

**OLIGONUCLEOTIDES COUPLES AU N,N'-2,7-
DIMETHYLDIAZAPYRENIUM (MDAP²⁺) :
ENDONUCLEASES ARTIFICIELLES**

**BERE P. Augustin¹, SIMPORE K. Jacques², MONTENAY - GARESTIER
Thérèse³, HELENE Claude³, et LEHN Jean Marie⁴**

1. Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

2. Laboratoire de Biologie, Centre Médical saint Camille, 01 B.P. 364 Ouagadougou 01, Burkina Faso

3. Laboratoire de Biophysique Moléculaire, Muséum National d'Histoire Naturelle, 43 rue Cuvier, 75232 Paris Cedex 05, France

4. Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, Collège de France, 11 Place Marcellin - Berthelot, 7505 Paris, France.

Résumé

La régulation de l'expression des gènes peut se réaliser grâce à des oligonucléotides pouvant s'apparier sur l'un des deux brins de la double hélice de l'ADN. L'initiation de la transcription du gène bla par la RNA polymérase d'E. Coli est inhibée par un oligonucléotide

complémentaire du brin transcrit dans le complexe ouvert formé par la RNA polymérase avec son promoteur. La traduction de l'ARN messager du gène 32 du phage T4 est bloquée par des oligonucléotides dirigés contre une séquence de l'ARN messager située du côté 5' de la séquence « Shine-Delgado ».

Les oligonucléotides liés de façon covalente à un intercalant peuvent aussi être utilisés pour bloquer sélectivement l'expression de gènes préalablement choisis. Dans cet esprit, de nouvelles molécules ont été synthétisées par un couplage covalent d'un agent intercalant avec un oligonucléotide. L'intercalant apporte une énergie supplémentaire qui stabilise fortement le complexe formé avec l'ADN cible. De plus, l'intercalant (MDAP²⁺) est un agent qui sensibilise la photo-coupeure du squelette phosphodiester des acides nucléiques ($\lambda > 300$ nm). Les études de dégradation d'un ADN cible (27 mère-A₈) contenant une séquence dA₈ ont été réalisées ici avec un oligothymidilate couplé avec le MDAP²⁺ (dT₈-MDAP²⁺).

Ces nouvelles familles de molécules doivent permettre de réguler artificiellement l'expression génétique à différents niveaux de l'expression (transcription, traduction) en choisissant de façon appropriée la meilleure séquence cible de l'oligonucléotide. Etant donné que l'agent intercalant est un photo-destructeur de l'acide nucléique cible, ces nouveaux produits doivent pouvoir être utilisés pour bloquer sélectivement l'expression de gènes indésirables et permettre alors le développement de nouvelles substances anti-virales ou anti-tumorales. De plus ils peuvent être utilisés pour la purification des préparations sanguines.

Mots-clés : *oligonucléotides, intercalation, régulation, diazapyrène, photo-coupeures, irradiation, substances anti-virales.*

Abstract

The control of gene regulation in living cell is usually achieved by proteins. The regulation of gene expression can also be done by oligonucleotides that bind to one of the double strand of DNA. The initiation of the transcription of gene bla by E. Coli polymerase is inhibited by an oligonucleotide complementary to the transcribed strand in the open complex with the promoter. Traduction of the mRNA of phage T₄ gene 32 is also blocked by oligonucleotides whose sequences are complementary to the 5' sequence of "Shine-Delgado".

Oligonucleotides covalently linked to an intercalating agent can also be used to block the expression of selected genes. In this way, new molecules were synthesized by coupling an intercalated dye to an oligonucleotide. The intercalating dye offers an energy that stabilizes the double helix with the DNA strand. The intercalating dye MDAP²⁺ sensibilize the strand scission of nucleic acids upon irradiation by light with $\lambda > 300$ nm. Photo degradation of a target DNA (27 mères-A₈) containing a dA₈ sequence was performed with an oligothymidilate coupled with the dye MDAP²⁺.

This new molecules can be used to regulate the genes expression at different stages of the genetic expression (transcription, translation) by choosing the best target of the oligonucleotides on DNA or on the mRNA. The intercalate dye MDAP²⁺ is a photo-destruction agent of DNA when irradiated upon $\lambda > 300$ nm. Oligonucleotides covalently linked to the MDAP²⁺ can be used to stop the expression of undesirable genes. They can also be used as anti-viral or anti-tumoral agents by blocking the tumour cell proliferation.

Key-words : oligonucleotides ; intercalation ; regulation; diazapyren ; irradiation ; photo-degradation ; anti-viral and anti-tumoral substances.

I - INTRODUCTION

Dans le but de pouvoir utiliser les nouvelles molécules que nous avons décrites dans les articles précédents, (Béré A., 1988, Béré *et al*, 1996 ; Blaker A. J. *et al*, 1986, 1988, Slama-Schwok A. *et al*, 1989), le MDAP²⁺ a été couplé par un bras pentaméthylène à un oligonucléotide (T₈) par l'intermédiaire d'une liaison phosphothioester en position 3'. Le 27 mère-A₈ que nous avons utilisé possède une séquence A₈ complémentaire de l'oligonucléotide T₈. La complémentarité de ces deux séquences doit permettre de localiser la position du MDAP²⁺ sur un site de coupure au niveau du 27 mère-A₈, l'ensemble mimant une nucléase artificielle activable par une radiation lumineuse (Slama-Schwok *et al.*, 1989, a et b, Malinge J.M., 1990). Il interfère aussi dans la réplication, la transcription et la croissance des cellules tumorales. Dans ce dernier cas, il semble induire l'apoptose des cellules tumorales et pourrait de ce fait, couplé à des oligonucléotides servir de « **médicament** » anti-tumorales (Roknic S. *et al*, 2000).

