation de bris double brin lors de la réplication, ATR joue aussi un rôle de soutien (backup) face aux bris double brin induites par les radiations ionisantes. DNA-PKcs est une protéine engagée dans la voie NHEJ pour la réparation des bris double brin. Cette protéine forme avec l'hétérodimère Ku70/Ku80 un complexe trimérique nommé holoenzyme DNA-PK qui permet la reconnaissance des cassures double brin (ROGAKOU *et al.*, 1999). La protéine DNA-PKcs possède une activité kinase. Elle participe à la phosphorylation de plusieurs protéines (artémise, XRCC1) essentielles au bon déroulement du processus de NHEJ (LÉVY *et al.*, 2006).

### **I.2.4. Réparation des dommages à l'ADN**

Toutes les molécules d'une cellule peuvent être altérées par les radiations. Cependant, c'est la molécule d'ADN qui est la cible biologique la plus critique. L'altération de sa structure peut mener à des conséquences biologiques à court terme (mortalité cellulaire) et à long terme (mutation et cancer) (OLIVE, 1998; HOEIJMAKERS, 2001). Ce sont les radicaux instables formés lors de la radiolyse de l'eau ou lors de l'ionisation de l'ADN qui sont responsables de lésions (tableau 1).

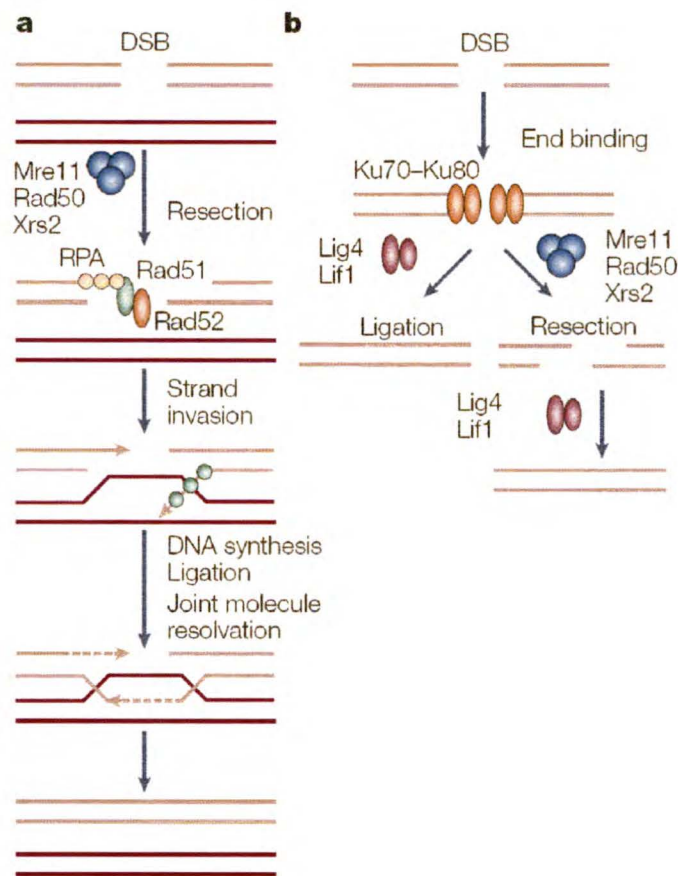
**Tableau 1:** Comparaison du nombre et du type de lésions produites dans l'ADN.

Les lésions peuvent être générées de façon spontanée ou induites par le rayonnement ionisant. Provient de Gérard et Schlumberger, 2007.

Domage ADN	Lésions spontanées /cellule/j	Lésions radio-induites /Gy
Cassure simple brin	10 000 - 55 000	1 000
Perte de base	12 600	Non évaluée
Domage de base	3 200	2 000
Cassure double brin	8	40
pont ADN/ADN	8	30
pont ADN-proteine	quelques	150
sites multilésés de l'ADN (LMDS)	Non évalué	quelques

Cependant, la cellule peut faire appel à différents mécanismes de réparation dont certains sont assez complexes et impliquent plusieurs protéines et une multitude d'étapes. Plusieurs voies de réparation dépendent de la sorte de dommage généré et de l'endroit du cycle cellulaire au moment de la formation du dommage. Les lésions les plus redoutables sont les sites multilésés constitués de cassures double brin (EOT-HOULLIER *et al.*, 2005). Ces lésions sont au cœur des effets les plus délétères pour l'ADN. Ces dommages peuvent être réparés par l'une ou l'autre des deux voies de réparation suivante, soit la recombinaison homologue (HR) ou la recombinaison non homologue (NHEJ) (figure 4) (KRÜGER *et al.*, 2004). HR utilise un segment homologue à la région endommagée (comme les chromatides sœurs) pour réparer le dommage. Il n'y aura pas de perte de séquence. NHEJ permet la religation des 2 brins d'ADN endommagés même s'il y a très peu de similitude entre elles. Cependant, il en résulte une délétion ou insertion à l'endroit du dommage, ce qui peut donner des réarrangements chromosomiques. Ce mécanisme est moins précis car il y a une perte de séquence. Les 2 voies de réparation

seraient utilisées à certains moments du cycle cellulaire. NHEJ est utilisé lorsque la cellule est en G1 et qu'une seule copie du gène est disponible. Alors que HR est employée lorsque l'ADN répliqué peut fournir une 2<sup>e</sup> copie de la séquence, soit en G2. Les deux voies peuvent également coopérer ensemble pour augmenter l'efficacité de la réparation (ROTHKAMM *et al.*, 2003).



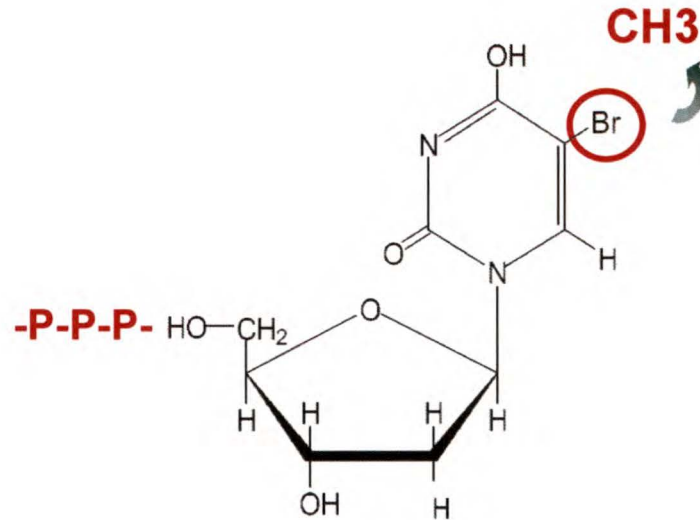
**Figure 4:** Réparation des dommages double brin.

La voie **a** représente la recombinaison homologue (HR) et la voie **b** représente la recombinaison non homologue (NHEJ). Provient de van Attikum et Gasser, 2005.

### **I.3. Utilisation de radiosensibilisateur en radiothérapie**

#### **I.3.1. 5-Bromodéoxyuridine**

La dose de radiothérapie pouvant être donnée à un patient est limitée à cause des effets secondaires qu'une forte dose peut occasionner. L'utilisation de la radiothérapie combinée à certaines drogues sélectives permettrait d'augmenter l'effet létal des radiations envers les cellules tumorales. Le radiosensibilisateur étudié dans notre laboratoire est le 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU). Le 5-bromo-2'-désoxyuridine (figure 5) est un nucléoside analogue de la thymidine. Son atome de brome a une taille comparable au groupement méthyle de la thymidine qu'il remplace. Le BrdU peut-être incorporé lors de la réplication de l'ADN et a peu d'effet sur la structure tertiaire de cette dernière. Le BrdU fait donc partie des rares drogues pouvant s'incorporer dans l'ADN (HALL, 2000). C'est au début des années 1960 que les propriétés radiosensibilisatrices du BrdU furent découvertes. Une équipe de recherche (DEWEY et HUMPHREY, 1965) a démontré en 1965 la relation entre une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques et la quantité de BrdU incorporée aux cellules.



**Figure 5:** Structure chimique de la molécule 5-Bromodéoxyuridine (BrdU).

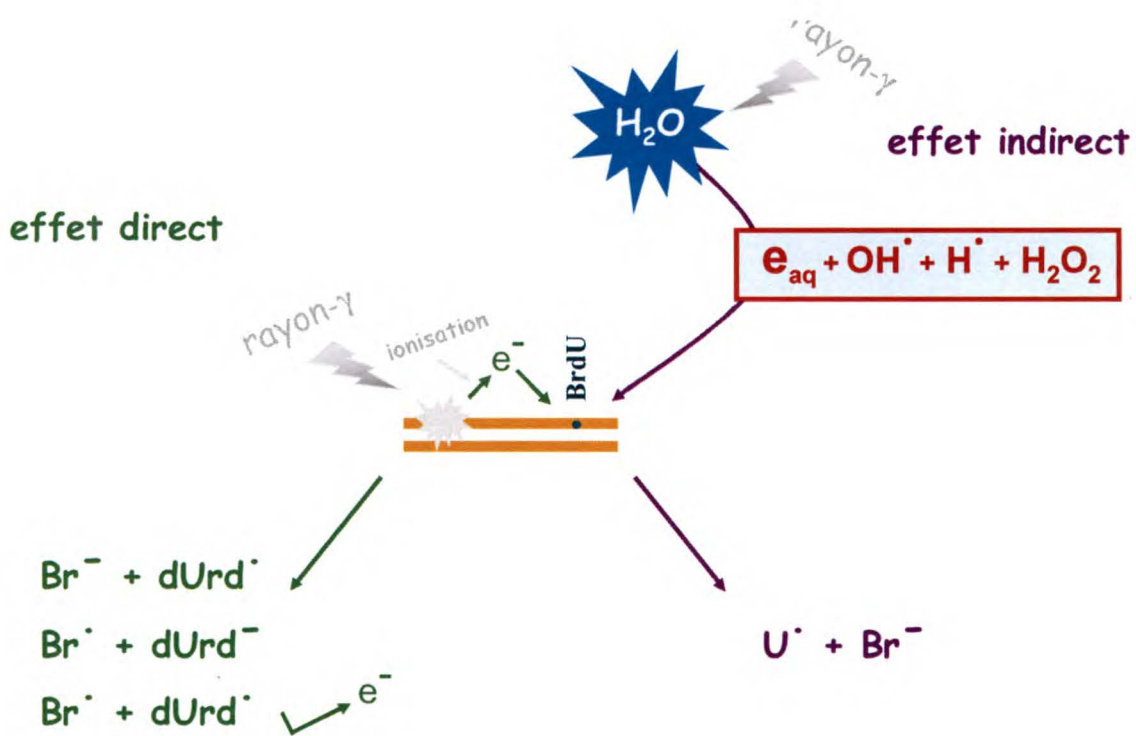
Remplacement du groupement méthyle par une molécule de brome. La thymidine kinase ajoute des groupements phosphates afin de permettre l'incorporation de la molécule BrdU à l'ADN par les ADN polymérase. Tiré de [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

### I.3.2. BrdU et mécanismes d'action

Les mécanismes de radiosensibilisation (figure 6) du BrdU ne sont pas encore complètement élucidés (WANG *et al.*, 2006). Cependant, le bromouracile aurait une plus grande facilité que la thymine à réagir à la suite de la capture d'un électron aqueux (effet indirect) (ZIMBRICK *et al.*, 1969a, b). C'est également l'effet indirect qui serait responsable des cassures simple brin engendrées par le BrdU (NABBEN *et al.*, 1982). Ce dernier, pouvant réagir avec les électrons aqueux générés par radiolyse de l'eau, passerait par un anion transitoire (intermédiaire anionique), s'ensuivrait du départ de  $\text{Br}^-$  et il y aurait par la suite création d'une molécule d'uracile radicalaire réactive. Ce radical uracilyl très réactif peut arracher un hydrogène sur le sucre proximal de la base en 5' et produire des bris simple brin à l'ADN (LIMOLI et WARD, 1994).



La formation de cassures double brin passerait plutôt par l'interaction d'un électron secondaire qui frapperait directement l'ADN. Trois réactions peuvent se produire soit (1)  $\text{Br}^- + \text{dUrd}^\bullet$  qui représente la réaction la plus observé, (2)  $\text{Br}^\bullet + \text{dUrd}^-$  et (3)  $\text{Br}^\bullet + \text{dUrd}^\bullet$ .  $\text{U}^\bullet$  et  $\text{Br}^\bullet$  sont deux radicaux réactifs.  $\text{U}^\bullet$  va attaquer un brin de l'ADN et  $\text{Br}^\bullet$  (très réactif) va attaquer l'autre brin ce qui peut conduire à la formation de cassures double brin de l'ADN (CECCHINI *et al.*, 2004).

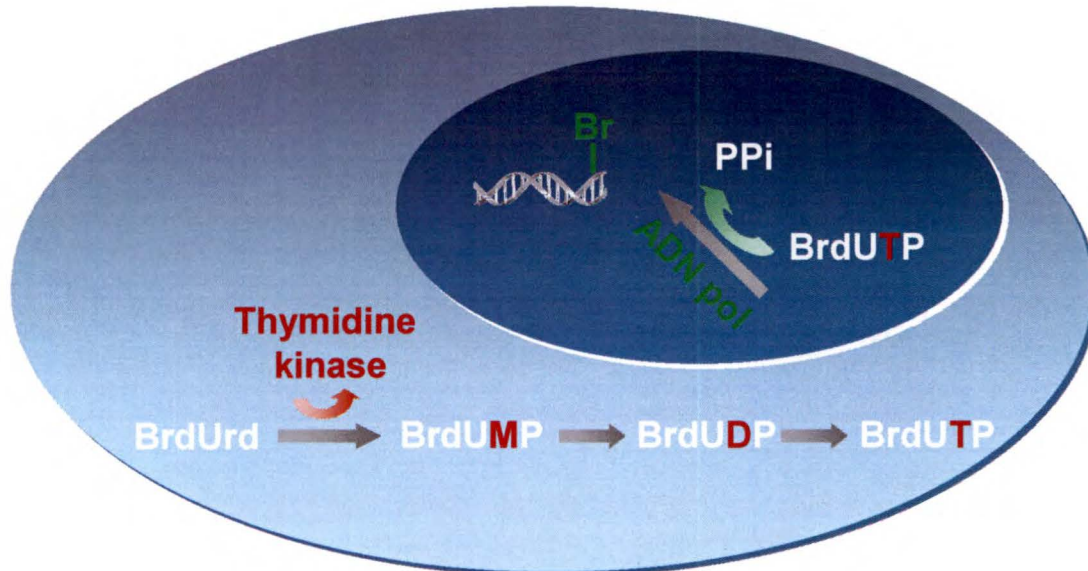


**Figure 6:** Réactions engendrées suite à l'irradiation d'une molécule bromée.

Pouvant conduire à une cassure simple brin de l'ADN (effet indirect) ou à une cassure double brin de l'ADN (effet direct).

### I.3.3. BrdU et cellules

Le BrdU est incorporé à l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire par l'ADN polymérase (phase pendant laquelle la sensibilité des cellules tumorales aux radiations est accrue) ou lors de la réparation. Cependant, le BrdU doit d'abord être phosphorylé par l'enzyme thymidine kinase (ACKLAND *et al.*, 1988) afin de pouvoir faire partie de l'ADN (figure 7). Ce nucléoside ne semble pas ou très peu reconnu par la cellule comme étant exogène ou altéré (BERRY *et al.*, 1999).



**Figure 7:** Phosphorylation du BrdU par la thymidine kinase et incorporation au brin d'ADN par l'ADN polymérase.

En générale, les cellules cancéreuses se répliquent plus rapidement que les cellules dites normales. L'incorporation du BrdU pourrait donc y être supérieure. On peut remplacer jusqu'à 50% des thymidines par le BrdU (HAKALA, 1959). Dans les années 90, plusieurs études ont été faites sur la radiosensibilisation des cellules par le BrdU. Il a

été démontré que le pourcentage de substitution de thymidine par le BrdU corrélait avec le degré de radiosensibilisation. L'incorporation du BrdU réduit de façon significative la valeur de  $D_{50}$  (correspondant à la dose létale moyenne, pouvant réduire de 37 pourcent le nombre de cellules vivantes dans la partie exponentielle d'une courbe de survie) et l'épaulement  $D_q$  (section de la courbe sous laquelle, il y a peu ou pas de mortalité cellulaire) d'une courbe de survie (LING et WARD, 1990).

### **I.3.4. Remise en question des effets des radiations sur un ADN bromé**

Il est reconnu depuis longtemps que la présence de BrdU dans un ADN cellulaire engendre des cassures simple et double brin lorsque soumis aux radiations ionisantes (WEBB *et al.*, 1993). Mais de nouvelles études ont également révélé que l'augmentation des dommages radio-induits serait plutôt dépendante de la structure de l'ADN et aussi des conditions d'irradiation. Les effets radiosensibilisants du BrdU seraient plutôt limités aux régions simple brin (CECCHINI *et al.*, 2004), ce qui laisse croire que le BrdU serait efficace comme radiosensibilisateur seulement pour certaines régions comme les bulles de transcription, les fourches de réplication, les sites de mésappariement et les boucles des télomères. Cette première étude a démontré que le BrdU augmente la présence de dommages causés par l'irradiation gamma, comparativement à un ADN non bromé. Toutefois, c'est l'ADN simple brin qui démontrerait le plus de dommages alors qu'un ADN parfaitement hybridé ne serait pas radiosensibilisé.

Un autre type de dommages causé par la présence de BrdU a également été observé pour la première fois : la formation de dimères interbrins (CECCHINI *et al.*, 2005) induits par des rayons ionisants dans un ADN bromé. Ce genre de dommages est

reconnu comme étant très toxique pour la cellule en division (MOGI et OH, 2006). La toxicité serait causée par deux mécanismes, premièrement la formation de dimères empêcherait la séparation des brins inhibant la transcription et la réplication. Deuxièmement, les mécanismes de réparation des dimères sont complexes et conduiraient à la génération de mutations et de réarrangements chromosomiaux (PLOOY *et al.*, 1985; GUNTHER *et al.*, 1995; ZHENG *et al.*, 2003). Cette formation de dimères interbrins serait exclusivement produite dans les régions simple brin.

### **I.4. Essai comète**

La technique d'électrophorèse sur microgel a été développée par Ostling et Johanson en 1984 (OSTLING et JOHANSON, 1984) et permet de mesurer des bris causant la relaxation de l'ADN superenroulé. Cette technique consiste à enrober dans de l'agarose, à bas point de gélification, des cellules irradiées et de les déposer sur une lame de verre pour microscopie. Les lames sont ensuite immergées dans une solution neutre contenant du détergent ainsi qu'un haut taux de sels afin de lyser la membrane plasmique des cellules. L'application d'un faible voltage électrique permet la migration de l'ADN du noyau vers l'anode. Après coloration de l'ADN à l'aide de colorant de l'ADN, on peut observer la migration plus prononcée d'un ADN ayant subi des dommages comparativement à un ADN intacte. La région de la tête représente l'ADN intacte qui est resté à l'intérieur du noyau et la queue représente l'ADN fragmenté qui a migré hors du noyau. La différence de migration peut-être quantifiée et permet de mesurer les dommages induits dans une cellule au moment du traitement. Par la suite, en 1990, le terme essai comète a été attribué à cette technique car l'aspect des cellules observées au

microscope présentait l'allure d'une comète, comprenant au centre l'ADN à haut poids moléculaire et une queue contenant l'ADN fragmenté. Depuis, plusieurs variables ont été exploitées afin d'accroître la sensibilité et la spécificité de la technique.

L'utilisation de cette méthode permet la détection des dommages dans l'ADN de manière sensible et permet également de mesurer la réparation. Cette technique est de plus en plus employée pour des études toxicologiques génétiques, le biomonitoring en environnement clinique et le domaine de la recherche de dommage et de réparation de l'ADN (LEE *et al.*, 2004; DUSINSKA et COLLINS, 2008). C'est un test simple d'utilisation, rapide et sensible (COLLINS, 2004) pouvant détecter des dommages induits à 5 cGy pour la méthode alcaline et à 2 Gy pour la méthode neutre (OLIVE *et al.*, 2001). La sensibilité de la méthode alcaline vient du fait que certains dommages (comme les sites alkali) seraient seulement révélés à un pH plus élevé (LACOSTE *et al.*, 2006). L'essai comète est devenu une méthode standard utilisée par plusieurs laboratoires pour évaluer les dommages et la réparation des brins d'ADN.

### **I.4.1. Comète alcaline**

La méthode comète alcaline a été développée par Singh en 1988 (SINGH *et al.*, 1988). Il a introduit la méthode alcaline à l'essai comète. Les coupures simple brin déroulent les supertours et détendent l'ADN mais ne produisent pas de petits fragments. Pour optimiser la dénaturation et la migration de l'ADN simple brin, l'utilisation de conditions alcalines a donc été apposée. Une lyse à pH alcalin permet la dénaturation de l'ADN. Ce qui permet l'évaluation de bris simple à la double hélice d'ADN, mais également des cassures double brin, ainsi que de sites alkali labile (abasique). Il faut

noter que le nombre de cassures générées par 1 Gy de rayonnement gamma est de 1000 cassures simple brin et de 40 cassures double brin (LIMOLI et WARD, 1993). La méthode alcaline est donc plus sensible à la détection de cassures simple brin que double brin.

#### **I.4.2. Comète neutre**

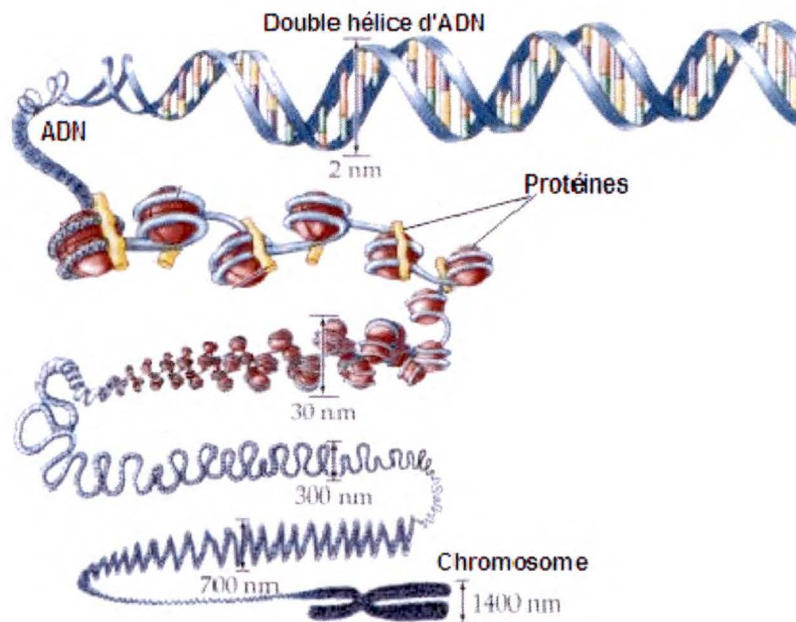
Un autre groupe de chercheurs a également modifié radicalement la méthode neutre pour faciliter la détection des bris double brin. Le groupe d'Olive a développé une technique où la lyse se fait dans des conditions non dénaturantes. Les coupures double brin engendrant déjà des petits fragments, on n'a donc pas besoin de dénaturer l'ADN pour faire migrer ces fragments (on peut noter que les bris simple brin peuvent aussi être révélés par la méthode neutre si les bris sont produits de manière indépendante sur les deux brins opposés de façon très rapprochés). Même si la lyse est faite dans des conditions non dénaturantes, elle permet d'enlever les protéines de l'ADN (OLIVE *et al.*, 1991). On peut donc affirmer que les conditions neutres de la technique se limitent à la détection des bris double brin de l'ADN.

### **I.5. Biomarqueur des bris double brin de l'ADN : gamma H2AX**

#### **I.5.1. Chromatine**

Le matériel génétique diploïde représente chez l'humain  $6 \times 10^9$  paires de bases et est d'une longueur d'environ 2 mètres (REDON *et al.*, 2002). L'ADN doit être compacté afin de pouvoir être contenu dans les quelques  $\mu\text{m}$  de diamètre que forme le noyau d'une

cellule. L'empaquetage donne une structure nommée la chromatine, composé d'ADN et de protéines appelées histones. Une suite de niveaux de compaction (figure 8) allant du nucléosome (premier niveau de compaction) au chromosome métaphasique (niveau de condensation le plus élevé) permet de condenser l'ADN tout en restant accessible aux protéines et permettant la réplication, la réparation et la recombinaison.



**Figure 8:** Niveaux de condensation de l'ADN.

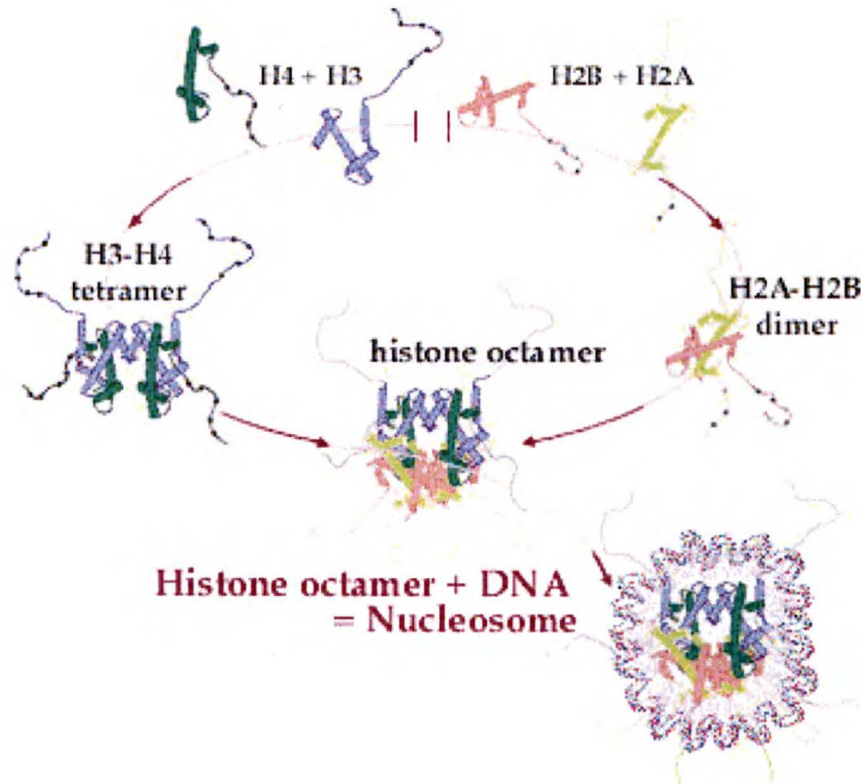
Provient de [www.journaldunet.com](http://www.journaldunet.com)

### **I.5.2. Les histones**

Les histones sont des protéines nucléaires riches en acides aminés basiques (lysine et arginine) chargés positivement et pouvant interagir et s'associer avec l'ADN chargé négativement (phosphate). Le rôle des histones est la compaction de l'ADN. Certaines

histones sont assemblées pour former un octamère constitué des histones H3-H4 et H2A-H2B (figure 9) afin de pouvoir enrouler 146 paires de bases d'ADN (BILSLAND et DOWNS, 2005; TAKAHASHI et OHNISHI, 2005). L'induction de modification du nucléosome va permettre de moduler l'activité de la chromatine et permettre sa spécialisation fonctionnelle comme dans les cas de la réparation ou de la transcription de l'ADN. Trois voies permettent de différencier le nucléosome : soit le recrutement de complexes de remodelage du nucléosome, les modifications post-traductionnelles des histones et l'incorporation des variantes d'histones (PERCHE *et al.*, 2003). Les histones sont composées : d'une partie N-terminale, c'est cette partie qui différencie le plus les histones entre elles; d'une partie histone fold, pour le maintien de la structure du nucléosome; ainsi qu'une partie C-terminale, qui comprend un motif SQ, pouvant être phosphorylé par des protéines possédant une activité kinase (figure 10).



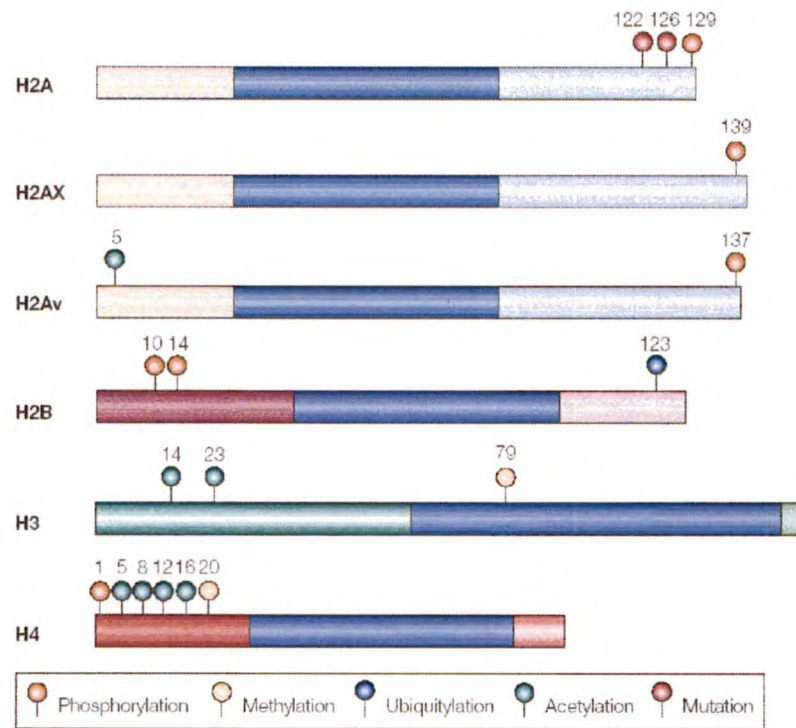


**Figure 9:** Représentation schématique de l'assemblage des octamères.

Ils sont constitués des histones H3-H4 et H2A-H2B permettant d'enrouler 146pb d'ADN.  
Provient de [www.nobelprize.org/.../pics/histone\\_octamer.gif](http://www.nobelprize.org/.../pics/histone_octamer.gif)

### I.5.3. Modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles (comme l'acétylation de lysines, la phosphorylation de sérines et thréonines, la méthylation de lysines et arginines et l'ubiquitination de lysines) subies aux parties amino- et carboxy-terminales des histones influenceront la structure de la chromatine et modifieront son état fonctionnel (EHRENHOFER-MURRAY, 2004).



**Figure 10:** Principales variantes d’histone et leurs modifications post-traductionnelles. Provient de van Attikum et Gasser, 2005.

#### I.5.4. Les variantes des histones

Les histones peuvent présenter des variations au niveau de leurs formes comme par exemples les histones H2AX et H2AZ (LEWIS *et al.*, 2003). Ce sont des variantes de l’histone conventionnelle H2A (LI *et al.*, 2005). Ces variantes permettraient la création de nouveaux complexes ADN protéines en favorisant le recrutement de facteurs régulateurs.

#### I.5.5. Structure et fonctions de la protéine H2AX

La séquence de H2AX est presque identique à celle de H2A. Son extrémité C-terminale est plus longue. Une séquence de 13 acides aminés a été ajoutée (MADIGAN *et*

*al.*, 2002). Son motif distinctif SQ est phosphorylable par les protéines membres de la famille des PIKK. Sa forme phosphorylée a été nommée  $\gamma$ -H2AX et constitue un marqueur de cassures double brin de l'ADN. La phosphorylation d'H2AX ( $\gamma$ -H2AX) jouerait un rôle de signalement pour indiquer la présence de bris à cet endroit. Le recrutement de facteurs de réparation et leur maintien aux régions endommagées (CELESTE *et al.*, 2003) auraient également un rôle de conservation de l'intégrité du génome en réponse aux cassures double brin de l'ADN.

### **I.5.6. Induction de la forme phosphorylée de H2AX**

En présence de bris double brin, le motif SQ de la partie C-terminale est la cible des PIKK sur une sérine en position 139 (PARK *et al.*, 2006). Les modifications post-traductionnelles des queues des histones permettent de réguler l'accès aux lésions dans l'ADN et de recruter les enzymes de réparation. C'est l'équipe du Dr William Bonner (ROGAKOU *et al.*, 1998) qui a démontré en 1998 que le fait d'exposer des cellules à des radiations ionisantes donnait lieu à la phosphorylation de l'histone H2AX. Ils ont attesté que la formation de  $\gamma$ -H2AX (forme phosphorylée) était rapide et sensible à la présence de bris double brin. Ce qui fait d'H2AX un excellent biomarqueur de cassures double brin, surtout grâce à l'existence d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée (anti-phosphoSer139). L'utilisation de cet anticorps dans des expériences effectuées avec un laser sissor (induisant des cassures double brin) a localisé l'endroit même où les dommages avaient été générés (CELESTE *et al.*, 2003). Immédiatement après l'induction de bris double brin dans la cellule, la distribution de  $\gamma$ -H2AX sous forme de foyers (foci) dans le noyau est apparente, dès les premières minutes pour atteindre un maximum à 30

minutes et ensuite être déphosphorylée (demi-vie de 2 heures). La formation de foci est rapide et serait de l'ordre de 0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$  dans les 60 minutes post-irradiation. Chaque foci est composé de milliers de molécules H2AX phosphorylées et couvrirait environ 2 Mb d'ADN autour du bris (MACPHAIL *et al.*, 2003). Ce qui rend chaque foci (foyer nucléaire) visible au microscope. La présence d'un foci représente un bris double brin (FERNANDEZ-CAPETILLO *et al.*, 2004). La phosphorylation de l'histone précéderait la réparation par les enzymes impliquées dans la voie de réparation HR ou la voie NHEJ. La modification d'H2AX résulterait en un changement de la chromatine qui servirait de signal pour le recrutement des enzymes de réparation de l'ADN (FILLINGHAM *et al.*, 2006). La phosphorylation du domaine SQ de H2AX décondenserait la chromatine et faciliterait la voie de réparation NHEJ en rendant accessible l'ADN endommagé aux facteurs de réparation (REDON *et al.*, 2002). Comme expliqué précédemment, l'induction de dommages à l'ADN cause un arrêt du cycle cellulaire afin de donner suffisamment de temps à la machinerie cellulaire de réparer pour empêcher la réplication d'un ADN aberrant. L'arrêt du cycle serait maintenu aussi longtemps que H2AX serait phosphorylée, empêchant l'association à l'ADN de protéines impliquées dans les points de contrôle. Il a été démontré (KEOGH *et al.*, 2006) que la déphosphorylation de  $\gamma\text{H2AX}$  par des phosphatases phosphosérine et sa dissociation de l'ADN était crucial au redémarrage du cycle cellulaire.

Plusieurs méthodes d'analyse peuvent être utilisées pour mesurer l'expression de  $\gamma\text{-H2AX}$ . Les principales sont l'immunobuvardage (FURUTA *et al.*, 2003), l'immunohistochimie (MACPHAIL *et al.*, 2003) et l'utilisation de la cytométrie de flux (Tanaka *et al.*, 2007). Cette dernière utilisation a été développée par un chercheur de

Vancouver qui a appliqué le FACS à la détection de  $\gamma$ -H2AX (MACPHAIL *et al.*, 2003). La cytométrie de flux offre l'avantage de pouvoir mesurer le changement d'intensité de  $\gamma$ -H2AX en relation avec la distribution dans le cycle cellulaire, suite à une irradiation aussi faible que 10 à 20 cGy (OLIVE et BANÁTH, 2004). Ce qui rend cette technique plus sensible que les méthodes conventionnelles utilisées auparavant comme par exemple l'essai "neutral filter elution". Les cellules possèdent un niveau endogène de H2AX phosphorylée qui semblerait plus accru en phase S et G2, associé avec la réplication des cellules. L'expression de  $\gamma$ -H2AX dans des cellules non irradiées serait 3 fois plus basse dans la phase G1 qu'en phase S ou G2. La sensibilité de détection des bris double brin pendant ces deux dernières phases serait donc réduite. Certains auteurs (MACPHAIL *et al.*, 2003) signalent que les foci des cellules répliquées présenteraient une taille plus petite que ceux produit par les irradiations X.

Le rôle de  $\gamma$ H2AX au site de bris double brin serait d'altérer la conformation de la chromatine pour recruter différents enzymes afin que la réparation de la brèche soit faite de façon plus efficace.

### **I.5.7. Activation des autres protéines par $\gamma$ -H2AX**

Après un bris, la protéine ATM n'étant plus dimérisées, elle peut phosphoryler H2AX. Cette dernière ira se localiser au site de bris pour faciliter l'exactitude de la réparation en identifiant précisément le lieu du dommage aux autres protéines. H2AX recrute plusieurs facteurs en réponse aux dommages : 53bp1 et Brca1 et Nbs1. Nbs1 recrute Chk2 et Smc1 pour y être efficacement phosphorylé par ATM. H2AX stabiliserait également le complexe de protéines au site de cassure.  $\gamma$ H2AX semble également

important pour retenir les protéines (MRN) au site endommagé et initier le recrutement des autres protéines (PAULL *et al.*, 2000).

### **I.6. Hypothèses et objectifs du projet de recherche**

Les récents résultats des études *in vitro* provenant du laboratoire de Dr Hunting démontrent que l'effet radiosensibilisant du BrdU est confiné aux régions simple brin ou dans une zone simple brin d'un ADN double brin. Ce qui est contraire aux hypothèses émises antérieurement dans la littérature datant des années 90 concluant que le BrdU augmente les cassures double brin. Les techniques utilisées à cette époque comme l'éluion neutre (ILIAKIS *et al.*, 1989) et le gel d'électrophorèse en champs pulsé (LAWRENCE *et al.*, 1995; PRISE *et al.*, 2001) étaient moins sensibles et moins précises.

Nos hypothèses pour expliquer cette controverse seraient que l'irradiation des cellules en présence de BrdU augmenterait le nombre de bris simple et que les bris double brin considérés dans la littérature seraient peut-être des dimères transformés en bris double brin au moment de la réparation. Certains auteurs affirment que la conversion des dimères interbrins en bris double brin déclencherait la phosphorylation de H2AX et favoriserait l'exactitude de la réparation (NIEDERNHOFER *et al.*, 2004).

Mon projet de recherche comporte deux objectifs. Le premier est de mettre en évidence les dommages engendrés au niveau nucléaire par le BrdU après irradiation par l'utilisation de l'essai comète. Le second objectif est de vérifier s'il y a présence de foyers nucléaires (foci)  $\gamma$ -H2AX. Cette technique est plus sensible à la détection des cassures double brin dans une cellule et pourraient enfin établir si oui ou non l'irradiation des cellules ayant incorporé du BrdU mène à l'induction de bris double brin.

## II. Matériel et methods

### II.1. Cellules et drogues

Dans le cadre de ce travail, des cellules CHO-K1 (Chinese Ovarian Hamster) ont été utilisées, généreusement fournies par le Dr Benoît Paquette, Université de Sherbrooke. Les cellules ont été cultivées dans du milieu MEM (Invitrogen, Burlington, Canada) complété avec 10% de sérum foetal de bovin foetal (FBS) inactivé par chauffage et 1 % de L-glutamine (Invitrogen). Les cellules CHO-K1 sont maintenues sous forme de monocouche dans des flacons 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Mississauga, Canada) en phase exponentielle à 37°C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO<sub>2</sub>.

Pour les expériences, les cellules sont détachées du flacon avec 0,25 % trypsine-1mM acide éthylènediamine-tetraacetic (EDTA) (Invitrogen), resuspendues dans du milieu complet pour inactiver l'action enzymatique de la trypsine, comptées à l'aide d'un compteur de cellules (Coulter Counter Model ZBI) et diluées pour ensuite êtreensemencées dans des boîtes de Pétri (Falcon) à des densités décrites pour chaque expériences (50 000-1 000 000 cellules/ml).

La concentration des nucléosides (BrdU et TdR) utilisées pour les essais a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre HITACHI U-2000. Les produits ont d'abord été dissous dans de l'eau à une concentration de 10 mM. La concentration de chacune des solutions a été déterminée selon la longueur d'onde d'absorption maximal de leurs spectres d'absorption et de leurs coefficients d'extinction molaire dans l'eau ( $\epsilon$  BrdU = 10 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 278 nm, pH 7,0) ( $\epsilon$  TdR = 9 700 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 267 nm, pH 7,2). Les solutions ont par la suite été ajustées à 10 mM, filtrées (0,22 µm Millex®, Millipore),

aliquotées et conservées à -20°C. Lors de leur utilisation, les solutions sont diluées dans du milieu complet (10 % FBS) afin d'obtenir des concentrations qui varient entre 0 et 20 µM.

## **II.2. Quantification du pourcentage d'incorporation du BrdU**

La quantité de BrdU incorporée dans l'ADN cellulaire a été mesurée par HPLC après digestion de l'ADN génomique par de la Nucléase P1 et par de la Phosphatase alcaline AP afin d'obtenir des nucléosides et des bases séparées et sans phosphate. Cette méthode a été développée dans le laboratoire du Dr Richard Wagner (Université de Sherbrooke) (RIVIÈRE *et al.*, 2006).

### **II.2.1. Étape d'extraction**

Après l'ensemencement de cellules ( $2,5$  à  $5 \times 10^5$ ) dans des boîtes de Pétri de 100 x 20 mm (Falcon) contenant 10 ml de milieu, 0, 2, 5 et 10 µM de 5-bromodéoxyuridine (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) sont ajoutés aux cellules et incubés pour une période de 24 heures. Les cellules sont ensuite récoltées, centrifugées (1200 RPM, 3 minutes) et lavées 2 fois avec du tampon phosphate (PBS). 400 µl de solution de lyse (0,1 M EDTA, 0,2 M Tris base, 1 % SDS et protéinase K (100 µg/ml final), pH 8.5) sont ajoutés au culot de cellules et incubés à 37°C entre 18-20 heures.