En effet, les oligonucléotides peuvent être utilisés pour bloquer d'une façon sélective l'expression d'un gène. La formation d'un complexe spécifique entre un oligonucléotide et sa séquence cible complémentaire sur un ADN entraîne une inhibition de la synthèse protéique par une inhibition de la transcription (Green P. J. *et al* 1986 ; Toulmé J. J. and Hélène C., 1988 ; Hélène C. 1987). L'utilisation de ces oligonucléotides présente un certain intérêt dans la régulation de l'expression des gènes (Le Doan T. *et al*, 1989 ; Hélène C., 1987, Stein C. A. *et al*, 1988). C'est ainsi que des oligonucléotides dirigés contre des séquences des ARN viraux inhibent le développement de ces virus (Zamernick P. C. and Stephenson M. L., 1978 ; Agris C. H. *et al*, 1986 ; Zamernick P. C. *et al*, 1986 ; Smith C. C. *et al*, 1986 ; Lemaître M ; *et al*, 1987 ; Zérial A. *et al*, 1987).

La stabilité des complexes formés entre l'oligonucléotide et sa séquence cible peut être accrue en attachant à l'une des extrémités de l'oligonucléotide un agent intercalant (Asseline U. *et al*, 1983, 1984). La fixation de l'oligonucléotide sur sa séquence cible reste cependant soumise à la loi d'action des masses et est donc réversible, de telle sorte qu'il est difficile d'obtenir une inhibition de 100%.

Pour rendre ces inhibitions irréversibles, des agents chimiques pouvant sensibiliser la coupure du squelette phosphodiester de la cible ont été attachés à l'extrémité 3' ou 5' des oligonucléotides de façon à les transformer en nucléases artificielles. Parmi les produits chimiques possédant une activité hydrolytique, on trouve le complexe Fer - EDTA. (Boutourin A. S. *et al*, 1984 ; Chu B. C. and Orgel L. E. 1985 ; Dreyer G. B. and Dervan P. B., 1985 ; Boidot-Forget M. *et al*, 1986), le complexe porphyrine - Fer (Le Doan T. *et al*, 1986, 1987), la phénanthroline - Cuivre (Chen B. et Sigman D. S., 1986 ; François J. C. *et al*, 1988, 1989 ; Sun J. S. *et al*, 1988). Dans ce dernier cas, après une hybridation de l'oligonucléotide avec sa séquence cible, la réaction de coupure du squelette phosphodiester est provoquée par l'addition d'un agent réducteur.

Dans le cas des complexes porphyrine - fer, le signal qui initie la réaction est une excitation lumineuse. Sur des cibles ADN ou ARN simple brin comme l'oligonucléotide 27 mère comportant une séquence dA₈, l'oligonucléotide dT₈ - porphyrine provoque des réactions de pontage avec la cible complémentaire. Un traitement de ces pontages en milieu basique conduit à une coupure de la chaîne complémentaire cible (Praseuth D. *et al*, 1986 ; Le Doan T. *et al*, 1987 ; Hélène C. 1987).

MATERIEL ET METHODE

Les oligonucléotides

Les deux oligonucléotides complémentaires possédant 27 nucléotides de long ont été synthétisés sur un synthétiseur automatique PHARMACIA - LKB, puis purifiés par chromatographie en phase réverse suivi d'une électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide. Les oligonucléotides contenant la séquence dA₈ et dT₈ sont appelés respectivement, 27 mère-A₈ et 27 mère-T₈. Les séquences des deux oligonucléotides et de leurs appariements possibles sont représentés sur le schéma ci-dessous. Le marquage à l'extrémité 5' est réalisé par la polynucléotide kinase du phage T₄ (AMERSHAN) en présence d'ATP-γ-³²P. L'octadésoxythymidilate dT₈-MDAP²⁺ a été synthétisé par la méthode des phosphotriesters en solution, suivie d'un couplage avec le MDAP²⁺ par un bras pentaméthylène sur un thiophosphate du coté 3' (Asseline U. *et al*, 1986).

SCHEMA I : Les structures des deux 27-mère (a) et les orientations possibles du T₈-MDAP²⁺ sur la séquence du 27 mère-A₈ (b). La position du MDAP²⁺ est indiquée par le symbole `.

5'-T₁G₂A₃G₄T₅G₆A₇G₈T₉A₁₀A₁₁A₁₂A₁₃A₁₄A₁₅A₁₆A₁₇T₁₈G₁₉A₂₀G₂₁T₂₂G₂₃C₂₄C₂₅A₂₆A₂₇-OH-3
3'-OH-A₂₇C₂₆T₂₅C₂₄A₂₃C₂₂T₂₁C₂₀A₁₉T₁₈T₁₇T₁₆T₁₅T₁₄T₁₃T₁₂T₁₁A₁₀C₉T₈C₇A₆C₅G₄G₃T₂T₁-5'

(a) : Les séquences du 27 mère-A₈ et du 27 mère-T₈

(5')³²P-T T T T T T T (3')
(5')³²P-T₁G₂A₃G₄T₅G₆A₇G₈T₉A₁₀A₁₁A₁₂A₁₃A₁₄A₁₅A₁₆A₁₇T₁₈G₁₉A₂₀G₂₁T₂₂G₂₃C₂₄C₂₅A₂₆A₂₇.(3')
(3') T T T T T T T T -³²P (5')

(b) : Les appariements possibles sur le 27 mère-A₈ avec la formation d'une triple hélice.

Les réactions de coupures

Pour une concentration donnée en 27 mères (simple ou double brin), des quantités croissantes de T₈-MDAP²⁺ sont ajoutées dans le tampon cacodylate 10 mM, pH 7,0 avec ou sans NaCl. Les différentes solutions sont irradiées avec une lampe HBO de 200 watts. Un filtre constitué d'une cuve en verre remplie d'eau est utilisée pour absorber les radiations de longueur d'onde inférieure à 300 nm. Les échantillons sont ensuite précipités à l'éthanol, repris dans de l'eau puis fractionnés en deux parties. Le premier aliquote est lyophilisé puis repris dans le colorant de charge de Maxam-Gilbert (3,80% de formamide déionisée contenant 0,1% de xylèncyanol et 0,1% de bleu de bromophénol). Il est chauffé à 90°C pendant une minute puis chargé sur un gel dénaturant (7M urée) de polyacrylamide 25%. La deuxième fraction est traitée avec 100 µl de pipéridine 1 M pendant 10 minutes à 90°C. Elle est lyophilisée à son tour, rincée deux fois avec de l'eau puis finalement repris dans le colorant de charge.