### **II.2.2. Étape de précipitation**

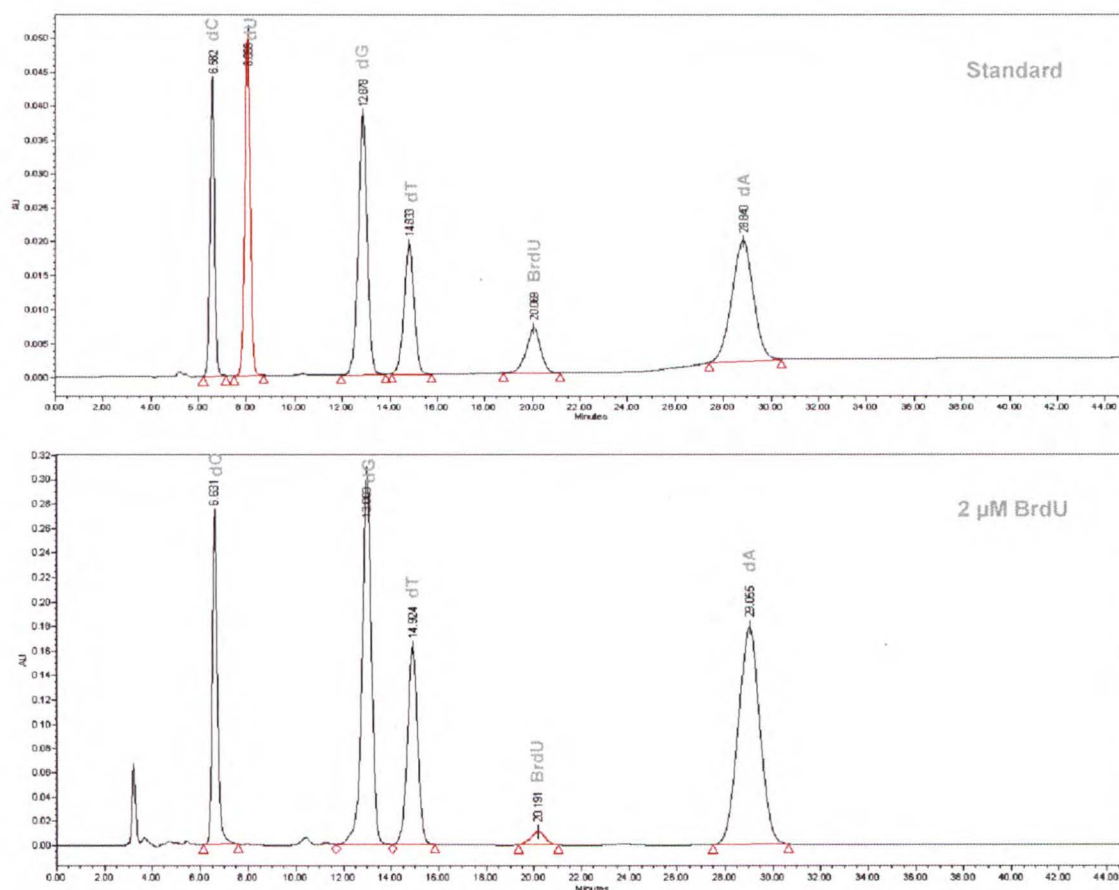
La précipitation de l'ADN avec 1 ml d'éthanol 100% et 200 µl d'ammonium acétate (7,5 M) permet d'éliminer facilement les impuretés. La formation d'un précipité est observé après une forte agitation des échantillons, suivie d'une incubation de 30 minutes à -80°C. L'ADN est récupéré à l'aide d'un capillaire à bout rond. Le capillaire est rincé dans 70 % puis 100 % d'éthanol (5 minutes par étape) et séché à l'air libre. L'ADN est ensuite resuspendu dans 200 µl de TE (10 mM Tris base pH 7,5 et 2 mM EDTA) additionné de RNase A (0.1 mg/ml) et T (350 U/ml) pour hydrolyser l'ARN qui pourrait contaminer l'ADN. Le tout est incubé dans un bain-marie à 37°C pour 18-20 heures, suivi d'une 2<sup>e</sup> précipitation et finalement resuspendu dans de l'eau.

### **II.2.3. Digestion enzymatique pour l'analyse HPLC**

L'ADN resuspendu est dénaturé à 95°C, pendant 5 minutes et déposé sur glace. Une incubation de 30 minutes à 50°C avec 1 U/µl de Nucléase P1 (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) reconstituée dans du tampon d'acétate de sodium pH 5.0 (50 mM), permet de séparer tous les nucléotides de l'ADN. L'enzyme est dénaturée par une incubation à 95°C, 5 minutes et déposé sur glace. L'ajout de l'enzyme Phosphatase alcaline AP 1 U/µl (Roche, Mississauga, Ontario, Canada) 30 minutes à 4°C, permet de déphosphoryler chaque nucléotide. Les protéines restantes sont extraites avec du chloroforme et centrifugées à 13 000 RPM à 4°C pendant 5 minutes. La phase aqueuse est récupérée et transférée dans un vial pour injection sur HPLC.

## II.2.4. Analyse

Les échantillons contenant les nucléosides et les bases sont analysés sur HPLC Alliance system par détection UV à 254 nm (Waters, Milford, MA) à l'aide d'une colonne avec phase inversée (ODS-AQ 4.6 X 250 mm ; YMC™). L'éluant utilisé est composé d'une solution à 10 mM de phosphate de potassium dihydrogène (pH 5,5) contenant 10 % méthanol. Le programme Millenium (Waters version 4.0) a été utilisé pour l'analyse des échantillons. La préparation d'un standard de nucléosides (figure 11) et BrdU permet l'identification des chromatogrammes de chaque échantillon.



**Figure 11:** Profil du chromatogramme au HPLC. L'image du haut représente le standard de nucléoside et l'image du bas un échantillon contenant 2 µM BrdU.

### **II.3. Croissance cellulaire**

Afin de voir le ralentissement de la croissance cellulaire ou l'apparition de toxicité provoquée par le BrdU, le test de croissance cellulaire a été utilisé.  $5 \times 10^4$  cellules ont d'abord été ensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 x 15 mm, puis incubées 24 à 96 heures en présence de différentes concentrations de BrdU (ou TdR). Pour chacune des conditions testées, les cellules ont été trypsinisées, resuspendues dans du milieu complet et comptées à l'aide du Coulter Counter. La vitesse de croissance des cellules a été estimée par le temps de dédoublement cellulaire, calculé comme suit :

$$PD = \log (N_f / N_o) / \log 2$$

PD représente le temps de doublement,  $N_o$  le nombre initial de cellules et  $N_f$  le nombre final de cellules (GREENWOOD *et al.*, 2004).

### **II.4. Irradiation des cellules**

Le protocole d'irradiation est sensiblement le même pour toutes les expériences. Chaque expérience requérant l'utilisation de rayonnement a été faite à partir d'un irradiateur au  $^{60}\text{Co}$  (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Limited) délivrant une dose de  $1,98 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ . Deux principaux rayons sont émis de cet appareil, soient des rayons gamma de 1,17 et 1,33 MeV.

## II.5. Essais clonogéniques

La cytotoxicité du BrdU en combinaison avec la radiation a été évaluée à l'aide d'essais clonogéniques. Les cellules au nombre de  $5 \times 10^4$  ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60 x 15 mm et incubées pendant 4 heures dans du milieu complet (supplémenté de 10 % FBS). Le BrdU a par la suite été ajouté et les boîtes sont retournées à l'incubateur pour 18-20 heures. Avant l'irradiation, le milieu est retiré, les cellules ont été rincées 2 fois au PBS, trypsinisées et comptées au Coulter Counter. Les cellules ( $4 \times 10^4$ ) sont ensuite irradiées sur glace dans des tubes eppendorf avec du PBS. 200 à 400 cellules sont déposées dans de nouvelles boîtes de Pétri avec 5 ml de milieu de culture et incubées. Après 10 jours, les cellules sont rincées, fixées à l'éthanol et colorées au cristal violet (0,5 % dans de l'eau). Les colonies ayant plus de 50 cellules sont comptées. La thymidine a servie de contrôle négatif. Chaque échantillon a été calculé comme suit :

$$PE = \frac{\text{nombre de colonies formées}}{\text{nombre de coloniesensemencées}}$$

$$\text{Normalisé} = \frac{\% PE \text{ de l'échantillon}}{\text{valeur du contrôle non-bromé}}$$

PE (plating efficiency) représente le rapport entre le nombre de cellules ayant formées une colonie et le nombre de cellulesensemencées au départ (PILILI *et al.*, 2009).

## **II.6. Captation des électrons aqueux**

La captation des électrons aqueux a été réalisée dans les mêmes conditions que l'essai clonogénique sauf que l'on procède à une étape supplémentaire. Après avoir incubé les cellules avec ou sans BrdU pendant 18-20 heures, le milieu est retiré, les cellules sont rincées 2 fois au PBS, trypsinisées et comptées au Coulter Counter. On ajoute alors l'acétone à concentration de 1 mol/L, laisse reposer 10 minutes à température pièce et transfère sur glace 10 minutes. Les cellules sont ensuite irradiées sur glace et l'on poursuit comme dans le cas de l'essai clonogénique à la formation des colonies pour une période de 10 jours avant de colorer les cellules et d'effectuer le décompte de colonies.

## **II.7. Essai comète**

La formation de cassures des brins d'ADN a été décelée par essai comète.  $1 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 x 20 mm (Falcon) contenant 10 ml de milieu complet avec ou sans drogue. Après une incubation de 24 heures à 37°C, les cellules sont détachées avec de la trypsine et resuspendues dans du milieu et comptées. Elles sont ensuite diluées dans du PBS à une concentration de  $1 \times 10^5$  cellules par ml.

### **II.7.1. Préparation des lames**

Après irradiation sur glace, les cellules sont centrifugées à 2000 RPM, 1 minute. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est resuspendu dans 125 µl d'agarose LMP 1 % (Invitrogen, Burlington, Canada) dans du PBS et conservé à 37°C. Cinquante µl sont déposés sur une lame de microscope préalablement recouverte d'une fine couche

d'agarose 1 % (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) dans H<sub>2</sub>O et séchée. La lame (Surgipath, Winnipeg, MB) est immédiatement recouverte d'une lamelle de 12 mm x 12 mm et refroidie à 4°C pour quelques secondes. Avant de submerger les lames dans la solution de lyse, les lamelles sont préalablement retirées du dessus des lames.

### **II.7.2. Lyse et migration**

#### Méthode Collins pH 10

Les lames sont submergées dans une solution de lyse (2,5 M de chlorure de sodium, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris base et 1 % Triton X-100, pH 10) pour la nuit à 4°C. La lyse est suivie de 3 rinçages au PBS et d'une étape de déenroulement de l'ADN en émergeant les lames dans une solution fraîche alcaline (0,3 M NaOH et 1 mM EDTA, pH>13) sur la plateforme de la chambre à électrophorèse pour une période de 40 minutes. Après une migration de 15 minutes à 25 Volts, les lames sont à nouveau rincées 3 fois mais cette fois dans un tampon de neutralisation (0,4 M Tris base, pH 7,5) et laissées dans cette même solution pour une nuit à 4°C. Les lames sont par la suite colorées avec l'iodure de propidium.

#### Méthode Olive pH 12

Les lames sont submergées pendant 1 heure à température ambiante dans la solution de lyse (1,2 M de chlorure de sodium, 0,1 % N-laurylsarcosine et 0,03 M NaOH, pH 12). Deux rinçages de 30 minutes sont effectués dans la solution de migration (0,03 M de NaOH et 2 mM EDTA, pH 12). Les lames sont placées dans la chambre à

électrophorèse et migrées pendant 15 minutes à 25 Volts (0.8 V/cm). Une fois migrées, les cellules sont rincées dans l'eau et colorées.

### Méthode Olive pH>13

Les lames sont incubées dans la solution de lyse (1,2 M de chlorure de sodium, 0,1 M EDTA, 0,1 % N-laurylsarcosine et 0,255 M de NaOH, pH >13). Les lames sont ensuite rincées 3 fois 20 minutes dans la solution fraîche de migration (0,03 M de NaOH et 2 mM EDTA, pH 12). Les lames sont déposées dans la chambre à électrophorèse et migrées à 25 volts (0.8 V/cm) pendant 15 minutes. Les lames sont rincées dans l'eau et colorées.

### Méthode neutre

Ce protocole a été développé au laboratoire de Dr Olive (OLIVE *et al.*, 1991). Il en existe deux versions. La méthode utilisée dans ces travaux de recherche exploite la lyse à basse température. La lyse des cellules s'effectue dans la solution de lyse (0,1 M EDTA, 2 % N-laurylsarcosine et 0,5 mg/ml de protéinase K). Les cellules sont ensuite incubées dans un premier temps à 4°C pour 1 heure suivi d'une incubation à 37°C pour 18-20 heures. Les lames sont ensuite rincées 3 fois 30 minutes dans du TBE (90 mM de Tris base, 90 mM d'acide borique et 2 mM d'EDTA, pH 8). Les lames sont immergées dans une solution fraîchement préparée de TBE dans la chambre à électrophorèse et migrées à température ambiante pendant 15 minutes à 25 volts. Pour empêcher la rétraction de la queue des comètes après la migration, les lames sont transférées dans une solution à 1 % de peroxyde d'hydrogène pendant 20 minutes. Les lames sont rincées dans l'eau avant d'être colorées.

### **II.7.3. Coloration et analyse**

La coloration des lames a été effectuée soit avec le colorant nucléaire SYBR Gold (Invitrogen, Burlington, Canada) ou avec de l'iodure de propidium (Sigma Aldrich, Oakville, Canada). Les comètes sont visualisées par microscopie à épifluorescence à l'aide d'un microscope motorisé Olympus BX61 muni d'une lampe au mercure de 100W. La photodocumentation des images s'effectue à l'aide d'un système d'analyse d'image digitalisé (ISIS MetaSystem, Altussheim, Germany). Les images en format TIFF sont exportées et analysées avec le programme CASP (KONCA *et al.*, 2003). Les dommages sont représentés par l'augmentation de la valeur du tail moment (OLIVE *et al.*, 1991). Le tail moment est le produit du pourcentage d'ADN dans la queue et de la distance moyenne de distribution de la fluorescence entre la tête et la queue de la comète. 50 comètes sont analysées pour chaque condition.

### **II.8. Révélation des bris à l'aide d'un oligonucléotide bromé**

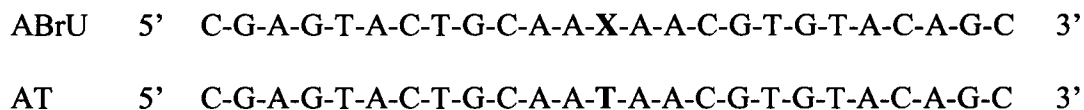
Un oligonucléotide bromé a été utilisé afin de déterminer si l'apparence des comètes était causée par la variation de pH des différentes solutions de lyse employées lors des essais comètes alcalines.

#### **II.8.1. Marquage en 5'**

Les oligonucléotides de 25 Mer simple brin substitués à la 13<sup>e</sup> base par une molécule de 5-bromodéoxyuridine, présentés dans la (figure 12) ont été synthétisés au University Core DNA Services (Université de Calgary, Alberta, Canada). Le marquage radioactif du bout 5' de l'oligonucléotide a été effectué à l'aide de <sup>32</sup>P [ $\gamma$ -ATP] (111 TBq



mmol-1) (PerkinElmer Life Sciences, Inc, Boston, MA) et de la kinase T4 polynucléotide (Amersham Pharmacia Biotech) à 37°C pour une période d'incubation de 45 minutes, suivi de l'inactivation de l'enzyme à 75°C pour 10 minutes. L'oligonucléotide marqué est purifié sur microcolonne de séphadex G50 pour extraire le <sup>32</sup>P [γ-ATP] libre. Comme contrôle, un oligonucléotide non bromé a été utilisé.



**Figure 12:** Séquence oligonucléotidique.

Le brin du haut représente la séquence bromée et le brin du bas, celui du contrôle non bromé.

### II.8.2. Traitement des échantillons

Les échantillons bromés et non bromés ont été dilués dans du tampon phosphate (10 mM, pH 7,5) et aliquotés dans des tubes eppendorf de 0.5 ml pour être ensuite traités avec les solutions de lyse utilisées pour les essais comètes. Chaque échantillon a été incubé (1 heure à température ambiante pour les techniques Olive pH 12 et 24 heures à 4°C pour les techniques Collins pH 10 et Olive pH>13). La lyse Collins pH 10 a été suivie d'une incubation de 40 minutes en présence de la solution de migration.

### **II.8.3. Désalage**

Pour enlever le maximum de sel, les échantillons sont à nouveau repurifiés sur colonne G50 et séchés à l'aide du speedvac (Speed Vac Concentrator, Savant) et resuspendus dans du tampon de migration composé de formamide.

### **II.8.4. Analyse des bris**

Les échantillons sont chargés sur un gel dénaturant composé d'urée 7 M et de 20 % acrylamide (35 X 43 cm). Un préchauffage à 45 W pour 30 minutes est effectué, suivi de la migration pour une durée de 2 heures 45 minutes à 40 W. Le gel est placé dans un écran phosphore pour une exposition de 18-20 heures à 4°C. La révélation des bandes est faite à partir du fluorescence scanning system (Storm, Molecular Dynamics Inc.) et quantifiée par l'utilisation du programme ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics Inc.). Un marqueur de poids moléculaire a été généré par dépurination à partir de l'oligonucléotide à température ambiante à l'aide d'acide formique suivie de la coupure des sites apuriniques par traitement à la piperidine à 90°C.

### **II.9. Analyse de $\gamma$ -H2AX**

L'accumulation cellulaire de  $\gamma$ -H2AX a été quantifiée à l'aide de deux méthodes. La méthode immunohistochimique a été utilisée pour dénombrer le nombre de foci individuellement présent dans chaque cellule. Tandis que l'utilisation de la méthode du cytomètre de flux permet de déterminer le taux de fluorescence dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les deux types expériences ont été réalisés avec les mêmes anticorps. La protéine  $\gamma$ -H2AX était marquée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti- $\gamma$ -

H2AX (1<sup>er</sup> anticorps) (Abcam, Cambridge, MA), ce dernier était ciblé par l'anticorps de chèvre anti-IgG lapin conjugué avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (2<sup>e</sup> anticorps) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Les brins d'ADN ont été marqués avec l'iodure de propidium (PI).

### **II.9.1. Analyse par décompte de foci (immunohistochimie)**

Les cellules ( $1 \times 10^4$ ) ont étéensemencées dans des plaques 12 puits (Falcon) où des lamelles rondes de microscope stériles (Fisher) avaient été préalablement déposées. Différentes concentrations de BrdU y ont été ajoutées pour une durée de 24 heures. Les plaques ont par a suites été lavées 2 fois avec du PBS et irradiées sur glace. Du milieu avec sérum a été ajouté aux cellules et celle-ci ont été incubées 30 minutes pour permettre la formation des foci. Les cellules sont ensuite fixées avec 2 % de paraformaldéhyde dans PBS à 4°C pour une période de 30 minutes et perméabilisées avec du méthanol (prérefroidi à -20°C) pour 10 minutes. Les lamelles sont bloquées avec du TBS (1 % BSA et 0,2 % tween-20) et sont ensuite incubées avec le 1<sup>er</sup> anticorps (1:1000 dans TBS) pour la nuit à 4°C, lavées trois fois avec TBS et incubées avec le second anticorps (1:500 dans TBS) pour 1 heure à température ambiante. Finalement, les lamelles sont lavées 3 fois avec TBS et montées sur lame avec du milieu de montage (Bio Rad, kallestad mounting media #30403) contenant 5 µg/ml d'iodure de propidium. Les images sont visualisées par microscopie à épifluorescence à l'aide d'un microscope motorisé Olympus BX61 équipé d'une caméra lentille 100 X et programme Isis. Le décompte des foci de chaque cellule peut-être fait de façon manuelle (à l'œil) si la quantité de dommage est faible ou a l'aide d'un programme informatique utilisant un seuil de fluorescence et

un ordre de grandeur pour l'aire des foci (YU *et al.*, 2006). Il existe également des microscopes automatisés permettant une image 3D d'une meilleure précision (réduit le chevauchement des foci) et rapidité d'analyse (BARBER *et al.*, 2007).