La migration

La migration électrophorétique s'effectue à une puissance constante de 40 watts pendant trois heures dans le tampon 1 TBE (Tris 90 mM, Borate 90 mM, EDTA 1 mM). Les gels sont ensuite autoradiographiés à - 70°C sur des films Fuji (X-Ray) pendant une nuit.

Le pourcentage de coupure est estimé par un comptage de la radioactivité des gels et par densitométrie sur les films avec un densitomètre laser LKB-2222-020.

II - RESULTATS ET DISCUSSION

II.1 - Le profil de la dégradation du 27 mère-A₈ par le T₈-MDAP²⁺.

La figure I présente l'autoradiogramme du gel obtenu en milieu neutre avec le 27 mère-A₈ ($1,13 \cdot 10^{-8}$ M en extrémités) irradié en présence de concentrations croissantes en T₈-MDAP²⁺. Des coupures sont observées au niveau des bases situées du côté 3' de la séquence A₈ et leur intensité croit avec la concentration en T₈-MDAP²⁺. L'intensité de la coupure au niveau de la thymine T₁₈ croit pour atteindre 10% pour une concentration de $1,70 \cdot 10^{-7}$ M en T₈-MDAP²⁺ exprimée en bouts et qui correspond à un rapport de 70 pour le 27-mère-A₈ (tableau I). Il apparaît en même temps, deux bandes correspondant à des espèces qui migrent plus lentement que le 27 mère. Les pourcentages des pontages et des coupures sont consignés dans le tableau I. En milieu neutre, la variation des coupures au niveau des nucléotides T₁₈, G₁₉ et G₈ en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺ sont les plus significatives.

Par analogie avec les résultats obtenus dans notre laboratoire (Le Doan T. *et al*, 1986, 1987 ; Praseuth D. *et al*, 1987 ; Boidot-Forget M. *et al*, 1986), les espèces qui migrent plus lentement que le 27 mère peuvent être identifiées à des produits de pontage du T₈-MDAP²⁺ avec le 27 mère par suite de l'irradiation.

Lorsque les échantillons sont traités 10 minutes à 90°C par la pipéridine, le profil de la dégradation devient très différent de celui observé en milieu neutre. La figure II représente un autoradiogramme du 27 mère-A₈ irradié en présence du T₈-MDAP²⁺ dans les mêmes conditions que celles de la figure I et traité par la pipéridine. Cette figure de même que les résultats du tableau I montrent que :

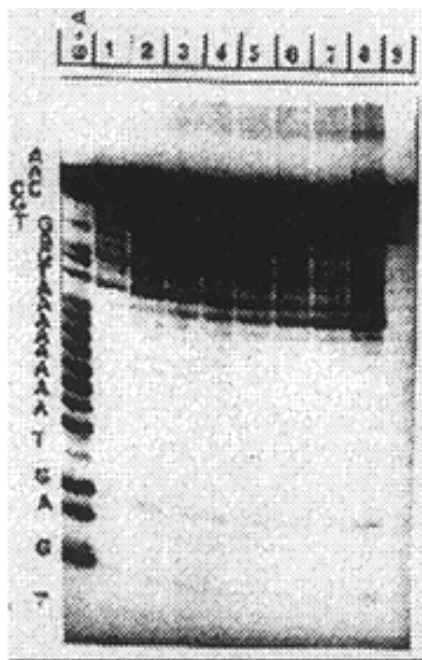
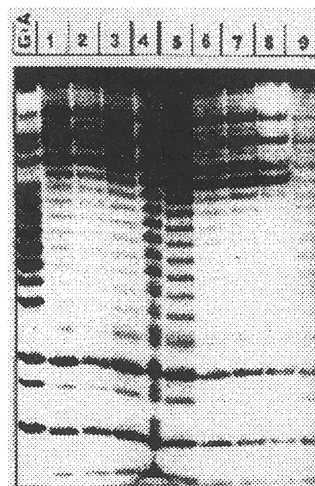


FIGURE I : Autoradiogramme d'un gel de séquence du 27 mère-A₈ ($1,13 \cdot 10^{-8}$ M en extrémités) en présence de concentrations croissantes en T₈-MDAP²⁺, dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH 7,0 et à 0°C. Le temps d'irradiation est de 30 minutes. Les concentrations en T₈-MDAP²⁺ sont respectivement du puits 1 vers le puits 8, de 1,86 ; 3,86 ; 7,71 ; 11,60 ; 15,40 ; 27,00 ; 38,60 ; 77,10 10^{-8} M en extrémités. Le puits 9 constitue le témoin 27 mère-A₈ irradié 30 minutes sans le T₈-MDAP²⁺. Le gel est réalisé en milieu neutre.

FIGURE II : Autoradiogramme d'un gel de séquence du 27 mère-A₈ ($1,13 \cdot 10^{-8}$ M en extrémités) en présence de concentrations croissantes en T₈-MDAP²⁺, dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH 7,0 et à 0°C. Le temps d'irradiation est de 30 minutes. Les concentrations en T₈-MDAP²⁺ sont respectivement du puits 1 vers le puits 8, de 1,86 ; 3,86 ; 7,71 ; 11,60 ; 15,40 ; 27,00 ; 38,60 ; 77,10 10^{-8} M en extrémités. Le puits 9 constitue le témoin 27 mère-A₈ irradié 30 minutes sans le T₈-MDAP²⁺. Le gel a été réalisé après un traitement des échantillons par la pipéridine 1 M.