### **II.9.2. Analyse par cytométrie de flux**

Pour cette expérience,  $1 \times 10^6$  cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 x 20 mm. Après un traitement de 24 heures avec le BrdU, les cellules ont été irradiées sur glace et retournées 30 minutes à l'incubateur afin de permettre la formation de foci. Les cellules ont par la suite été fixées dans 70 % éthanol ajouté goutte-à-goutte et conservées à -20°C jusqu'au moment de l'analyse (moins que deux semaines). Du tampon Tris à pH 7.5 (TBS) est ajouté à chaque tube. Les cellules ensuite sont centrifugées et resuspendues dans 1 ml de TST (TBS froid contenant 4 % de sérum bovin foetal et 0,1 % de Triton X-100). Les cellules sont réhydratées pour une période d'environ 24 heures. Après centrifugation, 200 µl du premier anticorps (1:1000 dans TST) sont ajoutés et les tubes sont agités 2 heures à température ambiante. Après avoir été rincés et centrifugés, les culots de cellules sont resuspendus dans 200 µl du second anticorps (1:500 dans TST). Aucune liaison non-spécifique n'a été observée lorsque l'anticorps secondaire a été incubé seul. Les tubes sont retournés pour agitation 1 heure à température ambiante. Les cellules sont rincées et resuspendues dans du TBS contenant 2,5 µg par ml de PI avec RNase A (10 µg/ml). Les cellules fixées ont quelque fois tendance à former des agrégats qui peuvent être retirés par filtration à travers un filtre de nylon (Nitex, 110mm, Sephar Canada Inc.). Les échantillons sont analysés par cytométrie à flux (FACScan®, Flow Cytometer, Becton Dickinson) à une longueur d'excitation de

488 nm. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson). Le canal FL1 a servi pour la détection de la fluorescence verte du FITC et le canal FL2 pour la détection de la fluorescence rouge de l'iodure de propidium. L'utilisation du logiciel ModFit 2.0 (Becton Dickinson) permet la modélisation et l'analyse des histogrammes de cytométrie de flux.

### III. Résultats

#### III.1. Taux d'incorporation du BrdU

Le taux d'incorporation de BrdU en remplacement de la thymidine a été évalué par une analyse sur HPLC à la suite de digestion enzymatique de l'ADN complète. Ces expériences ont été réalisées avec l'aide d'un standard composé du BrdU et des quatre nucléosides normaux. Le tableau 2 présente le pourcentage de remplacement de la thymidine par le BrdU après 24 heures d'exposition à des concentrations entre 2 et 10  $\mu\text{M}$ . Les résultats démontrent que le BrdU a bien été incorporé dans les cellules et que le niveau de remplacement de la thymidine augmente avec la concentration de BrdU. On peut observer que le taux d'incorporation est déjà élevé à 2  $\mu\text{M}$ . Toutefois, à plus grande concentration de BrdU, le taux d'incorporation se stabilise. Les résultats proviennent d'une seule expérience et correspondent avec ce qui avait été observé auparavant (ILIAKIS *et al.*, 1991).

**Tableau 2:** Taux de remplacement de la thymidine par le BrdU.

Mesuré par HPLC à partir de cellules incubées en présence de BrdU (0 à 10  $\mu\text{M}$ ) pendant 24 heures. Les résultats proviennent d'une seule expérience.

BrdU ( $\mu\text{M}$ )	Remplacement de la thymidine (%)
0	0
2	37
5	46
10	49

### III.2. Croissance cellulaire

Les concentrations de BrdU et la période d'incubation utilisées pour les expériences subséquentes ont été établies suite aux résultats obtenus de la courbe de croissance cellulaire en présence de BrdU. Le but de ce test était de déterminer si le BrdU pouvait être toxique sans irradiation pour les cellules CHO-K1 en croissance.

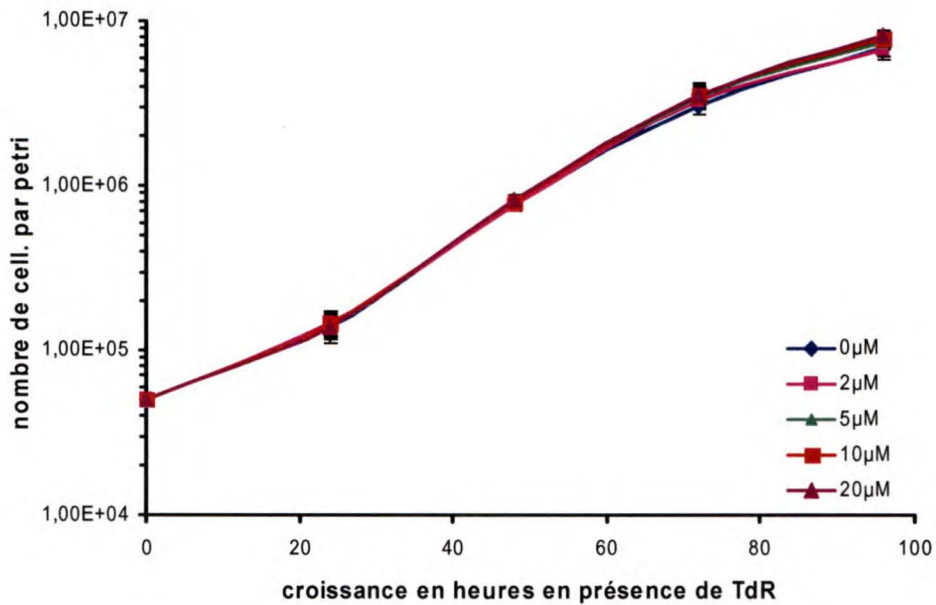
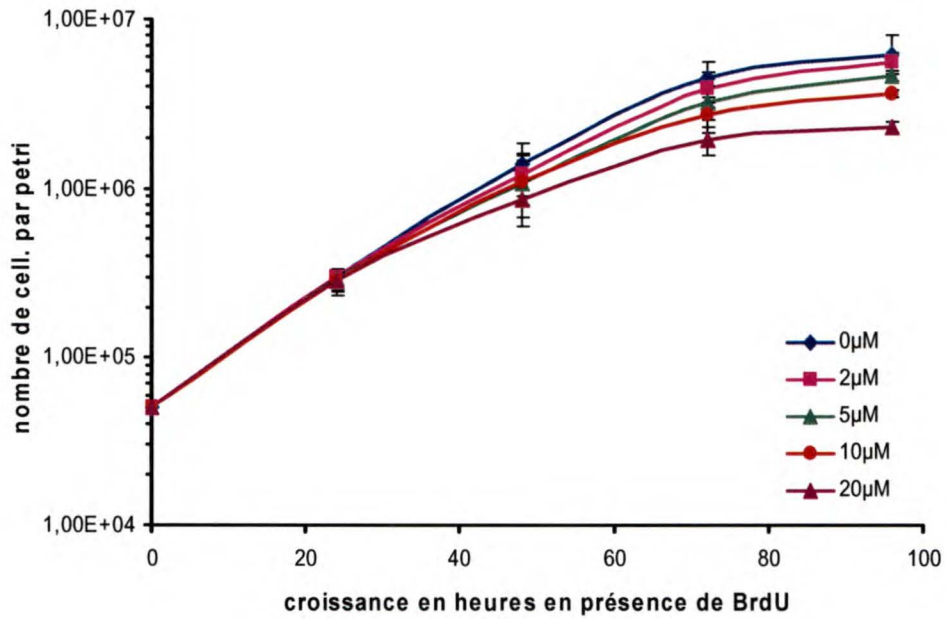
Cinq doses de BrdU allant de 0  $\mu\text{M}$  à 20  $\mu\text{M}$  ont été mises en présence des cellules suivie d'une période d'incubation de quatre jours. A différents intervalles de temps, soient 24, 48, 72 et 96 heures, les cellules ont été récoltées et comptées. Une courbe de croissance a été tracée à partir des données recueillies. La figure 13 démontre l'effet du BrdU seul sur la prolifération cellulaire sans irradiation. La première phase de croissance est exponentielle et rapide. De plus, la présence de BrdU ne montre aucune toxicité dans les 24 heures suivant le traitement. La seconde phase de croissance est plus lente. Après 48 heures, on peut constater un effet inhibiteur induit par le BrdU en

présence des cellules probablement dû au fait que le métabolisme des nucléotides (par la ribonucléotide réductase) est affecté. Ces résultats sont similaires à ce qui a été observé précédemment (ILIAKIS *et al.*, 1991).

Comme aucune toxicité n'a été observée dans les premiers 24 heures, nous avons établi d'utiliser cette période d'incubation pour les expériences subséquentes. Étant donné que le BrdU n'a pas d'effet dans ces conditions, nous en convenons qu'il n'induit aucune synchronisation dans une phase précise du cycle cellulaire.

Comme contrôle, le nucléoside TdR (figure 13) a été utilisé dans les mêmes conditions. Sur une longue période de traitement et avec des concentrations élevées, aucun signe de toxicité n'a été démontré. L'ajout de TdR exogène augmente la croissance cellulaire. Ceci pourrait correspondre à, soit la phosphorylation de dTMP en dTTP par la thymidine kinase ou soit que TdR sert comme source de déoxyribose-p-phosphate (KIT *et al.*, 1966).



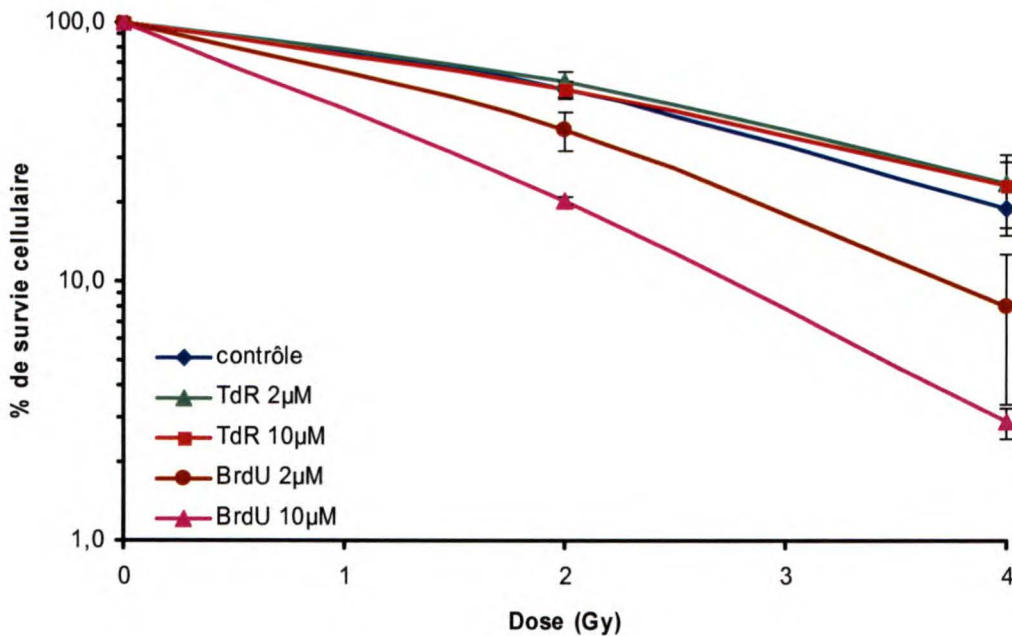


**Figure 13:** Comparaison de la croissance des cellules cancéreuses CHO-K1.

Les cellules ont été incubées en présence de 0 à 20  $\mu\text{M}$  de 5- Bromodéoxyuridine (BrdU) ou de Thymidine (TdR) pendant 24 à 96 heures avec ou sans drogue. Pour les expériences, 24 heures d'incubation avec le BrdU a été choisie car aucune toxicité n'a été observée.

### **III.3. Survie cellulaire après traitement au BrdU et TdR**

L'essai de formation de colonies a été utilisé afin d'observer l'effet du BrdU en concomitance avec les rayons gamma. Après avoir été incubées avec du BrdU et exposées à différentes doses de radiations, les cellules CHO-K1 ont étéensemencées à une concentration de 200 ou 400 cellules par pétri. Le contrôle sans drogue et sans irradiation correspond au 100% de survie cellulaire. La survie cellulaire suite au traitement avec les produits a été corrigée pour la toxicité sans irradiation. La figure (figure 14) présente la survie cellulaire en fonction de la dose d'irradiation. Le contrôle sans BrdU démontre une diminution de la survie avec une dose croissante d'irradiation. On peut également remarquer que les cellules sans drogue (contrôle) et celles traitées au TdR présentent une courbe de survie similaire. Lorsque le BrdU est présent, il y a augmentation de l'effet létal des irradiations. On peut conclure que la radiosensibilisation est dépendante à la concentration de BrdU. Cependant, cette relation n'est pas linéaire. Les cellules qui présentent le plus haut taux de toxicité sont celles qui ont été traitées avec 10  $\mu$ M BrdU suivie d'une irradiation de 4 Gy. Le BrdU augmente donc l'efficacité des radiations à tuer les cellules.



**Figure 14:** Effet du BrdU ou du TdR sur la survie cellulaire en fonction de la dose d'irradiation (Gy).

Les cellules CHO-K1 ont été mises en présence des produits pendant 18-20 heures à des concentrations entre 0 et 10 µM avant d'être irradiées. L'analyse statistique *p*-value a été réalisée à l'aide du test de Student.

#### III.4. Captation des électrons aqueux

Les effets des électrons aqueux produits lors de la radiolyse de l'eau ont aussi été testés sur des cellules. Pour ce faire, de l'acétone dans des conditions et concentrations non toxiques pour les cellules a été utilisé. Ces expériences ont été exécutées dans sensiblement les mêmes conditions que celle déjà présentées par l'équipe de Webb (WEBB *et al.*, 1993). Nos résultats démontrent une toxicité plus importante lorsqu'il n'y a pas présence d'acétone. On peut observer à la figure 15 que toutes les courbes de survie cellulaire ont été rehaussées en présence d'acétone 1 M. En fait, le BrdU induit une moins grande diminution de la survie des cellules lorsqu'il y a présence d'acétone. Ces résultats

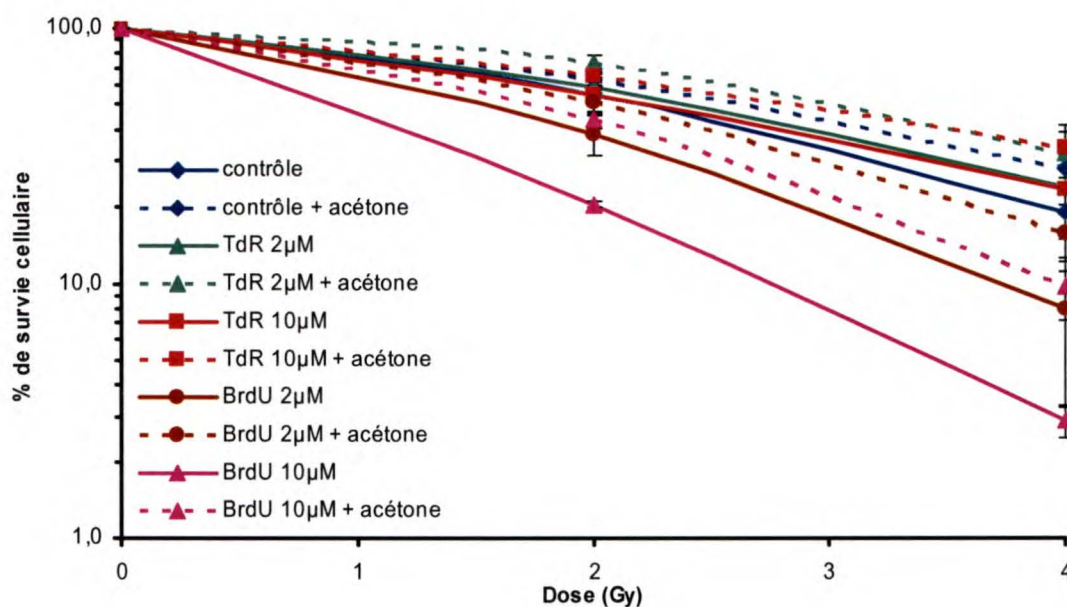
font état que l'acétone est effectivement un bon capteur d'électron aqueux ( $K_2 = 6,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ), empêchant celui-ci de participer à l'augmentation des dommages induits par le BrdU lors de l'irradiation (JONES *et al.*, 1995).

Les expériences ont été réalisées en comparaison avec le TdR afin de voir l'impact des électrons aqueux sur le processus de radiosensibilisation du BrdU. Les pourcentages de survie ont été corrigés pour la toxicité des produits sans irradiation. Lorsqu'on compare les données, on peut voir que le ratio acétone / sans acétone est plus significatif lorsqu'il s'agit d'ADN bromé. À 4 Gy, le ratio est de 3,3 fois pour les échantillons à 10  $\mu\text{M}$  de BrdU comparativement à 1,45 fois pour la TdR à concentration comparable. Ce ratio est moindre à 2 Gy, mais demeure plus élevé pour les cellules bromées (2,13 fois) que les non bromé (1,18 fois) (tableau 3). Pour le TdR, nous considérons qu'il n'y a pas suffisamment d'évidences statistiques pour conclure à une différence significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,14$ ), entre 0  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,69$ ) et entre 2  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,39$ ). Tout comme le TdR avec acétone entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,05$ ), entre 0  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,26$ ) et entre 2 et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,23$ ). En présence de BrdU, nous obtenons une différence significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,038$ ) et entre 0  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,027$ ). Cependant, la différence est non significative entre 2  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,23$ ). En présence d'acétone, la différence est également significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,004$ ) et entre 0  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,002$ ) de BrdU. Mais entre 2  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,15$ ), la différence est non significative.

**Tableau 3:** Toxicité du BrdU et TdR après irradiation des cellules traitées avec ou sans acétone.

	contrôle	BrdU		TdR	
	-	2 $\mu$ M	10 $\mu$ M	2 $\mu$ M	10 $\mu$ M
2 Gy	54.8 $\pm$ 3.7	38.4 $\pm$ 6.7	20.5 $\pm$ 0.6	59.1 $\pm$ 4.9	54.8 $\pm$ 4.5
2 Gy + acétone	62.7 $\pm$ 3.3	51.0 $\pm$ 4.6	43.7 $\pm$ 3.7	73.1 $\pm$ 5.9	64.7 $\pm$ 4.7
4 Gy	19.0 $\pm$ 4.0	8.0 $\pm$ 4.6	2.9 $\pm$ 0.4	23.9 $\pm$ 4.7	23.3 $\pm$ 7.3
4 Gy + acétone	28.4 $\pm$ 3.9	15.7 $\pm$ 4.5	9.7 $\pm$ 2.5	32.1 $\pm$ 7.1	33.8 $\pm$ 7.9

Note : Les valeurs exprimées en % de survie cellulaire représentent la moyenne +/- l'écart-type. Les résultats proviennent de trois expériences différentes.



**Figure 15:** Effet de la présence ou non d'acétone sur la survie des cellules en fonction de la dose d'irradiation.

Les cellules ont été mises en présence des produits pendant 18-20 heures à une concentration entre 0 et 10 µM de BrdU ou de TdR avant d'être irradiées. L'analyse statistique *p*-value a été réalisée à l'aide du test de Student.

### III.5. Formation de cassures simple brin à l'ADN

#### III.5.1. Comète alcaline

L'utilisation de l'essai comète dans des conditions alcalines permet de révéler les bris simple brin qui sont causés à l'ADN (WONG *et al.*, 2005).

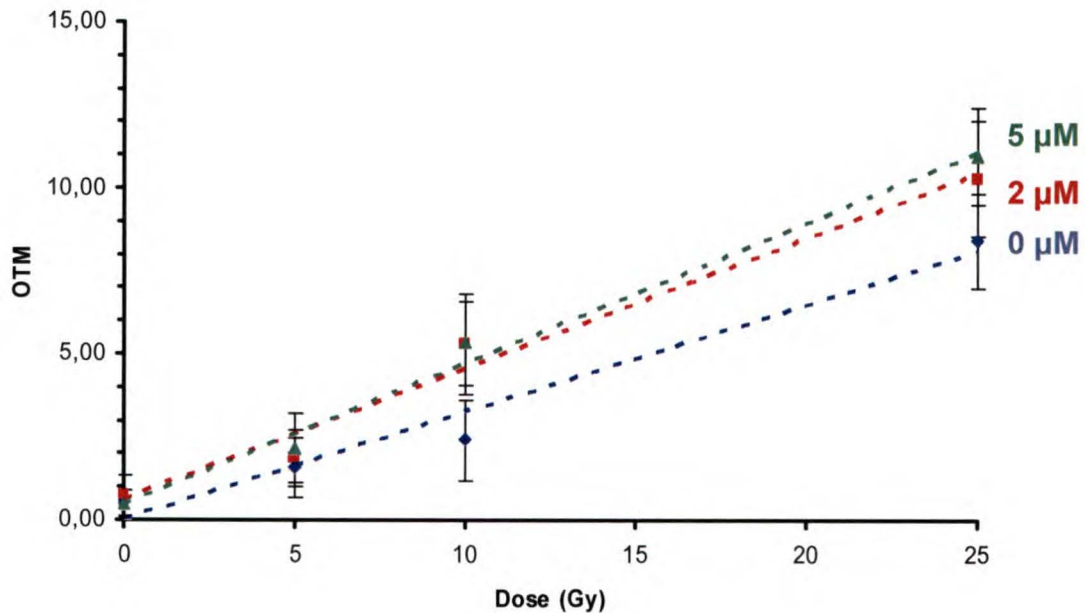
Dans un premier temps, nous avons réalisé les comètes à l'aide du fluorochrome SYBR gold. L'irradiation des cellules était également effectuée directement dans l'agarose. Nous nous sommes aperçus que ces conditions ne donnaient pas des résultats reproductibles. Les résultats de ces comètes sont inclus dans les sections III.7 et III.8 de ce mémoire.