➤ La coupure maximum se produit au niveau de la thymine T₁₈ du côté 3' du 27 mère-A₈.

➤ Des coupures importantes sont aussi observées au niveau des trois guanines G₁₉, G₂₁ et G₂₃ toujours du côté 3' du 27 mère-A₈

➤ La région A₈ est protégée sauf l'adénine 17 qui est partiellement coupée .

➤ Les trois guanines du côté 5' (G₄, G₆ et G₈) sont également touchées sans que l'on n'observe une augmentation des coupures par rapport à celles observées en milieu neutre.

Le MDAP²⁺ étant fixé du côté 3' de l'oligothymidylate-T₈, les coupures sont attendues du côté 5' du 27 mère-A₈ dans le cas d'un appariement antiparallèle. La base la plus proche du site de coupure dans ce cas est la thymine T₉. En milieu neutre, les coupures sur cette base sont très faibles et l'on retrouve le même résultat après avoir traité l'échantillon en milieu basique. Le tableau I donne le pourcentage de coupure des guanines G₈, G₁₉ et des thymines T₉ et T₁₇. La comparaison des pourcentages des coupures montre que :

➤ Les coupures sur la guanine 19 restent constantes quand la concentration en T₈-MDAP²⁺ augmente aussi bien en milieu neutre (4%), qu'en milieu basique (7%). L'augmentation des coupures après un traitement en milieu basique montre que les bases qui ont subi des photo-dommages sont très labiles en milieu alcalin. Il y a donc un enrichissement des coupures sur ces bases lorsque l'on traite les échantillons par la pipéridine 1 M .

➤ La guanine 8 qui n'était pas touchée en milieu neutre voit ses coupures augmentées après un traitement en milieu basique. Cependant, le taux de coupures diminue lorsque la concentration en T₈-MDAP²⁺ augmente. La disparition des pontages ne semble donc pas augmenter la coupure au niveau de la guanine 8 (G₈).

➤ La thymine 9 est très faiblement révélée en milieu basique alors qu'elle l'était en milieu neutre.

➤ La thymine 18 qui est la plus touchée en milieu neutre l'est aussi après un traitement par la pipéridine 1M. La disparition des pontages se traduit donc essentiellement par un enrichissement des coupures au niveau de cette base (T₁₈).

➤ D'un rapport 27 mère-A₈ / T₈-MDAP²⁺ pratiquement égale à l'unité (1, 65 dans le puits 1) jusqu'à un rapport de 68 (puits 9), les coupures en milieu neutre sont toujours plus importantes sur la thymine 19, donc du côté 3' du 27 mère-A₈. Les coupures du côté 5' ne sont révélées qu'après le traitement des échantillons par la pipéridine.

TABLEAU I : Les pourcentages de pontage et de coupure du 27 m^{ère}-A₈ (10⁻⁸ M en extrémités) irradié en présence de quantités croissantes en T₈-MDAP²⁺ dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH 7,0 et à 0°C. Le temps d'irradiation est de 30 minutes. La concentration en T₈-MDAP²⁺ est aussi exprimée en extrémités.

Pontages observés en milieu neutre								
[T ₈ -MDAP ²⁺ x 10 ⁶ M	0,130	0,27	0,54	0,81	1,08	1,89	2,70	5,40
% Pontage I	0,720	0,790	1,330	1,400	1,470	1,750	2,090	2,630
% Pontage II	0,720	0,900	1,620	1,850	2,070	2,850	3,250	4,090
Pourcentage de coupure en milieu neutre								
% coupure T ₁₈	0,82	0,83	2,22	1,84	2,50	3,60	6,82	10,23
% coupure G ₁₉	2,86	4,04	4,96	4,20	4,30	3,43	4,23	4,24
% coupure G ₈	0,79	1,03	0,79	0,82	0,71	0,78	0,83	0,72
Pourcentage de coupure après un traitement à la pipéridine								
% coupure G ₈	6,60	4,40	5,03	5,072	4,15	2,80	3,10	3,25
% coupure T ₉	1,90	1,30	1,40	1,40	1,40	1,40	0,95	0,95
% coupure T ₁₈	1,70	1,60	2,60	3,40	6,23	5,35	7,70	9,30
% coupure G ₁₉	6,60	6,60	8,20	7,55	10,70	6,40	6,70	5,50

2. Cinétique de la dégradation du 27 m^{ère}-A₈ par le T₈-MDAP²⁺

Pour suivre la cinétique de dégradation du 27 m^{ère}-A₈, nous sommes partis d'une concentration de 1,60 10⁻⁶ M en 27 m^{ère}-A₈ en extrémités que nous avons incubé avec une concentration en T₈-MDAP²⁺, de 1,86.10⁻⁶ M également en extrémités, à zéro degré pendant deux heures dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH 7,0 pour favoriser la formation du duplex. Le duplex est

ensuite irradié toujours à zéro degré. Les échantillons sont prélevés en fonction du temps d'irradiation et analysés sur un gel de séquence en milieu neutre et après un traitement en milieu basique. Les figures III. et IV représentent respectivement les auto-radiogrammes des gels de séquence de la dégradation du 27 mère-A₈ par le T₈-MDAP²⁺ en milieu neutre et après un traitement par la pipéridine 1 M.

Les conditions d'hybridation du T₈-MDAP²⁺ sur le 27 mère-A₈ (une concentration en sel de 250 mM de NaCl et une concentration pratiquement équimoléculaire des deux oligonucléotides, rapport = 1,16), ne sont pas favorables à la formation d'une triple hélice. Par conséquent, les coupures observées sur le 27 mère-A₈ doivent indiquer la localisation du groupement activable (MDAP²⁺) et l'orientation du brin T₈ sur la séquence complémentaire A₈.

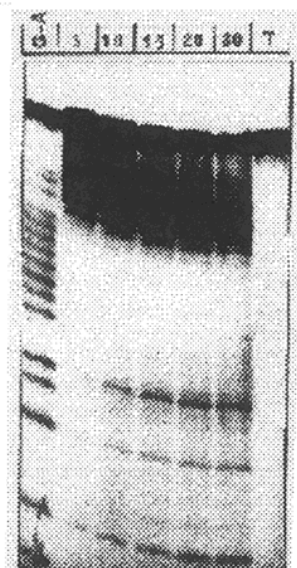
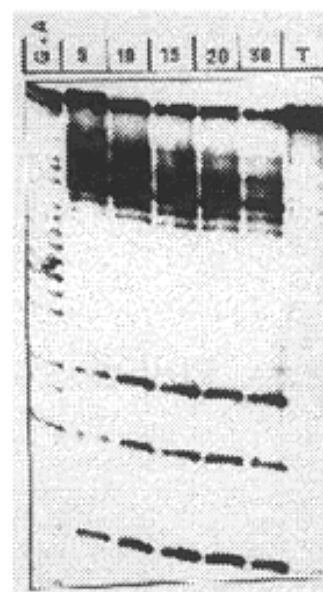


FIGURE III : Cinétique de dégradation du 27 mère-A₈ ($1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités) par le T₈-MDAP²⁺ ($1,80 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités) dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH7,0 et à 0°C. L'autoradogramme révèle les coupures directes observées en milieu neutre en fonction du temps d'irradiation. T signifie témoin.. Les chiffres indiquent le temps d'irradiation en minutes

FIGURE IV : Cinétique de dégradation du 27 mère-A₈ ($1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités) par le T₈-MDAP²⁺ ($1,80 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités) dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 250 mM à pH7,0 et à 0°C. L'autoradogramme révèle les coupures observées après un traitement des échantillons par la pipéridine 1 M. T signifie témoin non irradié. Les chiffres indiquent le temps d'irradiation en minutes. La perte de la radioactivité par rapport à la figure III montre les dommages subis par les bases de chaque côté de la séquence A₈.



➤ En milieu neutre, toutes les coupures augmentent en fonction du temps d'irradiation aussi bien du côté 5' que du côté 3' du 27 mère. Les coupures les plus intenses se situent toujours du côté 3' au niveau de la guanine G₁₉ et de la thymine T₁₈.

➤ Les coupures les plus intenses sont toujours observées du côté 3' du 27 mère-A₈ et portent essentiellement sur les guanines G₁₉, G₂₁, et G₂₃. La thymine T₁₈ et l'adénine A₁₇ sont aussi révélées mais avec une intensité plus faible que les guanines. Du côté 5', seules les guanines G₄, G₆ et G₈ sont révélées.

➤ Lorsque les échantillons sont traités par la pipéridine, on observe une augmentation des coupures par rapport au milieu neutre. Du côté 5' de la cible, l'intensité des bandes de la guanine G₈ augmente toujours en fonction du temps d'irradiation. Par contre, du côté 3' les coupures au niveau de la thymine T₁₈ et de la guanine G₁₉

restent relativement constantes. Le tableau II résume les pourcentages de coupures au niveau des trois bases G₈, T₁₈ et G₁₉.

TABLEAU II. Cinétique de coupure des bases G₈, T₁₈ et G₁₉ du 27 mère-A₈ par le T₈-MDAP²⁺ en milieu neutre et après un traitement par la pipéridine. Les pourcentages des coupures ont été calculés par densitométrie des autoradiogrammes des figures III et IV. Les concentrations sont de 1,86.10⁻⁶ M en T₈-MDAP²⁺, en extrémités et de 1,60.10⁻⁶ M en 27-mère-A₈, toujours en extrémités. Cela correspond à un rapport de 27-mère-A₈ / T₈-MDAP²⁺ de 1,16.

	Temps (mn)	5	10	15	20	30
G8	Neutre	0,98	1,90	2,40	3,30	3,91
	Pipéridine	2,99	5,45	7,94	8,15	8,71
T18	Neutre	2,70	3,70	4,50	5,50	6,01
	Pipéridine	2,40	3,49	3,74	4,29	3,81
G19	Neutre	5,70	9,80	12,00	13,30	13,30
	Pipéridine	18,83	24,42	22,14	19,30	12,60

3. Effet de la concentration en T₈-MDAP²⁺

L'énergie libre d'association du T₈-MDAP²⁺ sur sa séquence cible A₈ est la somme des énergies libres des interactions suivantes : (Hélène C. *et al*, 1985 ; Asseline U. *et al*, 1984 ; Hélène C. *et al*, 1986) :

- L'énergie libre de l'appariement de l'oligonucléotide T₈ sur la séquence A₈ complémentaire (ON)
- L'énergie libre de l'interaction de bras pentaméthylène, (B).
- L'énergie libre d'interaction de l'intercalant (MDAP²⁺) avec le duplex ainsi formé (I).

En première approximation, on peut écrire que :

$$\Delta G_{\text{ONBI}} = \Delta G_{\text{ON}} + \Delta G_{\text{B}} + \Delta G_{\text{I}}$$

De cette relation, on peut estimer la constante d'équilibre du système à une température donnée par la relation suivante :

$$K_{\text{ONBI}} = K_{\text{ON}} + K_{\text{B}} + K_{\text{I}}$$

La constante d'équilibre du système peut donc être déterminée en suivant la dénaturation thermique du complexe ainsi formé. La température de demi-dissociation du duplex est reliée à la concentration de l'oligonucléotide libre à la température du T_M par la relation suivante (Damle V., 1970) :

$$[1 / T_M] = [\Delta S / \Delta H] + [2,3R / \Delta H] \cdot \log C_m$$

La constante d'équilibre entre l'oligonucléotide T_8 et le poly (rA) est de $1,90 \cdot 10^7$ à 273 °K et de $2,3 \cdot 10^{11}$ lorsque l'oligonucléotide porte un intercalant en l'occurrence l'acridine (Hélène C. *et al*, 1985 ; Asseline U. *et al*, 1984 ; Hélène C. *et al*, 1986). La constante d'association de l'oligonucléotide T_8 -MDAP²⁺ sur sa séquence complémentaire est certainement du même ordre de grandeur que celle du T_8 -Acr (Hélène C. *et al*, 1985, 1986 ; Asseline U. *et al*, 1984 ; Béré A., 1988 ; Béré A. *et al* 1996).