En second lieu, l'usage du PI (iodure de propidium) a été fait pour visualiser les comètes et quantifier les dommages. Comme il en a été question dans la partie matériels et méthodes, nous avons fait l'usage de 3 versions de la méthode alcaline. Après avoir exposé les cellules pendant 24 heures au BrdU, le milieu de chaque pétri a été remplacé par du milieu sans sérum, les cellules sont ensuite irradiées et finalement soumises à l'essai comète. Les effets causés par l'irradiation et le BrdU sont dévoilés sur une courbe représentant la valeur Olive Tail Moment (OTM) en fonction de la dose d'irradiation. La valeur OTM représente un indice de la quantité d'ADN endommagé. Il est le paramètre le plus important car il tient compte à la fois de la quantité d'ADN et de la distance de migration (OLIVE *et al.*, 1992).

$$\text{OTM} = \frac{\text{pourcentage d'ADN dans la queue}}{\text{la distance de migration entre le centre de gravité de l'ADN dans la tête et dans la queue}}$$

Les résultats de la première version, celle appelée Collins pH 10 sont présentés dans la figure 16. On peut voir que l'irradiation seule induit la formation de cassures simple brin. La queue des cellules (figure 17) irradiées à 25 Gy apparaissent plus longues que celles qui n'ont pas été irradiées. À la figure 16, si l'on compare avec le taux de dommages générés par la présence de BrdU, on peut voir que la valeur OTM démontre une augmentation de bris simple brin comparativement aux cellules sans BrdU pour les cellules irradiées à 10 et 25 Gy. Nous considérons qu'il y a suffisamment d'évidences statistiques pour conclure à une différence significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,05$ ) et entre 0  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,003$ ). Ce qui confirme une augmentation des dommages

simple brin avec la présence de BrdU. Cependant, il ne semble pas y avoir plus de dommages en augmentant la concentration de BrdU de 2  $\mu\text{M}$  à 5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,32$ ). Les courbes ont une très bonne linéarité, avec des ( $r^2$ ) de respectivement 0,98 (0  $\mu\text{M}$ ), de 0,98 (2  $\mu\text{M}$ ) et de 0,99 (5  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 16:** Détection des dommages simple brin par la méthode Collins pH 10 après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation.

Les courbes de régression linéaire ont été établies via la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes (50 comètes chacune). L'analyse statistique  $p$ -value a été réalisée à l'aide du test de Student.



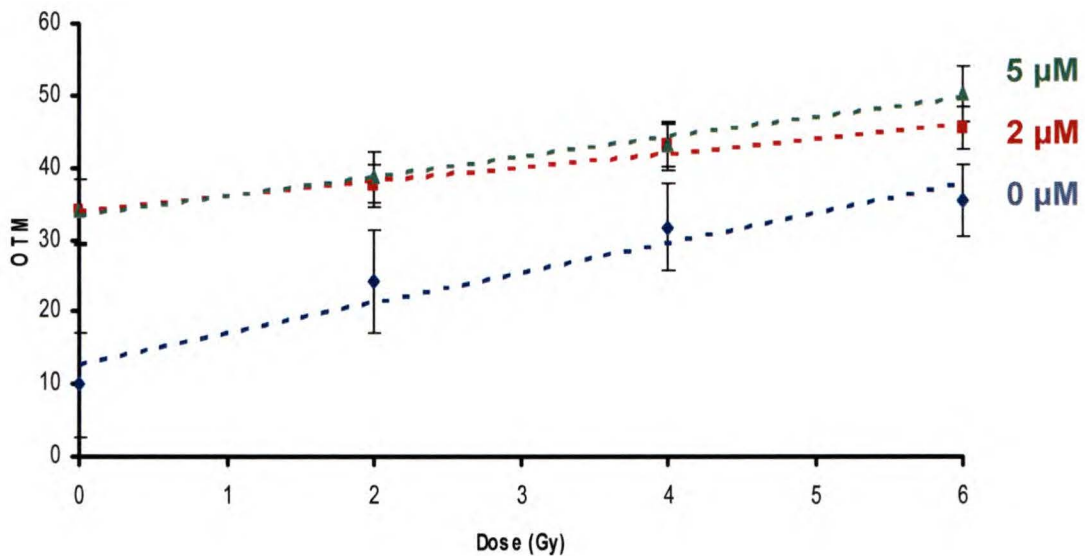


**Figure 17:** Images de comètes (méthode Collins pH 10) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation.

Les cellules CHO-K1 n'ont subi aucun traitement avant d'être irradiées. Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI).

La version Olive pH 12 (figure 18) démontre également une augmentation du Olive Tail Moment induit par l'irradiation et par la présence de BrdU. Ce qui équivaut également à une augmentation des cassures simple brin par le BrdU. Nous obtenons une différence significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,001$ ) et entre 0  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,001$ ) de BrdU. Mais entre 2  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  de BrdU ( $p = 0,48$ ), il ne semble pas y avoir plus de dommages. Cependant, si on observe la figure 19, l'apparence des queues est plus longue que celle obtenue avec la version Collins pH 10. Il faut noter que les tampons de lyse des 2 versions, Olive pH 12 et Collins pH 10, ne sont pas identiques. Il semble donc y avoir plus de dommages révélés par la version Olive pH 12. La version Collins pH 10 donne 2 comme valeur OTM lorsque les cellules sont irradiées à une dose de 10 Gy comparativement à une valeur OTM de 35 avec une dose d'irradiation de 6 Gy pour la version Olive pH 12. Une autre distinction entre les deux versions est au niveau du contrôle non irradié. Avec la version Collins pH 10, il n'y a aucun signe de dommage du contrôle, qu'il comporte ou non du BrdU. Cependant, avec la version Olive pH 12, on peut observer une augmentation du Olive Tail Moment pour les cellules ayant incorporées du BrdU (OTM = 35) et correspond à 3,5 fois la valeur du contrôle sans

BrdU. Nous croyons qu'il pourrait s'agir de sites abasiques induits et révélés par la version Olive pH 12, puisque les sites alkali sont seulement exprimés à pH plus grands que 12 (LACOSTE *et al.*, 2006). Le bruit de fond à 0 Gy est possiblement causé par la révélation des ces sites. Les régressions linéaires ( $r^2$ ) des différentes courbes de la figure 18 sont de 0,96 (0  $\mu\text{M}$ ), de 0,98 (2  $\mu\text{M}$ ) et de 0,99 (5  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 18:** Détection de dommages simple brin par la méthode Olive pH 12 après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation.

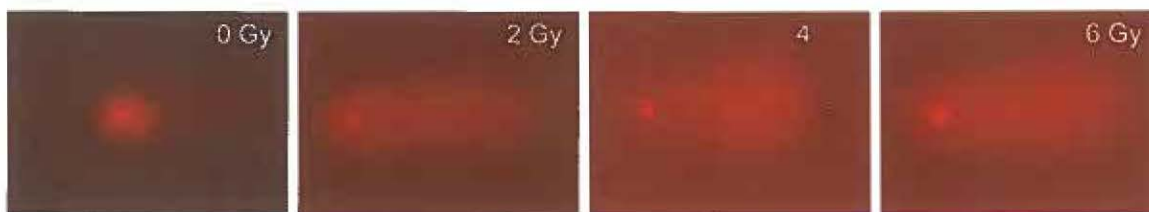
Les courbes de régression linéaire ont été établies via la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes (50 comètes chacune). L'analyse statistique  $p$ -value a été réalisée à l'aide du test de Student.



**Figure 19:** Images de comètes (méthode Olive pH 12) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation.

Les cellules CHO-K1 n'ont subi aucun traitement avant d'être irradiées. Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI).

Une autre version a également été utilisée, la version Olive pH>13. L'apparence de ces comètes est encore plus longue (figure 20) que celles des 2 autres versions. Nous croyons que l'augmentation des dommages pourrait provenir du temps long de la lyse. Nous n'avons pas de quantification de la version Olive pH>13 car il a été impossible de faire l'analyse des comètes par le programme utilisé, CASP. La présence d'un plus grand bruit de fond pourrait affecter la reproductibilité et la sensibilité de la méthode. Lorsque la comète a une dispersion importante, il est parfois difficile de modéliser la cellule et d'en établir des statistiques interprétables. L'ensemble des résultats des essais comètes suggèrent que le BrdU augmente le nombre de bris simple brin lorsqu'il est exposé aux radiations gamma.



**Figure 20:** Images de comètes (méthode Olive pH>13) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation.

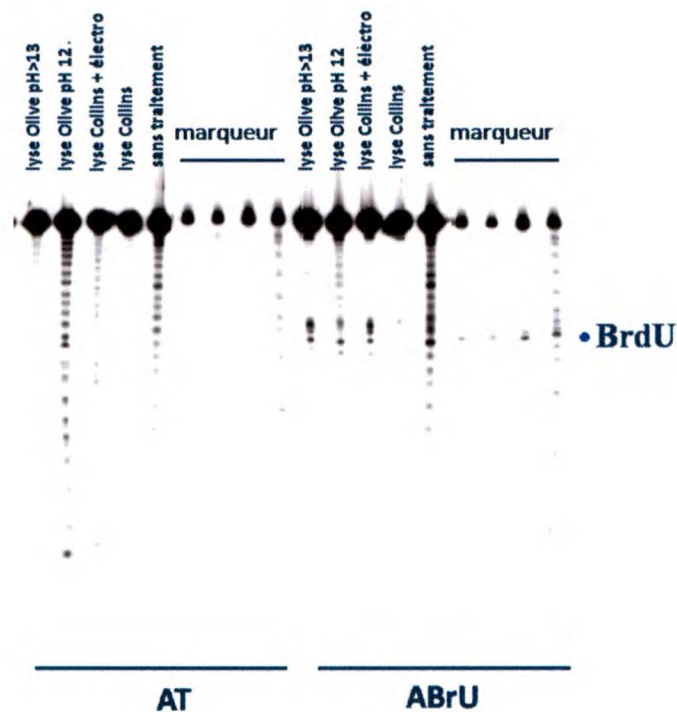
Les cellules CHO-K1 n'ont subi aucun traitement avant d'être irradiées. Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI).

### III.5.2. Gel d'oligonucléotides bromés

Comme l'apparence des comètes des 3 versions alcalines est différente, nous pouvons nous interroger sur leur capacité de détection des dommages induits par le brome. Nous avons pensé utiliser un système plus simple avec un ADN nu contenant du brome (ABrU) ou non (AT) et de les mettre en présence des solutions de lyse. La migration sur un gel d'acrylamide nous permettra ensuite d'observer les dommages.

La figure 21 contient, à gauche, un ADN non bromé (AT). On peut voir que les versions Collins pH 10 et Olive pH>13 présentent moins de dommages qu'avec la version Olive pH 12. Cependant, le contrôle sans traitement possède également des dommages. Dans ces deux cas, il n'y avait pas d'EDTA présent. D'autres résultats (non montrés) nous ont permis de voir que lorsque l'EDTA est ajouté, il y a moins de dommages. La présence d'EDTA protégerait l'ADN contre les dommages causés par l'autoradiolyse du P32.

La partie de droite de la figure 21 a été faite avec un ADN bromé (ABrU). L'observation des dommages démontre qu'il y a plus de dommages révélés au niveau du brome (position identifié à l'aide du marqueur BrdU) avec les versions Olive que Collins (sans la solution de migration).



**Figure 21:** Observation des dommages sur un oligonucléotide contenant ou non une molécule de brome en présence de solutions de lyse utilisées lors des différents essais comètes.

### III.6. Formation de cassures double brin à l'ADN

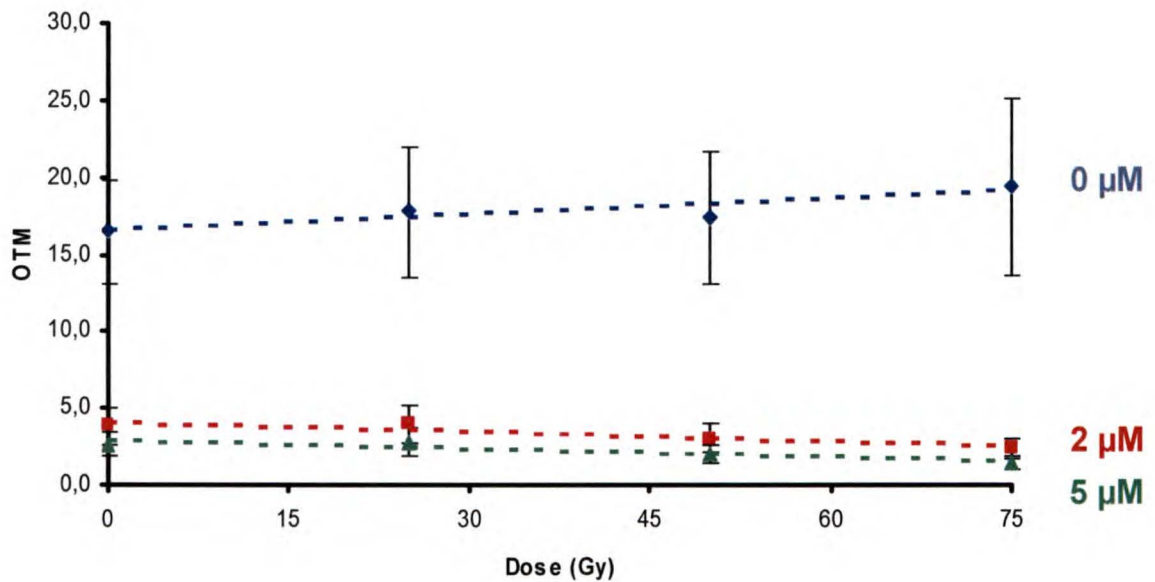
Nous avons analysé la formation de cassures double brin par l'utilisation de 2 méthodes d'analyse soit l'essai comète neutre et la formation  $\gamma$ -H2AX.

### III.6.1. Comète neutre

L'analyse des dommages double brin de cellules exposées au BrdU et aux rayons gamma selon l'essai comète sous condition neutre est montrée à la figure 22. Nous considérons que la différence est significative entre 0  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,02$ ) et entre 0  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,02$ ). Ce qui confirme une diminution des dommages double brin avec la présence de BrdU. Cependant, il ne semble pas y avoir plus de différence en augmentant la concentration de BrdU de 2  $\mu\text{M}$  à 5  $\mu\text{M}$  BrdU ( $p = 0,91$ ).

Les images des résultats du contrôle sans BrdU (figure 23) présente une augmentation de la formation de la queue d'une comète en rapport avec une dose croissante d'irradiation. Ce qui correspond à une augmentation de bris double brin dans l'ADN. Cependant, cette augmentation de la queue n'est plus apparente lorsque les cellules ont été préalablement incubées en présence de BrdU (figure 22). L'ajout de BrdU retarde la migration. La figure 24 représente bien ce raccourcissement de la queue en présence de BrdU et ce même sans irradiation. Cela rappelle les résultats de cellules traitées avec des agents causant des dimères (YUN *et al.*, 2005). On peut donc penser qu'il s'agit de la présence de ponts induits par le BrdU. La conformation des dimères retarde la migration de l'ADN sur gel. On peut également affirmer qu'ils ne représentent pas des liens ADN-protéines, puisque les cellules ont été traitées avec la protéinase K (MERK *et al.*, 2000). L'utilisation de la protéinase K permet la discrimination des dimères ADN-ADN versus ADN-protéine (MERK et SPEIT, 1999 ; GARCIA *et al.*, 2009). Cette enzyme détruit les liens ADN-protéine. Toutefois, à la figure 22 nous n'observons pas d'augmentation par le BrdU de bris double brin en fonction de la dose de radiation. Nous croyons que la technique neutre manque de sensibilité pour voir les bris

double brin, mais cela ne veut pas dire qu'il n'y en n'a pas. Les régressions linéaires ( $r^2$ ) des différentes courbes de la figure 22 sont de 0,89 (0  $\mu\text{M}$ ), de -0,94 (2  $\mu\text{M}$ ) et de -0,93 (5  $\mu\text{M}$ ). Les régressions sont considérées comme étant une corrélation forte pour la courbe du 0  $\mu\text{M}$  et négative forte pour les courbes 2  $\mu\text{M}$  et 5  $\mu\text{M}$ .



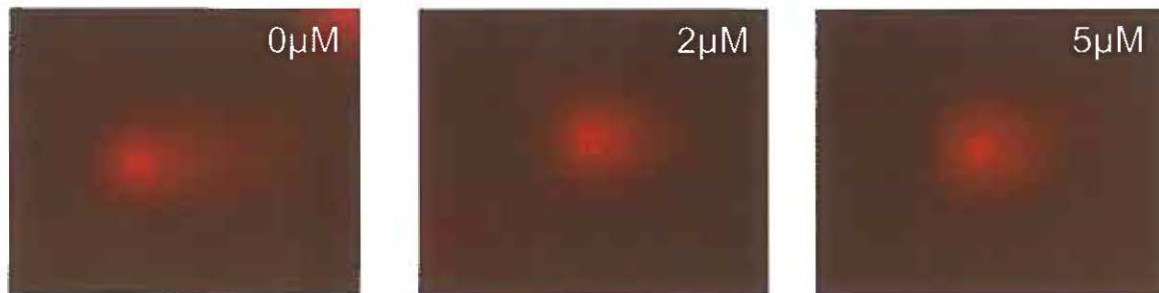
**Figure 22:** Détection de dommages double brin par la méthode neutre après exposition à différentes concentrations de BrdU et doses d'irradiation.

Les courbes de régression linéaire ont été établies via la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes (50 comètes chacune). L'analyse statistique  $p$ -value a été réalisée à l'aide du test de Student.



**Figure 23:** Images de comètes (méthode neutre) démontrant différents niveaux de cassure d'ADN post-irradiation.

Les cellules CHO-K1 n'ont subi aucun traitement avant d'être irradiées. Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI).



**Figure 24:** Images de comètes (méthode neutre) démontrant différents niveaux de cassures d'ADN sans irradiation.

Les cellules CHO-K1 ont été exposées à une concentration variant de 0  $\mu\text{M}$  à 5  $\mu\text{M}$  BrdU sans être irradiées. Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI).

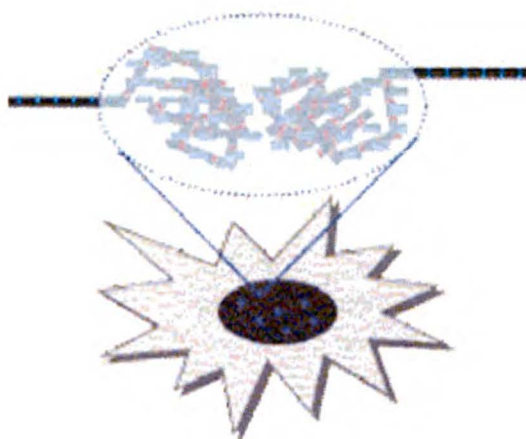


### **III.6.2. Biomarqueur $\gamma$ -H2AX**

Le développement d'un anticorps contre la forme H2AX phosphorylée a permis la mise en place d'une nouvelle méthode extrêmement efficace et sensible pour l'identification des bris double brin (SOKOLOV *et al.*, 2005). Plusieurs méthodes de détection peuvent être utilisées pour la détection et la quantification de  $\gamma$ -H2AX. En voici quelques une : l'immunobuvardage, la cytométrie de flux et la microscopie (MACPHAIL *et al.*, 2003). Au cours de cette maîtrise, deux méthodes ont été retenues, soit la microscopie et la cytométrie de flux.

### III.6.2.1. Détection de foci $\gamma$ -H2AX sur lame

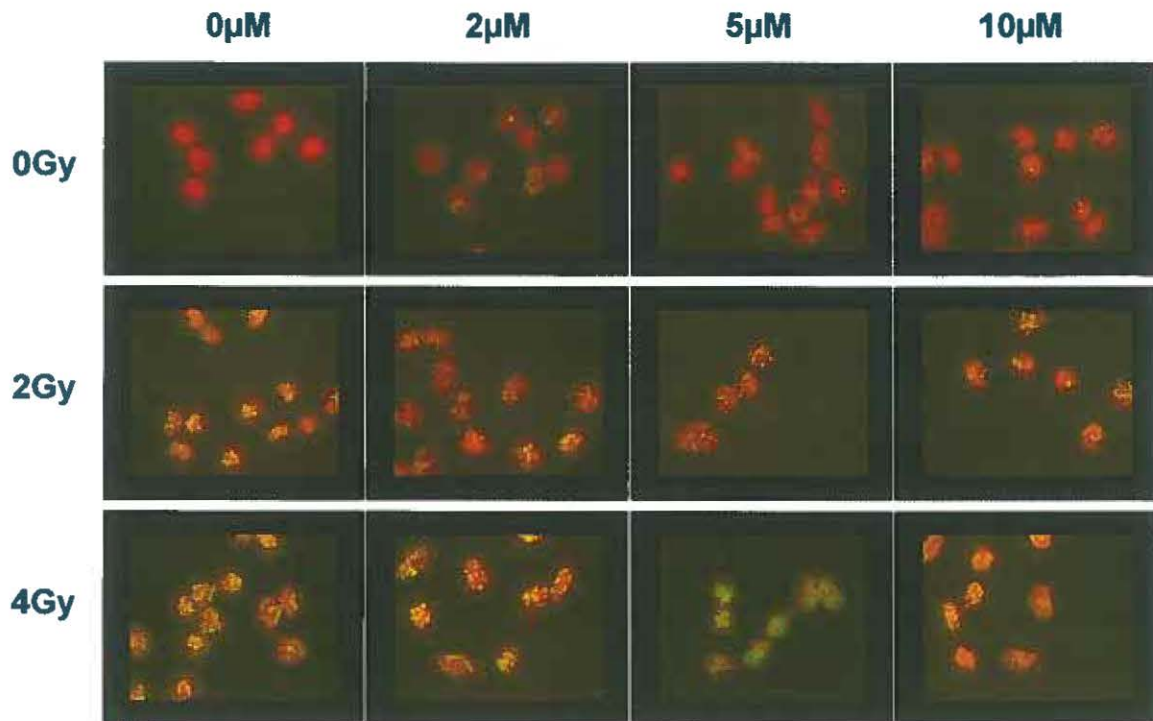
L'ajout d'anticorps dirigé contre la sérine-139 phosphorylée de la partie C-terminale de la protéine H2AX permet la détection de foyers nucléaires (foci) (ROGAKOU *et al.*, 1999). La détection d'un seule foci, représente 1 bris double brin (figure 25).