La titration du T_8 -MDAP²⁺ par le poly (rA) dans les mêmes conditions de température et de force ionique montre qu'il se forme un complexe 1/1. Au cours de la titration, l'intensité de la fluorescence

du colorant diminue jusqu'à un rapport de $[\text{PO}_4^-] / [\text{MDAP}^{2+}] = 8$, ce qui correspond à un complexe 1/1. Elle reste ensuite constante jusqu'à un rapport de 20, puis croît au-delà. En effet, au début de la titration, la concentration en ligands en l'occurrence le T₈-MDAP²⁺, est en gros excès, et ceux-ci s'agrègent sur la matrice poly (rA), puis ils se redistribuent au fur et à mesure que la concentration de la matrice augmente. La fixation du T₈-MDAP²⁺ sur le poly (rA) étant une association coopérative, le signal spectroscopique du ligand (MDAP²⁺) utilisé pour suivre l'association varie lui aussi au cours de la titration en fonction de la densité de fixation (Sun J. S., 1987). Les deux types de complexe ont des absorbances différentes. Ce phénomène explique la légère augmentation observée de l'intensité de fluorescence pour des rapports $[\text{PO}_4^-] / [\text{MDAP}^{2+}]$ supérieurs à 20 (Béré *et al*, 1996).

Pour distinguer les différentes structures qui peuvent se former entre le T₈-MDAP²⁺ et le 27 mère-A₈, (double ou triple hélice) nous avons suivi la dégradation du 27 mère en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺. Les figures VA et VB représentent les autoradiogrammes d'un gel de séquence du 27 mère irradié en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺. La concentration en 27 mère-A₈ (1,60 10⁻⁶ M en extrémités) est constante dans toutes les expériences. Dans le puits A, la concentration en T₈-MDAP²⁺ est de 1,60 10⁻⁷ M, soit 10 fois plus faible que celle de la cible complémentaire. Dans le puits B, elle est égale à celle de la cible et dans le puits C, elle est 10 fois plus grande que celle du 27 mère-A₈.

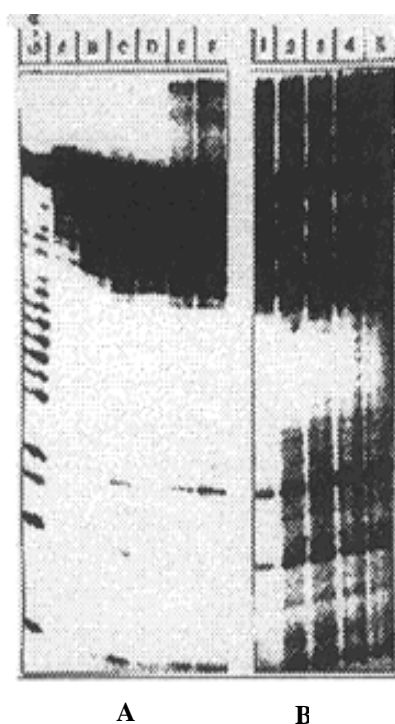


FIGURE VA : Gel de séquence du 27-mère- A_8 irradié en milieu neutre en fonction de la concentration en T_8 -MDAP $^{2+}$ et de la concentration en sel. La concentration en 27-mère- A_8 est $1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités dans tous les puits.

Les puits A, B et C ne contiennent pas de sel et les concentrations en T_8 -MDAP $^{2+}$ sont respectivement de : puits A : $1,60 \cdot 10^{-7}$ M ; puits B : $1,60 \cdot 10^{-6}$ M, puits C : $1,60 \cdot 10^{-5}$ M toujours en extrémités.

Les puits D, E et F contiennent chacun $1,60 \cdot 10^{-6}$ M en T_8 -MDAP $^{2+}$ et des concentrations salines de 100 mM, 250 mM, 500 mM respectivement en NaCl. Les puits E et F montrent la formation de pontages entre le 27-mère- A_8 et le T_8 -MDAP $^{2+}$. Ces produits migrent plus lentement que le 27-mère A_8 .

FIGURE VB : Cette figure montre l'effet de la concentration du sel sur la formation des pontages. Les puits 1 à 5 contiennent la même concentration en 27-mère- A_8 et T_8 -MDAP $^{2+}$ de $1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités. Les concentrations en sel varient respectivement de 0,10 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,75 et 1 ; 00 mM en NaCl. La force ionique semble donc favoriser la formation de triple hélice.

Dans les puits A et B, la concentration de l'oligonucléotide et l'absence de sel ne doivent pas favoriser la formation d'une triple hélice. Dans ces conditions, si l'appariement entre le 27-mère- A_8 et le T_8 -MDAP $^{2+}$ se fait de façon antiparallèle, alors les coupures sont attendues du côté 5' du 27-mère et les bases les plus touchées doivent être la thymine T_9 , la guanine G_8 , l'adénine A_7 et la guanine G_6 . Manifestement, sur les puits A et B de la figure V les bases les plus touchées sont les trois guanines du côté 3' du 27-mère- A_8 .

Dans le puits C, où la concentration en T₈-MDAP²⁺ est 10 fois plus grande que la cible, les pourcentages de coupures sont respectivement de 2% pour la guanine G₈, 3% pour la thymine T₁₈ et 10% pour la guanine G₁₉. La thymine T₉ du côté 5' n'est pas du tout révélée quelle que soit la concentration en T₈-MDAP²⁺. Cependant, c'est cette base qui devrait être la plus touchée dans le cas d'un appariement antiparallèle du T₈-MDAP²⁺ sur sa séquence complémentaire. Le T₈-MDAP²⁺ s'apparie donc parallèlement au 27 mère-A₈ et favorise la formation d'une triple hélice.