**Figure 25:** Image représentant une cassure double brin.

Au microscope, une cassure double brin discernable en tant que foyer nucléaire. Provient de FERNANDEZ-CAPETILLO *et al.*, 2004.

Les images de la figure 26, démontrent en apparence qu'il y a effet sur les cassures par l'irradiation mais pas par le BrdU. En fait, il y a accroissement du nombre de foci en augmentant la dose d'irradiation. Mais, il ne semble pas y avoir d'amplification de foci par l'ajout de BrdU.



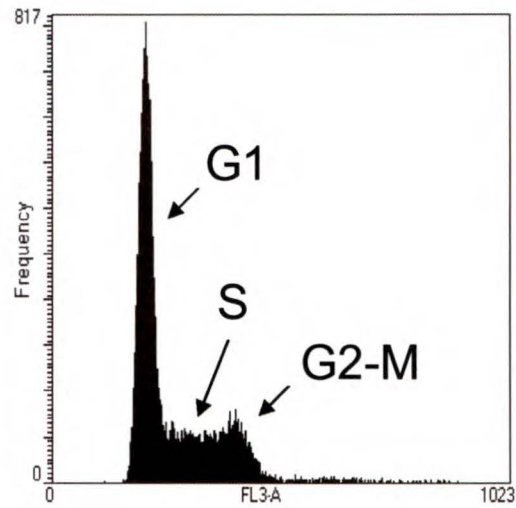
**Figure 26:** Formation de foci  $\gamma$ -H2AX après exposition au BrdU et aux radiations.

Note : On pourrait croire que l'échantillon 5 $\mu$ M BrdU irradié à 4 Gy possède beaucoup de foci, mais il s'agit d'un artéfact d'une région de la lame.

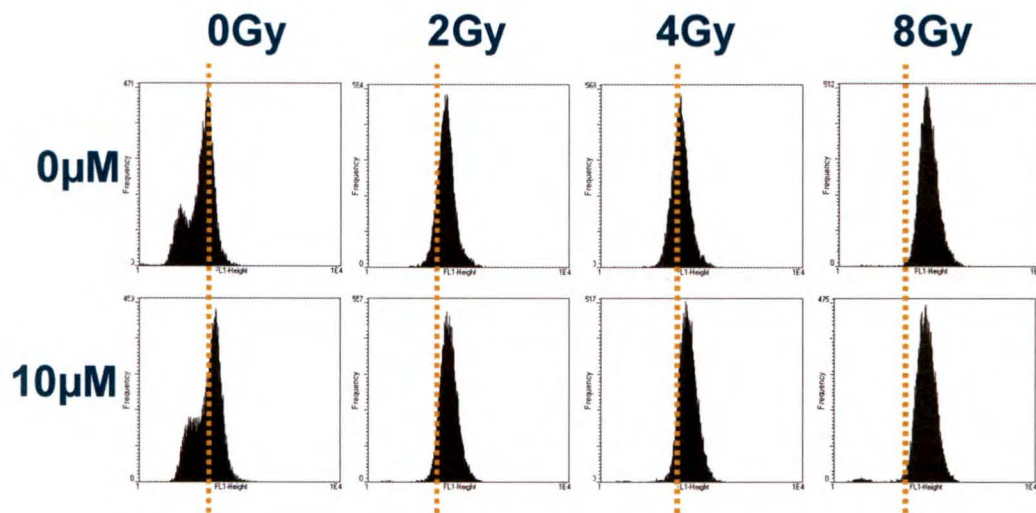
### III.6.2.2. Détection de $\gamma$ -H2AX par cytométrie de flux

$\gamma$ -H2AX a également été quantifié à l'aide la cytométrie de flux, communément appelée FACSscan®. Cette méthode d'analyse utilise comme principe un système de lasers qui excitent un fluorochrome. Ce dernier réémet de la fluorescence à une nouvelle longueur d'onde pouvant être détectée et quantifiée. L'utilisation de FACSscan® permet de séparer les cellules en fonction de leurs phases cellulaire. Il a été reporté dans la littérature que ce sont les cellules en phase G1 du cycle cellulaire qui présentent la quantité la plus faible d'expression endogène de  $\gamma$ -H2AX (MACPHAIL *et al.*, 2003). Dans la phase S/G2, le bruit de fond est plus élevé, relié aux dommages causés lors de la réplication. Ce qui dans notre cas pourrait masquer l'effet du BrdU. Nous avons donc

débuté les expériences par l'analyse de la distribution du cycle cellulaire (figure 27) à l'aide du fluorochrome iodure de propidium. Ce qui a permis le traitement des données selon la phase du cycle cellulaire. Le pourcentage attribué à chaque phase a été déterminé par l'utilisation du programme ModFit. Nous avons en même temps mesuré l'expression de  $\gamma$ -H2AX. La détection du fluorochrome FITC dans les différentes phases du cycle (G1, S et G2-M) a été effectuée chez des cellules exposées ou non aux BrdU pendant 24 heures et irradiées par la suite. L'augmentation de  $\gamma$ -H2AX après irradiation est détectable par un déplacement du pic de fluorescence vers la droite. Les histogrammes (figure 28) qui représentent les cellules analysées en fonction de l'intensité de fluorescence FITC, montrent cette augmentation en fonction de la dose d'irradiation. Les résultats sont représentés sous forme de tableau 4. Les colonnes en vert représentent les résultats qui ont été normalisés en rapport au groupe contrôle 0 Gy. Les colonnes en jaune ont été normalisées en rapport au groupe contrôle 0 Gy 0  $\mu$ M. Toutefois, il ne semble pas y avoir d'augmentation de  $\gamma$ -H2AX causée par le BrdU sauf pour 10  $\mu$ M (figure 29). Les pentes de chacune des courbes de régression ont été calculées. La pente obtenue pour la courbe 0  $\mu$ M est de 0,42. Les concentrations de 2  $\mu$ M (0,35) et 5  $\mu$ M (0,28) ont une pente décroissante. Cependant, la courbe du 10  $\mu$ M présente une pente de 0,44.



**Figure 27:** Représentation schématique du cycle cellulaire de cellules CHO-K1.



**Figure 28:** Histogrammes représentant l'expression de  $\gamma$ -H2AX.

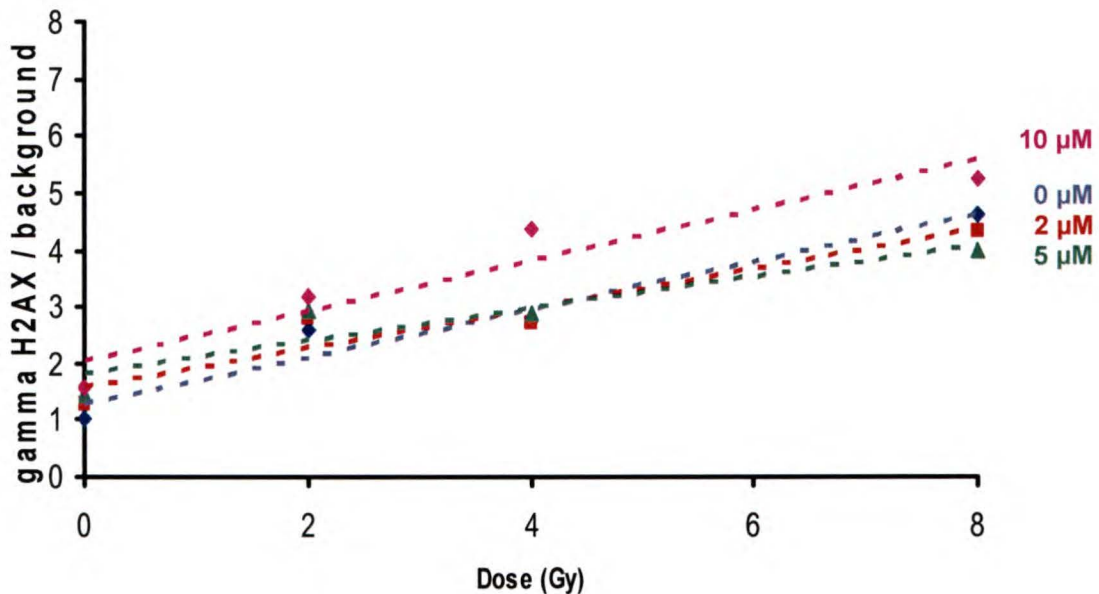
Détection de  $\gamma$ -H2AX par cytométrie de flux provenant de cellules traitées au BrdU et exposées aux radiations de 0 à 8 Gy. Les résultats proviennent d'une seule expérience.

**Tableau 4:** Résultats chiffrés de l'expression de  $\gamma$ -H2AX.

Détection de  $\gamma$ -H2AX par cytométrie de flux provenant de cellules traitées au BrdU et exposées aux radiations de 0 à 8 Gy. Les résultats proviennent d'une seule expérience.

	0 $\mu$ M	2 $\mu$ M	2 $\mu$ M / bkg	5 $\mu$ M	5 $\mu$ M / bkg	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M / bkg
8 Gy / 0 Gy	4,60	3,43	4,32	2,72	3,98	3,38	5,23
4 Gy / 0 Gy	2,74	2,17	2,73	1,97	2,88	2,83	4,38
2 Gy / 0Gy	2,59	2,22	2,79	2,00	2,93	2,05	3,17
0 Gy / 0 Gy	1		1,26		1,46		1,55

Note : Les valeurs exprimées représentent un ratio d'intensité. Les résultats proviennent d'une seule expérience.



**Figure 29 :** Représentation graphique de l'intensité des foci  $\gamma$ -H2AX chez des cellules traitées au BrdU et exposées aux radiations de 0 à 8 Gy.

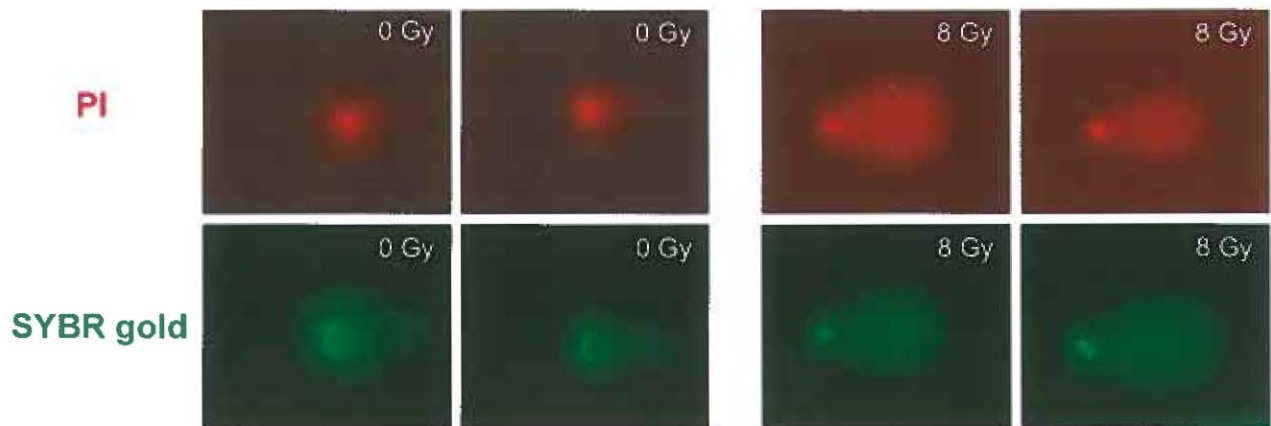
Les courbes de régression linéaire ont été établies via une seule expérience.

### III.7. Utilisation du fluorochrome SYBR gold versus le fluorochrome PI

Comme il a été noté à la section 111.5.1, les premiers essais comètes (alcaline et neutre) ont été réalisés à l'aide du SYBR gold (Invitrogen, Burlington, Canada). Ce fluorochrome fait partie d'une nouvelle génération de colorant nucléaire, utilisée pour visualiser l'ADN dans les gels d'électrophorèse composés d'agarose ou de polyacrylamide. Lors de l'utilisation de la technique alcaline, les comètes présentaient d'une expérience à une autre, des irrégularités quand à leur aspect. Il a également été difficile de les analyser par le programme informatique.

Un autre fluorochrome permettant la visualisation de l'ADN soit l'iodure de propidium (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) a été utilisé. Après avoir comparé l'essai des deux fluorochromes, l'apparence des comètes au microscope ainsi que leur analyse

s'est avérée distincte. La figure 30 démontre une différence dans l'apparence de la forme des comètes. On peut apercevoir une distinction marquée pour le contrôle sans irradiation.



**Figure 30 :** Images de comètes (méthode Olive pH 12).

Les cellules ont été colorées par iodure de propidium (PI) en rouge et SYBR gold en vert.

En conséquence, seule l'iodure de propidium a été utilisé comme fluorochrome pour les essais comètes, quels soient alcalines ou neutres, pour la suite de l'étude.

### **III.8. Effet de l'irradiation des cellules sur lame pour l'essai comète**

Un autre problème a été soulevé au tout début des expériences, celui d'inclure les cellules dans l'agarose avant l'irradiation. Quelques auteurs ont procédé à l'irradiation de cellules déjà incluses dans l'agarose (SINGH *et al.*, 1994 ; WOJEWÓDZKA *et al.*, 2002) mais lorsque l'on fait la comparaison de l'inclusion des cellules dans l'agarose avant ou après l'irradiation, les comètes prennent une apparence totalement différente. Le halo



autour des comètes prend une allure plus étendue lorsque les cellules sont irradiées directement dans l'agarose (figure 31).



**Figure 31** : Image de comète (méthode neutre).

Les cellules ont été colorées par SYBR gold. Irradiation directement sur lame.

Les résultats de l'analyse de l'essai comète doit permettre de révéler la quantité d'ADN endommagé ayant migré hors de la tête de la comète. Comme les valeurs sont interprétées en fonction d'un nombre de pixels détectés dans la tête comparativement au nombre retrouvé dans la queue, nous avons cru important de pouvoir minimiser l'étendu de ce halo. Nous avons opté pour l'inclusion des cellules dans l'agarose après irradiation.

#### IV. Discussion

La radiothérapie est le traitement le plus répandu pour traiter le cancer. Cependant, la dose donnée aux patients est limitée à cause des effets secondaires qu'une forte dose peut occasionner. Voilà pourquoi l'utilisation de radiosensibilisateurs pourrait faire partie d'une stratégie pour augmenter l'effet létal des radiations envers les cellules tumorales.

L'utilisation possible du BrdU pour le traitement du cancer a beaucoup été investiguée depuis 1960 (LITTLEFIELD et GOULD, 1960). Cette drogue possède des propriétés très intéressantes pour les traitements en radiothérapie : elle induit un même niveau de mortalité des cellules cancéreuses mais avec une dose de radiation réduite. L'effet radiosensibilisateur du BrdU a été démontré à maintes reprises (WOJCIK *et al.*, 2006). Il fait également partie des rares drogues à pouvoir s'incorporer à l'ADN sans en changer la structure. Le BrdU s'incorpore aux cellules dans leur phase multiplicatrice. Plusieurs auteurs ont voulu expliquer comment le BrdU radiosensibilisait les cellules. Leurs résultats font état que le BrdU a la particularité de générer des bris double brin (ILIAKIS *et al.*, 1989 et LAWRENCE *et al.*, 1995). Lorsqu'ils sont présents dans l'ADN, ces bris sont toxiques pour les cellules car ils sont très difficilement réparables. Comme la forme de l'ADN est majoritairement double brin complémentaires dans la cellule, on pourrait croire que le BrdU produirait la formation de cassures double brin. Mais les expériences de Cecchini (CECCHINI *et al.*, 2004) semblent vouloir dire le contraire. Le BrdU n'induirait pas de bris double brin dans un ADN complémentaire mais il en induirait dans un ADN comportant des régions bulles (non appariées).

#### IV.1. Radiosensibilisation par le BrdU

Les tests de formation de colonies prouvent l'effet radiosensibilisateur du BrdU. La comparaison entre le TdR et le BrdU démontre un net avantage pour l'utilisation du BrdU. De plus, les cellules démontrent plus de radiosensibilisation en présence de concentrations plus élevées de BrdU.

Il est rapporté dans la littérature que la radiosensibilisation de cellules ayant incorporées du BrdU est diminuée par la présence d'acétone pendant l'irradiation (WEBB *et al.*, 1993). L'acétone a donc un rôle dans le processus de captation des électrons aqueux (JONES *et al.*, 1995). Ce rôle est de soutenir une protection à l'ADN contre les électrons aqueux (espèces réactives qui causent des dommages à l'ADN) produits lors de la radiolyse de l'eau. Le fait que l'acétone augmente la survie appuie l'hypothèse que ce sont les électrons aqueux qui réagissent avec le BrdU. L'acétone réduirait ainsi les dommages létaux produits par l'interaction entre les électrons aqueux et le BrdU. Le TdR réagit également avec les électrons aqueux mais le radical formé suite à cette réaction est reconverti en TdR par les réactions subséquentes (WEBB *et al.*, 1993). Ce qui expliquerait pourquoi l'effet de l'acétone sur la réaction des électrons aqueux avec le TdR est moins important. Il serait bien de pouvoir poursuivre ces recherches par l'utilisation de l'essai comète. Ainsi, nous pourrions déterminer si oui ou non les électrons aqueux sont responsables de l'augmentation de bris causés par leur interaction avec le BrdU.

La littérature rapporte également que l'oxygène est aussi un bon capteur d'électrons aqueux (LAVERNE et PIMBLOTT, 1993). Il serait intéressant d'expérimenter si l'engendrement des bris serait supérieur pour les cellules en condition d'hypoxie.

#### **IV.2. Méthodes d'analyse des bris**

Dans ce mémoire, nous avons voulu examiner si le BrdU générerait des bris simple et double brin dans les cellules après irradiation. Quelques études ont été faites dans le passé afin de démontrer quels dommages le BrdU pouvait produire à l'ADN de cellules irradiées. Des techniques comme par exemple l'utilisation du gel d'électrophorèse en champs pulsé (LAWRENCE *et al.*, 1995) et l'éluion neutre (ILIAKIS *et al.*, 1989), utilisés dans les années 90, ont fait état que le BrdU augmente la présence de bris double brin. Cependant, on convient aujourd'hui que ces techniques démontraient peu de sensibilité à faible dose. Pour la première fois, dans le domaine d'étude du BrdU, nous avons eu recours à des techniques sensibles qui permettent la détection de dommages à des doses aussi faibles que 20cGy (MACPHAIL *et al.*, 2003). Ainsi, nous avons pu vérifier l'hypothèse d'induction de bris double brin dans l'ADN bromé. Depuis environ une dizaine d'années, deux nouvelles méthodes d'analyse des bris à l'ADN sont apparues. Celles des techniques de l'essai comète pour observer l'induction des dommages générés à l'ADN cellulaire et de la détection du biomarqueur  $\gamma$ -H2AX qui permet d'observer la mise en place d'un processus enzymatique pour réparer les bris double brin. Chacune des deux techniques permet la visualisation microscopique des dommages induits à chaque cellule.

#### **IV.3. Détection des cassures simple et double brin par l'essai comète**

Pour l'essai comète, deux méthodes sont proposées : la méthode alcaline et la méthode neutre. En variant les conditions alcalines ou neutres de la technique, on peut distinguer l'induction de bris simple brin (l'essai comète alcalin) ou de bris double brin

(l'essai comète neutre). Lorsque des cassures simple brin sont produites, elles détendent l'ADN, qui normalement se retrouve sous forme surenroulée. Une lyse à un pH alcalin permet le déroulement et la dénaturation de l'ADN qui peut migrer de façon indépendante. Dans le cas des cassures double brin, l'ADN est déjà fragmenté. Nous pouvons donc employer dans ce cas une lyse plus douce pour nous permettre de révéler ce genre de dommages. Il faut cependant noter que l'essai alcalin détecte également les bris double brin. Mais, comme il est rapporté dans la littérature, 1 Gy produit 1000 bris simple brin par cellules et les double bris représente moins de 5% de tous les dommages causés dans la cellule (SHAHIDI *et al.*, 2007). Comme le nombre de bris simple brin est élevé par rapport au nombre de bris double brin, ces derniers n'affectent pas la spécificité de la méthode alcaline pour la détection des bris simple brin. Il ne faut pas oublier que l'apparence de la queue de la comète dépendrait non seulement du nombre de dommages mais également de la différence dans la structure de la chromatine (WADA *et al.*, 2003). L'apparence d'une comète est produite lors de la migration. L'ADN fragmenté est libéré de ce qui est communément appelé la tête, pour migré vers l'anode et former une queue. La tête comporte l'ADN intact alors que la queue contient de l'ADN relaxé de son superenroulement donc endommagé ou cassé. Le logiciel CASP (KOŃCA *et al.*, 2003) qui aide à l'analyse des comètes, est facile d'utilisation et est employé par plusieurs laboratoires. Ce programme quantifie l'ADN contenu dans la tête et celui contenu dans la queue pour chaque cellule individuelle, nous permettant d'avoir un indice de la quantité d'ADN endommagé.

Même si l'essai comète est utilisé depuis quelques années, il ne semble pas avoir été standardisé. Différentes méthodes semblent être adoptées d'une équipe à l'autre et

chacun y apporte diverses modifications. Lors de cette étude, nous avons eu l'occasion de pouvoir comparer 3 différentes méthodes alcalines. Chacune présente une apparence distincte des comètes au microscope. Les techniques développées par Olive (pH 12 et pH>13) sont très similaires. Leurs queues sont de forme très allongée même à faible dose. Contrairement à la technique Collins pH 10 qui présente une petite queue rétractée près du noyau (figure 17). C'est au niveau de la solution de lyse que ces 3 versions de comète alcaline se distinguent le plus (tableau 5). L'apparence des comètes produites à l'aide de ces solutions de lyse sont également très différentes. Ces solutions de lyse ont pour différence : la quantité de sel, un pH différent et une présence ou non d'EDTA. La présence de sel sert à extraire les protéines des cellules. La quantité de sel est la même pour les versions Olive, soit 1,2 M, mais la version Collins pH 10 en contient plus, soit 2,5 M. Un autre paramètre qui diffère dans les 3 versions est le pH. Il est de 10 pour la version Collins pH 10 et les cellules sont incubées en sa présence pour une période de 18-20 heures. Pour la version Olive pH 12, le pH de la lyse est de 12 mais, les cellules sont mises en présence de la solution de lyse que pour une incubation de 1 heure. La version Olive pH>13, comporte un temps de lyse de 18-20 heures à un pH de plus de 13. Selon Banáth (BANÁTH *et al.*, 2001) un pH élevé maximise la détection des lésions alkali labiles. En bas de pH de 12, ces sites ne sont pas convertis en bris. La présence ou non d'EDTA dans les trois solutions de lyse est aussi un fait important à noter. On ajoute comme élément à diverses solutions de migration de l'EDTA afin de protéger l'acide nucléique contre la dégradation enzymatique.

**Tableau 5:** Représente la quantité de sel, le pH et la présence ou non d'EDTA composant les solutions de lyse des trois versions comètes alcalines.

<b>solution de lyse</b>	<b>sel</b>	<b>pH</b>	<b>EDTA</b>
<b>Collins (Singh)</b>	2,5 M	10 (O/N)	0,1 M
<b>Olive low pH</b>	1,2 M	12 (1h)	-
<b>Olive high pH</b>	1,2 M	> 13 (O/N)	0,1 M

Comme l'apparence des comètes alcalines était différente d'une technique à l'autre, nous avons voulu montrer si la révélation des dommages causés aux bromes pouvait être différente pour chaque technique. Pour ce faire, nous avons utilisé un oligonucléotide bromé et son contrôle non bromé. Nous avons observé si les solutions de lyse utilisées pour chacune des techniques révélaient les mêmes dommages. Car ce qui différencie le plus les techniques entre elles, c'est la composition de leurs solutions de lyse. Nos résultats établissent que la solution de lyse utilisée pour l'essai comète intervient dans la sensibilité de l'essai.

L'oligonucléotide non bromé (AT) démontre des faits intéressants. On peut observer qu'il y a plus de dommages avec la version Olive pH 12 qu'avec la version Collins pH 10 et Olive pH > 13. On pense que c'est la présence d'EDTA dans la solution de lyse de ces versions qui protégerait l'ADN. L'oligonucléotide bromé (ABrU) établit qu'il y a plus de dommages révélés avec les solutions Olive au niveau du brome.

Cependant, toutes les versions alcalines (sauf la méthode Olive pH>13, car impossible à analyser) ont donné comme résultats une augmentation des bris simple brin engendrés par l'irradiation seule. Mais ils ont révélé également une augmentation des dommages en combinant le BrdU aux irradiations.

L'essai comète neutre présente comme résultats un nombre augmenté de bris double brin causés par les radiations sans BrdU. Cependant, en présence de BrdU, on peut observer une rétractation de la queue. Il n'y a donc pas de formation de bris double brin, mais cette régression pourrait laisser croire qu'il pourrait s'agir de structure pouvant ralentir la migration comme par exemple des ponts. Ces résultats correspondent aux résultats obtenus avec  $\gamma$ -H2AX; ils démontrent une augmentation de foci dus à l'irradiation mais pas à l'ajout de BrdU à faible concentration. La formation de dimères interbrins causée par le BrdU pourrait expliquer ces résultats (OLIVE et BANÁTH, 2009). La diminution du tail moment est causée par la formation de dimères qui ralentissent la migration de l'ADN. La version neutre étant moins sensible aux dommages simple brin et aux sites alkali labiles, elle apparaît comme la façon la plus spécifique pour détecter les dimères.

#### **IV.4. Détection des cassures double brin à l'aide du biomarqueur $\gamma$ -H2AX**

Suite à un dommage double brin dans l'ADN, la protéine H2AX est phosphorylée dans les toutes premières minutes suivant l'irradiation, jusqu'à atteindre un plateau 10-30 minutes après (ROGAKOU *et al.*, 1998). Plusieurs équipes de recherches se sont intéressées au rôle joué par  $\gamma$ -H2AX dans le processus de reconnaissance et de réparation des bris double brin (PILCH *et al.*, 2003).



Le développement d'un anticorps dirigé contre  $\gamma$ -H2AX a grandement contribué à l'étude de cette protéine. Il a aidé à comprendre les différents processus biologiques et maladies où participe la formation de  $\gamma$ -H2AX. On peut utiliser cet anticorps de différentes façons, soient pour la détection par immunobuvardage, par foci, par gel deux dimensions (formation stoichiométrique de  $\gamma$ -H2AX) et par cytométrie de flux. Pendant cette maîtrise, deux méthodes d'analyse ont été employées. Premièrement, la visualisation de foyers nucléaires (foci) et deuxièmement, la quantification par cytométrie de flux. Le décompte de foci visibles au microscope comme méthode de quantification des bris double brin est très répandu. Elle demeure présentement la façon la plus sensible pour détecter les cassures double brin dans l'ADN (BANÁTH et OLIVE, 2003). Cependant, la majorité de cellules ont exhibé des foci, même celles non irradiées. Ceci est causé par la création de bris endogènes provoqués pendant la réplication (BANÁTH *et al.*, 2004). Les cellules en S et G2 présentent une augmentation considérable de foci. Il est difficile de voir, presque impossible de distinguer à l'œil, à quelles phases appartiennent les cellules lors de la prise de photos. Un autre problème a également été rencontré. Doit-on compter les foci que sur une coupe de la cellule ou doit-on acquiescer des images sur un plan tri-dimensionnel pour déterminer le nombre de foci ? Les deux façons ont été faites. La méthode par une seule coupe est simple, mais comporte son lot de désavantages. À faible dose d'irradiation, le décompte de foci est facile mais plus la dose d'irradiation augmente moins il est facile d'en compter le nombre. Les foci deviennent très nombreux, leurs diamètres s'amplifient et prennent une forme irrégulière. Les nouveaux microscopes permettent d'effectuer des images 3D des noyaux. L'acquisition d'images tridimensionnelles d'une cellule a été envisagée pour nos

expériences. Cette méthode demande d'effectuer plusieurs photos (environ 50 par cellule), afin de dénombrer tous les foci présents à l'intérieur d'une même cellule. Nous avons écarté cette méthode à cause de la trop grande charge de travail qu'elle représentait. Certaines équipes ont voulu faciliter cette manière de faire à l'aide de programmes informatiques (BÖCKER et ILIAKIS, 2006), mais ces méthodes d'analyse restent encore qu'à leur début. Depuis peu de temps, notre centre de recherche dispose d'un nouvel équipement, le iCyte™ Imaging Cytometer, un microscope permettant d'effectuer sensiblement les mêmes applications qu'un cytomètre de flux. Il permet de travailler à partir d'échantillons fixés sur lame et même dans des plaques avec des puits pour la culture de cellules. On peut procéder à la quantification de  $\gamma$ -H2AX par la fluorescence FITC en rapport à la quantité d'ADN cellulaire par PI. Comme l'appareil était nouveau et que l'application de la technique n'était pas au point nous avons eu recours à une autre méthode d'analyse pour  $\gamma$ -H2AX soit l'utilisation d'un cytomètre de flux conventionnel. Cependant, il serait intéressant de pouvoir exploiter ce système dans un avenir rapproché.

L'utilisation du cytomètre de flux s'est avérée être la méthode de choix. En plus de pouvoir quantifier  $\gamma$ -H2AX, nous avons la possibilité d'utiliser un second fluorochrome pour pouvoir distinguer le cycle cellulaire d'une cellule à l'autre. Ce qui a permis de discriminer les cellules en G1 des autres phases du cycle. Les cellules en G1 sont celles qui possèdent l'expression endogène la plus faible. Ainsi il est possible d'établir plus précisément les dommages causés par les radiations ionisantes ainsi que par le BrdU. Les résultats obtenus démontrent très bien que le bruit de fond en phase S et G2-M cause une réduction de la sensibilité de détection des bris double brin. Lorsqu'on

limite les mesures à la phase G1, la détection semble plus évidente. L'analyse de  $\gamma$ -H2AX par cytométrie de flux a été pour nous une excellente façon de quantifier la protéine phosphorylée. Cette affirmation reste encore plus vraie à un niveau de dommages élevé. L'augmentation de bris double brin causée par l'irradiation est donc évidente. Ce qui corrobore les études effectuées auparavant. Mais la quantité de bris ne semble pas être affectée par la présence de BrdU. Ce qui permet d'affirmer que BrdU n'induit pas la présence de cassures doubles brin dans l'ADN.

#### **IV.5. Choix du fluorochrome pour l'essai comète (SYBR gold et PI)**

Le fluorochrome SYBR gold est considéré par la compagnie Invitrogen comme étant le colorant le plus sensible sur le marché pour la détection de l'ADN et de l'ARN sur gel. Il est aujourd'hui l'un des colorants nucléaires les plus utilisés dans les laboratoires de recherche à travers le monde. Comme l'essai comète suscite l'intérêt des chercheurs pour leurs études des dommages à l'ADN depuis quelques années, plusieurs ont préféré le SYBR gold pour leurs analyses.

Nos travaux soulèvent un doute quand à la non reproductibilité (résultats non présentés) entre les deux colorants (SYBR gold et PI) et ce principalement pour les méthodes alcalines. Nous croyons que les différentes solutions utilisées lors du procédé de lyse pourraient en être la cause.

Les programmes d'analyse pour l'essai comète tiennent compte du nombre de pixels présents dans l'image afin de pouvoir estimer le pourcentage d'ADN présent dans chaque partie de la comète. Une équipe de recherche a effectué une étude comparative sur l'utilisation des deux colorants. Leur conclusion est que le SYBR gold ne serait pas un

choix judicieux puisqu'il y aurait saturation de ce colorant dans la région de la tête de la comète ce qui affecterait la mesure du tail moment (McNamee *et al.*, 2000). On peut croire qu'il serait important de s'assurer de l'efficacité du colorant pour cette méthode d'analyse. Nos observations suggèrent qu'une étude plus exhaustive pourrait permettre de faire la lumière sur cette ambivalence.

#### **IV.6. Effet de l'irradiation des cellules sur lame**

La littérature rapporte peu d'auteurs ayant utilisé comme technique l'irradiation des cellules directement incluses dans l'agarose. Cependant, il serait important de considérer l'impact que peut avoir l'irradiation sur ce polymère. Dans nos essais, la formation d'un halo plus important a été observée chez les cellules qui avaient été incluses dans l'agarose avant d'être irradiées. Les résultats (non présentés) ont aussi démontré des dommages à l'ADN qui atteignaient un plateau plus rapidement et ce à plus faible dose. Le changement engendré à l'agarose par les radiations pourrait modifier le parcours de l'ADN lors de la migration. Il serait intéressant de voir l'effet des radiations sur l'agarose avant l'ajout des cellules. Il est fort probable que la radiation va réduire la «concentration effective» de l'agarose de façon dépendante de la dose, ce qui compliquera l'interprétation des résultats. Il n'est donc pas souhaitable d'utiliser cette méthodologie pour l'analyse de l'essai comète.

## V. Conclusion

L'utilisation des radiations ionisantes fait partie des traitements anticancéreux depuis le tournant des 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles. Cependant, la radiothérapie dispose que d'une mince fourchette de doses. Sans quoi, à forte dose, elle peut entraîner des complications importantes chez le patient et à faible dose, donner lieu à une récurrence de la tumeur. L'utilisation de la radiothérapie combinée à certaines drogues sélectives est donc une avenue stratégique afin d'augmenter l'effet létal aux cellules tumorales.

Les travaux effectués tout au long de cette maîtrise confirment l'induction de bris simple et double brin à l'ADN suite aux radiations ionisantes. L'essai comète alcaline confirme l'hypothèse que les cellules ayant incorporé du BrdU augmentent le nombre de bris simple brin. Nos expériences faites avec l'essai comète neutre ne présentent aucune augmentation de bris double brin induit par la présence de BrdU après irradiation. Mais selon le biomarqueur  $\gamma$ -H2AX aucune augmentation de bris double brin n'a été démontrée sauf peut-être à concentration de 10  $\mu$ M. Quoique, nous avons pu observer la présence de ponts (méthode comète neutre) dans l'ADN des cellules qui avaient incorporé du BrdU. Nous croyons que les résultats de ces travaux auront un impact positif sur l'avancement des études du BrdU.

Les dimères interbrins font partie des lésions potentiellement létales pour une cellule et plusieurs agents chimiothérapeutiques anticancéreux comme le cisplatine et la mitomycine-C, utilisent ce principe afin d'empêcher la prolifération cellulaire tumorale. Il a été démontré pour la première fois à l'aide d'oligonucléotides (CECCHINI *et al.*, 2005) que le 5-bromodéoxyuridine pouvait également induire des ICL sous exposition

aux rayons UV et aux radiations ionisantes. Ce type de lésions est complexe et est difficilement réparable pour la cellule. Plusieurs auteurs sont d'avis que la réparation des ICL passerait d'abord par leur conversion en bris double brin (NIEDERNHOFER *et al.*, 2004). Nos résultats obtenus avec les essais comètes et  $\gamma$ -H2AX démontrent le potentiel du BrdU à causer des dimères interbrins, toutefois, les essais ne sont pas parfaitement au point. Mais les derniers résultats effectués au cours de cette maîtrise sont prometteurs pour les futurs développements. Ces études préliminaires effectuées dans les cellules sont encourageantes et confirment que nous sommes sur une bonne piste.

L'ensemble de ses travaux ont confirmé en bonne partie notre hypothèse. L'irradiation de l'ADN en présence de BrdU augmente le nombre de bris simple brin sans toutefois augmenter le nombre de bris double brin.

La mise au point d'une nouvelle technique, communément appelée le Comète FISH, est basée à la fois sur l'utilisation de l'essai comète et de sondes fluorescentes "fluorescence *in situ* hybridation" (HORVÁTHOVÁ *et al.*, 2004). Elle permet la détection de séquences d'ADN spécifiques où il y a eu production de dommages (SANTOS *et al.*, 1997). Il serait intéressant de pouvoir appliquer cette technique sur nos échantillons, afin de démontrer à quel endroit d'un gène sont induits les dommages par le BrdU.

Les études réalisées par Cecchini et coll. ont démontré que sous irradiations UV, les cellules ayant incorporé de BrdU dans leur ADN ne démontrent pas le même patron de dommages que celles irradiées avec des radiations ionisantes. Il serait intéressant de pouvoir refaire les expériences présentées dans ce mémoire en irradiant les cellules avec une source d'énergie UV.

L'utilisation de cellules déficientes en réparation de dimères pourrait nous permettre de voir si BrdU induit réellement des dimères. Les cellules AF (anémie de Fanconi) présentent une hypersensibilité aux agents pontants. Le problème est situé au niveau de la voie protéique FANC/BRCA, impliquée dans la réparation et la résolution du blocage des fourches de réplication des lésions de l'ADN (ROTHFUSS et GROMPE, 2004).

L'exposition au rayonnement gamma de cellules hypoxiques ayant incorporées du BrdU serait également intéressant. Car nous pourrions constater s'il y a une augmentation ou non de la toxicité.

Suite aux efforts soutenus de recherche de Sylvain Cecchini qui a ouvert un nouveau regard au fonctionnement du BrdU, mon travail représente un autre maillon vers la compréhension des mécanismes d'action du BrdU sur les cellules tumorales post-irradiées. Une fois complètement élucidé, nous serons en mesure d'utiliser cet agent radiosensibilisant, le 5-bromodéoxyuridine (BrdU) de façon plus efficient dans le traitement contre le cancer. En ciblant de façon plus spécifique l'ADN des cellules tumorales, cela nous permettra de diminuer les effets secondaires qu'une forte dose d'irradiation peut occasionner chez les patients sous traitements.

Sommairement, nos résultats suggèrent que le 5-bromodéoxyuridine (BrdU) cause effectivement une augmentation de bris simple brin induit à l'ADN. Nous croyons que la radiosensibilisation des cellules soumises aux radiations peut-être expliquée par la présence de ponts interbrins engendrés par le BrdU.

### Remerciements

Je veux sincèrement remercier mes directeurs de recherche Dr **Léon Sanche** et Dr **Darel Hunting** d'avoir accepté de diriger mes travaux de recherche tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à te remercier **Léon** pour ton écoute. Cela m'a grandement aidé de savoir que je pouvais compter sur une oreille attentive.

**Darel**, je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout le mal que tu t'es donné afin que je puisse poursuivre ces études à la maîtrise. Désolée de t'avoir fait craindre le pire à quelques reprises. Tu seras toujours pour moi un modèle de par les connaissances éclectiques (science, écologique, financier,...) que tu possèdes. Merci de m'avoir donné la chance de faire partie de ton laboratoire, cela a été pour moi un excellent lieu d'apprentissage.

Je voudrais également remercier Dr **van Lier** pour m'avoir donné un emploi en début de carrière. Ce qui a grandement contribué à faire naître cette flamme pour le domaine de la recherche.

Merci **Dany** pour ton amour et ta présence si précieuse. Tu es mon partner à tous points de vue dans la vie. Sans toi, toutes ces études et les prochaines à venir n'auraient



## Remerciement

---

pas lieu. Merci d'avoir confiance et de m'encourager dans ma galère même si cela voulait dire de remettre à plus tard des projets. Je t'aime.

**Léa**, ma princesse chérie, pour qui je porte un amour inconditionnel. Je sais que cela n'a pas toujours été le fun de voir maman à l'étude. Mais sache que je l'ai fait aussi pour toi. Dans la vie, plusieurs choses sont possibles lorsqu'on y croit et que l'on met les efforts nécessaires. Mords dans la vie et crois en toi, tu es une girl formidable. Papa et maman serons toujours près de toi si tu as besoin. Je t'aime, ne l'oublie jamais.

**Maman**, à qui j'ai causé beaucoup de stress de me voir retourner aux études. Tu vois, j'y suis arrivée. Je sais que dans ton cœur, je serai toujours petite, mais je suis une grande fille maintenant. Je t'aime même si des fois, je trouve que tu te fais des peurs.

Un merci spécial à :

**Ariane** pour ton renfort à la compréhension de la partie physique pour le cours sciences des radiations. J'y suis arrivée. Merci pour tous tes encouragements.

**Daniel** pour tout ce qui touche à l'informatique, j'étais une néophyte dans ce domaine et voilà que maintenant je me débrouille pas pire.

**Etienne** pour ton aide avec le programme Word, car sinon mon mémoire ne serait pas encore complété.

**Marie-Eve** qui m'a encouragée "tu vas y arriver" dans mes nombreux moments de découragement.

**Rosalie** pour ton temps consacré à la correction de ce mémoire. Merci d'être aussi généreuse de ton temps.

**Sonia** pour ta collaboration avec les comètes qui a grandement contribué à l'aboutissement des résultats.

**Sylvain** pour m'avoir fait confiance avec l'organisation de tes cahiers de labo. Merci aussi pour tes encouragements à poursuivre mes études. Mais surtout pour m'avoir inspiré ce projet.