Lorsque les échantillons sont traités en milieu basique, les coupures augmentent du côté 5' du 27 mère-A₈. Les figures VIA et VIB représentent les auto-radiogrammes du gel de séquence du 27 mère-A₈ irradié en présence du T₈-MDAP²⁺ après un traitement des échantillons par la pipéridine 1 M. La disparition des pontages s'effectue essentiellement au profit d'une accumulation des coupures sur les trois guanines (G₄, G₆ et G₈) du côté 5' du 27 mère-A₈.

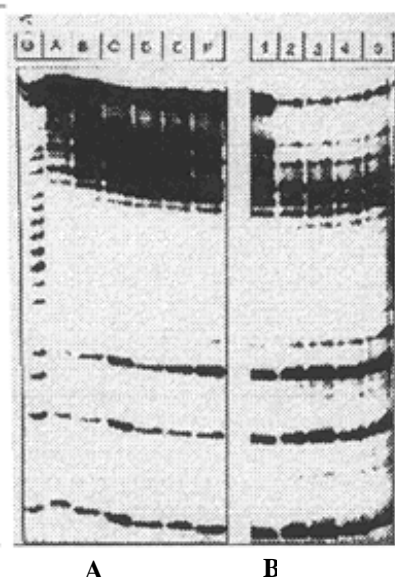


FIGURE VIA : Gel de séquence du 27 mère-A₈ irradié en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺ et de la concentration en sel. La concentration en 27 mère-A₈ est 1,60.10⁻⁶ M en extrémités dans tous les puits. Les échantillons ont été traités 10 minutes à 90°C par la pipéridine.

Les puits A, B et C ne contiennent pas de sel et les concentrations en T₈-MDAP²⁺ sont respectivement de : puits A : 1,60.10⁻⁷ M ; puits B : 1,60.10⁻⁶ M, puits C : 1,60.10⁻⁵ M toujours en extrémités.

Au cours de l'irradiation, le T_8 -MDAP²⁺ peut s'autodégrader et libérer dans le milieu des fragments d'oligothymidilate ou du MDAP²⁺ libre. Ces fragments ou le MDAP²⁺ libre en se fixant sur le 27 mère- A_8 peuvent être à l'origine des coupures observées du côté 3' de la cible. Pour cela, le T_8 -MDAP²⁺ a été marqué du côté 5' et nous avons vérifié que les produits marqués correspondent bien à un T_8 -MDAP²⁺ qui migre comme un oligo- T_{10} . La réduction du nombre de charge et la présence du colorant retardent la migration de l'oligonucléotide sur un gel de polyacrylamide. Lorsque le T_8 -MDAP²⁺ est irradié tout seul, on observe une dégradation de l'oligonucléotide avec l'apparition de fragments plus courts.

En introduisant dans le milieu réactionnel un produit servant de piège pour la MDAP²⁺, on peut masquer les coupures non spécifiques et ne faire apparaître que les coupures spécifiques dues au T_8 -MDAP²⁺ apparié sur la cible complémentaire. Pour cela, un grand excès de poly d(G-C)-poly d(G-C) a été ajouté dans le milieu réactionnel pour piéger le MDAP²⁺ libre dont la constante de fixation sur ce polynucléotide ($1,00 \cdot 10^{-6} M^{-1}$) est très élevée (Béré *et al.*, 1995).

La figure VIIA représente l'autoradiogramme d'un gel de séquence du 27 mère- A_8 ($1,60 \cdot 10^{-6} M$) irradié en présence du T_8 -MDAP²⁺ (puits A, B, et C) et en présence d'un excès de poly d(G-C)-poly d(G-C) (puits D, E et F).

Les puits A, B et C contiennent respectivement : $1,68 \cdot 10^{-6} M$; $8,40 \cdot 10^{-6} M$ et $1,68 \cdot 10^{-5} M$ en T_8 -MDAP²⁺. La concentration en sel est de 100 mM. Les guanines de chaque côté de la séquence A_8 sont touchées. Par contre l'adénine A_{17} et la thymine T_{18} du côté 3' du 27 mère sont plus touchées que l'adénine A_{10} et la thymine T_9 du côté 5'.

Les puits D, E et F contiennent $1,68 \cdot 10^{-6} M$; $8,40 \cdot 10^{-6} M$ et $1,68 \cdot 10^{-5} M$, respectivement en T_8 -MDAP²⁺ et $1,30 \cdot 10^{-4} M$ (en phosphate) de poly d(G-C)-poly d(G-C). Le profil de coupure observé sur ces

trois puits est le même que celui observé sur les puits A, B et C. Ce résultat démontre que l'addition du poly d(G-C)-poly d(G-C) pour piéger les produits de dégradation du T₈-MDAP²⁺ ne modifie pas le profil de dégradation du 27 mère-A₈. Les coupures les plus importantes sont toujours du côté 3' de la séquence A₈ du 27 mère et ne sont donc pas dues à du MDAP²⁺ libre ou à de courts fragments d'oligothymidilate portant toujours le MDAP²⁺.

Lorsque les échantillons sont traités en milieu basique, on observe une disparition des pontages et une augmentation de la dégradation du 27 mère-A₈ du côté 5'. Les guanines G₄, G₆ et G₈ sont révélées avec beaucoup plus d'intensité. La thymine T₉ et l'adénine A₁₀ qui étaient absentes sur la figure VIIA sont maintenant révélées. La figure VIIB représente l'autoradiogramme du gel de séquence du 27 mère-A₈. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles de la figure VIIA, mais les échantillons ont été traités 10 minutes à 90°C par la pipéridine 1 M.