**Pierrette** pour ton aide si précieuse au service des étudiants et tes encouragements. Au nom de tous les étudiants, merci.

Merci **Sheela** pour ton aide considérable pour l'analyse de  $\gamma$ -H2AX au cytomètre de flux. Sans toi, je n'y serais pas encore parvenu.

À la **gang du midi**, je vais m'ennuyer de vous, des sujets et des blagues.

Je remercie les autres **membres du département** avec qui j'ai collaboré pendant mon long séjour au département. Cela a été vraiment une expérience enrichissante.

## Remerciement

---

Merci à **Dr Olive** pour son aide et son expertise lors de mon séjour à Vancouver.  
Ainsi qu'à **Judit Banáth** pour son dévouement et sa patience à m'enseigner la technique.

Je voudrais également remercier les **Drs Guylain Boissonneault** et **Richard Wagner** pour leur temps accordé à la correction de ce mémoire. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et d'avoir livré la marchandise.

Merci à vous tous et je garderai d'agréables souvenirs du monde de la recherche.

**Références**

**Abraham, R.T.** Cell cycle checkpoint signalling through the ATM and ATR kinases. *Genes and Dev.* 15, 2177-2196 (2001)

**Ackland, S.T., Schilsky, R.L., Beckett, M.A. and Weichselbaum, R.R.** Synergistic Cytotoxicity and DNA Strand Break Formation by Bromodeoxyuridine and Bleomycin in Human Tumor Cells. *Cancer Research* 48, 4244-4249 (1988)

**Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B.** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506 (2003)

**Banáth, J.P., Kim, A. and Olive, P.L.** Overnight Lysis Improves the Efficiency of Detection of DNA Damage in the Alkaline Comet Assay. *Radiation Research* 155, 564-571 (2001)

**Banáth, J.P. and Olive, P.L.** Expression of Phosphorylated Histone H2AX as a Surrogate of Cell Killing by Drugs That Create DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Research* 63, 4347-4350 (2003)

**Banáth, J.P., MacPhail S.H. and Olive, P.L.** Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 64, 7144-7149 (2004)

**Barber, P.R., Locke, R.J., Pierce, G.P., Rothkamm, K. and Vojnovic, B.** Gamma-H2AX Foci Counting: Image processing and control software for high-content screening. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues V*, ed. Proc. Of SPIE vol 6441 (2007)

**Bartek, J., Lucas, C. and Lukas, J.** Checking on DNA damage in S phase. *Molecular Cell Biologie* 5, 792-804 (2004)

**Berry, S.E., Garces, C., Hwang, H-S., Kunugi, K., Meyers, M., Davis, T.W., Boothman, D.A. and Kinsella T.J.** The Mismatch Repair Protein, hMLH1, Mediates 5-Substituted Halogenated Thymidine Analogue Cytotoxicity, DNA Incorporation, and Radiosensitization in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* 59, 1840-1845 (1999)

**Bilsland, E. and Downs, J.A.** Tails of histones in DNA double-strand break repair. *Mutagenesis* 20 (3), 153-163 (2005)

**Böcker, W. and Iliakis, G.** Computational Methodes for Analysis of Foci: Validation for Radiation-Induced  $\gamma$ -H2AX Foci in Human Cells. *Radiation Research* 165, 113-124 (2006)

**Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L., Hunting, D.J.** Single-Strand-Specific Radiosensitization of DNA by Bromodeoxyuridine. *Radiation Research* 162, 604-615 (2004)

**Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L., Hunting, D.J.** Interstrand Cross-Links: A New Type of  $\gamma$ -Ray Damage in Bromodeoxyuridine-Substituted DNA. *Biochemistry* 44, 1932-1940 (2005)

**Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., Nussenzweig, A.** Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial reconnection of DNA breaks. *Nature Cell Biology* 5, 675-679 (2003)

**Collins, A.R.** The Comet Assay for DNA Damage and Repair Review. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261 (2004)

**De Villartay, J-P.** Physiopathologie de la recombinaison V(D)J su SCID T-B à la leucémie. *Hématologie* 5 (1), 31-42 (1999)

**Dewey, W.C. and Humphrey, R.M.** Increase in Radiosensitivity to Ionizing Radiation Related to Replacement of Thymidine in Mammalian Cells with 5-Bromodeoxyuridine. *Radiation Research* 26, 538-553 (1965)

**Dusinska, M. and Collins, A.R.** The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 1-15 (2008)

**Ehrenhofer-Murray, A.E.** Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair Review. *Eur. J. Biochem* 271, 2335-2349 (2007)

**Eot-Houllier, G., Eon-Marchais, S., Gasparutto, D. and Sage, E.** Processing of a complex multiply damaged DNA site by human cell extracts and purified repair proteins. *Nucleic Acids Research* 33 (1), 260-271 (2005)

**Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. And Nussenzweig, A.** H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* 3, 959-967 (2004)

**Fillingham, J., Keogh, M-C., Krogan, N.J.**  $\gamma$ H2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem. Cell Biol.* 84, 568-577 (2006)

**Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z-Y, Aune, G.J., Redon, C., Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Rogakou, E.P., Celeste, A., Chen, H.T., Nussenzweig, A., Aladjem, M.I., Bonner, W.M. and Pommier Y.** Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complex. *The journal of biological Chemistry* 278 (22), 20303-20312 (2003)

**Garcia, C.L., Mechilli, M., Proietti De Santis, L., Schinoppi, A., Kobos, K. and Palitti, F.** Relationship between DNA lesions, DNA repair and chromosomal damage induced by acetaldehyde. *Mutation Research* 662, 3-9 (2009)

**Gérard, J.P., Schlumberger, M.** Recherches en radiobiologie. *Nucléaire et Santé Actualités* 61, 1-4 (2007)

**Greenwood, S.K., Hill, R.B., Sun, J.T., Armstrong, M.J., Johnson, T.E., Gara, J.P. and Galloway, S.M.** Population Doubling: A Simple and More Accurate Estimation of Cell Growth Suppression in the In Vitro Assay for Chromosomal Aberrations That Reduces Irrelevant Positive Results., *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43, 36-44 (2004)

**Gulston, M., de Lara C., Jenner, T., Davis, E. and O'Neill P.** Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Research* 32 (4), 1602-1609 (2004)

**Gunther, E.J., Yeasky, T.M., Gasparro, F.P. and Glazer, P.M.** Mutagenesis by 8-methoxypsoralen and 5-methylangelicin photoadducts in mouse fibroblasts: mutations at cross-linkable sites induced by offadducts as well as cross-links. *Cancer Res.* 55, 1283-1288 (1995)



**Hakala, M.T.** Mode of action of 5-bromodeoxyuridine on Mammalian Cells in Culture. *The Journal of Biological Chemistry* 234 (12), 3072-3076 (1959)

**Hall, E.J.** Radiobiologie for the Radiologiste, 5<sup>th</sup>, Lippincott Williams and Wilkins, ed. Hardcover (2000)

**Hoeijmakers, J.H.J.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374 (2001)

**Holler, V., Buard, V., Gaugler, M.H., Guipaud, O., Baudelin, C., Sache, A., Perez Mdel R., Squiban, C., Tamarat, R., Milliat, F. and Benderitter, M.** Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 129 (5), 1280-1291 (2009)

**Horváthová, E., Dušinská, M., Shaposhnikov, S. and Collins, A.R.** DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent *in situ* hybridization. *Mutagenesis* 19 (4), 269-276 (2004)

**Hu, Y.** DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 6, 261-270 (2006)

**Iliakis, G., Kurtzman, S., Pantelias G. and Okayasu R.** Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on radiation induction of

DNA and chromosome damage and its correlation with cell killing. *Radiation Research* 119, 286-304 (1989)

**Iliakis, G., Pantelias, G. and Kurtman S.** Mechanism of Radiosensitization by Halogenated Pyrimidines: Effect of BrdU on Cell Killing and Interphase Chromosome Breakage in Radiation-Sensitive Cells. *Radiation Research* 125, 56-64 (1991)

**Jones, G.D.D., Ward, J.F., Limoli, C.L., Moyer, D.J. and Aguilera, J.A.** Mechanisms of radiosensitization in iododeoxyuridine-substituted cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 67 (6), 647-653 (1995)

**Khanna, K.K., Lavin, M.F., Jackson, S.P. and Mulhern, T.D.** ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death and Differentiation* 8, 1052-1065 (2001)

**Keogh, M-C., Kim, J-A, Downey, M., Fillingham, J., Chowdhury, D., Harrison, J.C., Onishi, M., Datta, N., Galicia, S., Emili, A., Lieberman, J., Shen, X., Buratowski, S., Haber, J.E., Durocher D., Greenblatt, J.F. and Krogan, N.J.** A phosphatase complex that dephosphorylates  $\gamma$ -H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature Letters* 439, 497-501 (2006)

**Kit, S., Dubbs, D.R. and Frearson, P.M.** HeLa cells resistant to bromodeoxyuridine and deficient in thymidine kinase activity. *Int. J. Cancer* 1 (1), 19-30 (1966)

**Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Koza, Z. and Wojcik A.** A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534, 15-20 (2003)

**Krüger, I., Rothkamm, K. and Löbrich, M.** Enhanced fidelity for rejoining radiation-induced DNA double-strand breaks in the G<sub>2</sub> phase of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research* 32 (9), 2677-2684 (2004)

**Lacoste, S., Castonguay, A. and Drouin, R.** Formamidopyrimidine adducts are detected using the comet assay in human cells treated with reactive metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Mutation Research* 138-149 (2006)

**LaVerne, J.A. and Pimblott, S.M.** Yields of hydroxyl radical and hydrated electron scavenging reactions in aqueous solutions of biological interest. *Radiat. Res.* 135 (1), 16-23 (1993)

**Lawrence, T.S., Davis, M.A. and Normolle, D.P.** Effect of Bromodeoxyuridine on Radiation-Induced DNA Damage and Repair Based on DNA Fragment Size Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Radiation Research* 119, 286-304 (1995)

**Lee, E., Oh, E., Lee, J., Sul, D. and Lee J.** Use of the Tail Moment of the Lymphocytes to Evaluate DNA Damage in Human Biomonitoring Studies. *Toxicological Sciences* 81, 121-132 (2004)

**Lévy, N., Martz, A., Bresson A., Spenlehauer C., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J.** XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research* 34 (1), 32-41 (2006)

**Lewis, J.D., Abbott, D.W. and Ausio, J.** A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem. Cell Biol.* 81, 131-140 (2003)

**Li, A., Eirín-López, J.M. and Ausió, J.** H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem. Cell Biol.* 83, 505-515 (2005)

**Limoli, C.L. and Ward, J.F.** A New Method for Introducing Double-Strand Breaks into Cellular DNA. *Radiation Research* 134 (2), 160-169 (1993)

**Limoli, C.L. and Ward, J.F.** DNA damage in bromodeoxyuridine substituted SV40 DNA and minichromosomes following UVA irradiation in the presence of Hoechst dye 33258. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (6), 717-728 (1994)

**Ling, L.L., Ward, J.F.** Radiosensitization of Chinese Hamster V79 Cells by Bromodeoxyuridine Substitution of Thymidine: Enhancement of Radiation-Induced

Toxicity and DNA Strand Break Production by Monofilar and Bifilar Substitution. *Radiation Research* 121, 76-83 (1990)

**Littlefield, J.W. and Gould, E.A.** The Toxic Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Cultured Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 235 (4), 1129-1133 (1960)

**MacPhail, S.H., Banáth, J.P., Yu, Y., Chu, E. and Olive, P.L.** Cell Cycle-Dependent Expression of Phosphorylated Histone H2AX: Reduced Expression in Unirradiated but not X-Irradiated G<sub>1</sub>-Phase Cells. *Radiation Research* 159, 759-767 (2003)

**MacPhail, S.H., Banáth, J.P., Yu, T.Y., Chu, E.H.M., LAMBUR, H. and Olive, P.L.** Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 79 (5), 351-358 (2003)

**Madigan, J.P., Chotkowski, H.L., Glaser, R.L.** DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Research* 30 (17), 3698-3705 (2002)

**McKinnon, P.J.** ATM in Molecular Medicine Review Series. *EMBO reports* 5 (8), 772-776 (2004)

**McNamee, J.P., McLean, J.R.N., Ferrarotto, C.L. and Bellier, P.V.** Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research* 466, 63-69 (2000)

**Merk, O. and Speit, G.** Detection of Crosslinks With the Comet Assay in Relationship to Genotoxicity and Cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33, 167-172 (1999)

**Merk, O., Reiser, K. and Speit, G.** Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research* 471, 71-80 (2000)

**Mogi, S. and Oh, D.H.**  $\gamma$ -H2AX formation in response to interstrand crosslinks requires XPF in human cells. *DNA Repair* 5, 731-740 (2006)

**Nabben, F.J., Karman, J.P. and Loman, H.** Inactivation of biologically active DNA by hydrated electrons. *International Journal of Radiation Biology* 42, 23-30 (1982)

**Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G.J., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H.J. and Kanaar, R.** The structure-specific Endonuclease Ercc1-Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. *Molecular and Cellular Biology* 44 (13), 5776-5787 (2004)

**Olive, P.L., Wlodek, D. and Banáth, J.P.** DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research* 51, 4671-4676 (1991)

**Olive, P.L., Wlodek, D., Durand, R.E., and Banáth, J.P.** Factors Influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Experimental Cell Research* 198, 259-267 (1992)

**Olive, P.L.** The role of DNA single- and double-strand breaks in cells killing by ionizing radiation. *Radiation Research* 150, S42-S51 (1998)

**Olive, P.L., Durand, R.E., Banáth, J.P. and Johnston P.J.** Analysis of DNA Damage in Individual Cells. *Methods in cell Biology* 64, 235-249 (2001)

**Olive, P.L. and Banáth, J.P.** Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 58 (2), 331-335 (2004)

**Olive, P.L. and Banáth, J.P.** Kinetics of H2AX Phosphorylation After Exposure to Cisplatin. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 76B, 79-90 (2009)

**Ostling, O. and Johanson, K.J.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical research communications* 123 (1), 291-298 (1984)

**Park, J-H., Park E-J., Lee, H-S., Kim, S.J., Hur, S-K., Imbalzano, A.N. and Kwon J.** Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting  $\gamma$ -H2AX induction. *The EMBO Journal* 25, 3986-3997 (2006)

**Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M. and Bonner, W.** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology* 10, 886-895 (2000)

**Perche, P-Y., Robert-Nicoud, M., Khochbin, S. et Vourc'h, C.** Différenciation du nucléosome : le rôle des variants de l'histone H2A *Médecine/Science* 19, 1137-1145 (2003)

**Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A. and Bonner W.M.** Characteristics of  $\gamma$ -H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem. Cell Biol.* 81, 123-129 (2003)

**Pilili, J.P., González, N.V., Molinari, G., Reigosa, M.A., Soloneski, S. and Larramendy, M.L.** Testing genotoxicity and cytotoxicity strategies for the evaluation of commercial radiosterilized fetal calf sera. *Biological* in press 1-9 (2009)

**Plooy, A.C., van Dijik, M., Berends, F. and Lohman, P.H.** Influence of treatment temperature on the genotoxic effects of cisplatin in CHO cells: cytotoxicity, mutagenicity and induction of lesions in DNA. *Mutat. Res.* 151, 129-136 (1985)

**Prise, K.M., Pinto, M., Newman, H.C. and Michael, B.D.** A Review of Studies of Ionizing Radiation-Induced Double-Strand Break Clustering. *Radiation Research* 156, 572-576 (2001)



**Redon, C. Pilch, D. Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. And Bonner W.** Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics and Development* 12, 162-169 (2002)

**Rivière, J., Ravanat, J-L. and Wagner, J.R.** Ascorbate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative DNA damage in Jurkat cells. *Free Radical Biology and Medicine* 40, 2071-2079 (2006)

**Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner W.M.** DNA Double-stranded Breaks Induced Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10), 5858-5868 (1998)

**Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C. and Bonner, W.M.** Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. *The Journal of Cell Biology* 146 (5), 905–915 (1999)

**Rothkamm K., Krüger, I. Thompson, L.H. and Löbrich, M.** Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and Cellular Biology* 23 (16), 5706-5715 (2003)

**Rothfuss, A. and Grompe, M.** Repair Kinetics of Genomic Interstrand DNA Cross-Links: Evidence for DNA Double-Strand Break-Dependent Activation of the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. *Molecular and Cellular Biologie* 24 (1), 123-124 (2004)

**Santos, S.J., Singh, N.P. and Natarajan, A.T.** Fluorescence *in Situ* Hybridization with Comets. *Experimental Cell Research* 232, 407-411 (1997)

**Shahidi, M., Mozdarani, H. and Bryant, P.E.** Radiation sensitivity of leukocytes from healthy individuals and breast cancer patients as measured by the alkaline and neutral comet assay. *Cancer Letters* 257 (2), 263-273 (2007)

**Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider E.L.** A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191 (1988)

**Singh, N.P., Stephens, R.E. and Schneider, E.L.** Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 66 (1), 23-28 (1994)

**Sokolov, M.V., Smilenov, L.B., Hall, E.J., Panyutin, I.G., Bonner, W.M. and Sedelnikova, O.A.** Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* 1-9 (2005)

**Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M. and Jeggo, P.A.** ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer Research* 64, 2390-2396 (2004)

**Takahashi, A. and Ohnishi, T.** Does  $\gamma$ H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Letters* 229, 171-179 (2005)

**Tanaka T., Halicka, H.D., Traganos, F., Seiter, K. and Darzynkiewicz, Z.** Induction of ATM Activation, Histone H2AX Phosphorylation and Apoptosis by Etoposide. *Cell cycle* 6 (3), 371-376 (2007)

**Taneja, N., Davis, M., Choy, J.S., Beckett, M.A., Singh, R., Kron, S.J. and Weichselbaum, R.R.** Histone H2AX Phosphorylation as a Predictor of Radiosensitivity and Target for Radiotherapy. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (3), 2273-2280 (2004)

**van Attikum H. and Gasser S.M.** The histone code at DNA breaks: A guide to repair? *Molecular Cell Biology* 6, 757-765 (2005)

**van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H.J. and Kanaar, R.** Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics* 2, 196-206 (2001)

**von Sonntag, C.** Free-radical-induced DNA damage and its repair. A chemical perspective. Springer, Heidelberg (2005)

**Wada, S., Kurahayashi, H., Kobayashi, Y., Funayama, T., Yamamoto, K., Natsuhori, M. and Ito, N.** The Relationship between Cellular Radiosensitivity and

Radiation-Induced DNA Damage Measured by the Comet Assay. *J. Vet. Med Sci* 65 (4), 471-477 (2003)

**Wang, C-R., Hu, A. and Lu, Q-B.** Direct observation of the transition state of ultrafast electron transfer reaction of a radiosensitizing drug bromodeoxyuridine. *The Journal of Chemical Physics* 124, 241102-1-241102-4 (2006)

**Webb, C.F., Jones, G.D.D., Ward, J.F., Moyer, D.J., Aguilera J.A. and Ling, L.L.** Mechanisms of radiosensitization in bromodeoxyuridine-substituted cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 64 (6), 695-705 (1993)

**Wojcik, A., Bochenek, A., Lankoff, A., Lisowska, H., Padjas, A., Szumiel, I., von Sonntag, C. and Obe, G.** DNA interstrand crosslinks are induced in cells prelabelled with 5-bromo-2'-deoxyuridine and exposed to UVC radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 84, 15-20 (2006)

**Wojewódzka, M., Grądzka, I. and Buraczewska, I.** Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika* 47 (1), 1-5 (2002)

**Wong, V.W.C., Szeto, Y.T., Collins, A.R. and Benzie I.F.F.** THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research* 3 (1), 1-14 (2005)

**Yu, T., MacPhail, S.H., Banáth, J.P., Klovov, D. and Olive, P.L.** Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair* 5, 935-946 (2006)

**Yun, J., Zhong, Q., Kwak, J-Y. and Lee, W-H.** Hypersensitivity of Brcal-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene* 24, 4009-4016 (2005)

**Zheng, H., Wang, X., Warren, A.J., Legerski, R.J., Nairn, R.S., Hamilton, J.W. and Li, I.** Nucleotide excision repair and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol. Cell. Biol.* 23, 754-761 (2003)

**Zimbrick, J.D., Ward, J.F., Myers, L.S.** Studies on the chemical basis of cellular radiosensitization by 5-bromouracil substitution in DNA. I. Pulse- and steady state radiolysis of 5-bromouracil and thymine. *International Journal of Radiation Biology* 16, 505-523 (1969a)

**Zimbrick, J.D., Ward, J.F., Myers, L.S.** Studies on the chemical basis of cellular radiosensitization by 5-bromouracil substitution in DNA. II. Pulse- and steady state radiolysis of 5-bromouracil and unsubstituted DNA. *International Journal of Radiation Biology* 16, 525-534 (1969b)