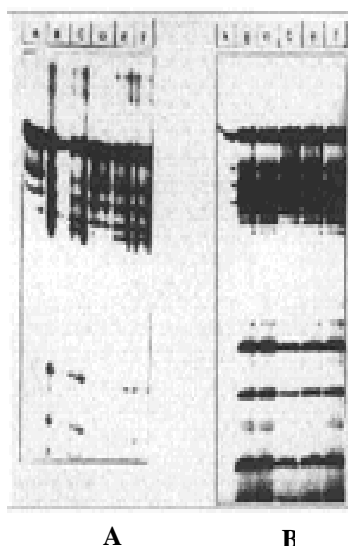


FIGURE VIIA : Autoradiogramme du gel de séquence du 27 mère-A₈ ($1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités) irradié en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺ seul (puits A, B et C) et présence d'un excès de poly d(G-C)-poly d(G-C) (puits D, E et F) dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 à 0°C.

Puits A : [T₈-MDAP²⁺] = $1,60 \cdot 10^{-6}$

Puits B : [T₈-MDAP²⁺] = $8,40 \cdot 10^{-6}$

Puits C : [T₈-MDAP²⁺] = $1,60 \cdot 10^{-5}$

Les puits D, E et F contiennent respectivement les mêmes concentration en T₈-MDAP²⁺ que les puits A, B et C, mais de plus, ils contiennent tous $1,30 \cdot 10^{-4}$ M en poly d(G-C)-poly d(G-C).

FIGURE VIIB : Autoradiogramme du gel de séquence du 27 mère-A₈ (1,60.10⁻⁶ M en extrémités) irradié en fonction de la concentration en T₈-MDAP²⁺ seul (puits A, B et C) et présence d'un excès de poly d(G-C)-poly d(G-C) (puits D, E et F) dans le tampon cacodylate 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 à 0°C.

Puits A : [T₈-MDAP²⁺] = 1,60.10⁻⁶

Puits B : [T₈-MDAP²⁺] = 8,40.10⁻⁶

Puits C : [T₈-MDAP²⁺] = 1,60.10⁻⁵

Les puits D, E et F contiennent respectivement les mêmes concentration en T₈-MDAP²⁺ que les puits A, B et C, mais de plus, ils contiennent tous 1,30.10⁻⁴ M en poly d(G-C)-poly d(G-C). Tous les échantillons ont été traités pendant 10 minutes par la pipéridine 1 M, alors que les pontages disparaissent.

4. Effet de la force ionique

La Formation d'une triple hélice est favorisée par une augmentation de la force ionique, par la présence de certaines polyamines comme la spermine et aussi par certains polyols (éthylèneglycol) qui réduisent la répulsion des charges négatives des phosphates (Riley M. *et al*, 1966 ; Moser H.E. and Dervan P.D., 1987). Lorsque la concentration en NaCl augmente, l'intensité et la spécificité des coupures produites par le T₈-MDAP²⁺ sur le 27 mère-A₈ augmente du côté 3' en milieu neutre.

La figure V montre l'effet de la concentration en sel sur le profil de dégradation du 27 mère-A₈. Les puits D, E et F contiennent 1,6 10⁻⁶ M en 27 mère-A₈ et 1,6 10⁻⁶ M en T₈-MDAP²⁺ La concentration en sel est respectivement de 100 mM, 250 mM et 500 mM. A faible force ionique, les bases les plus touchées sont toutes du côté 3' de la séquence A₈. Lorsque la concentration en NaCl augmente, les coupures apparaissent des deux côtés de la séquence A₈. Ces coupures

ne peuvent être interprétées que par la formation d'une triple hélice car il apparaît en outre des produits de pontage en quantité croissante.

Dans les puits 1 à 5, la concentration en T₈-MDAP²⁺ est 10 fois supérieure à celle du 27^{ème} A₈. La concentration en NaCl varie de 100 mM dans le puits 1 à 1M dans le puits 5. Le profil de dégradation observé met encore en évidence des coupures de chaque côté de la séquence A₈. Dans ces conditions, et comme démontré précédemment, ces résultats prouvent la formation d'une triple hélice entre la séquence A₈ du 27^{ème} et le T₈-MDAP²⁺.

Le traitement des échantillons par la pipéridine 1 M (figures VIA et VIB) augmente l'intensité de coupure au niveau de toutes les bases mais surtout du côté 5' de la séquence A₈. Le tableau III donne le pourcentage de coupure de trois bases prises de chaque côté de la séquence A₈. Ces pourcentages ont été calculés à partir des densitogrammes des figures V et VI. On observe un enrichissement des coupures sur les guanines G₈ et G₁₉, par contre le pourcentage reste relativement constant au niveau de la thymine T₁₈.

Tableau III : Pourcentage de dégradation du 27 mère- A_8 par le T_8 -MDAP²⁺ mesuré sur les bases G_8 , T_{18} , G_{19} en fonction de la concentration en NaCl. La concentration en 27 mère- A_8 est toujours égale à $1,60 \cdot 10^{-6}$ M en extrémités

		[T8-MDAP ²⁺] = $1,6 \cdot 10^{-6}$			[T8-MDAP ²⁺] = $1,6 \cdot 10^{-5}$				
[NaCl]		100 mM	250 mM	500 mM	100 mM	250 mM	500 mM	700 mM	1000 mM
G8	Neutre	1,02	1,98	2,72	3,20	8,03	10,00	8,58	8,62
	Pipéridine	4,41	5,73	7,26	8,65	15,70	17,05	16,02	14,81
T18	Neutre	3,65	5,86	6,96	6,00	10,50	15,44	16,92	17,32
	Pipéridine	5,93	5,39	6,07	7,98	9,16	8,35	8,02	9,24
G19	Neutre	10,28	8,14	6,45	8,50	10,92	8,87	8,69	8,81
	pipéridine	17,49	13,78	11,20	14,02	16,20	13,48	12,97	11,92

Les coupures observées sur cette base sont donc des coupures spécifiques et tendent à montrer que le T_8 -MDAP²⁺ s'oriente de façon parallèle à la séquence A_8 du 27 mère. L'enrichissement des coupures au niveau des trois guanines de chaque côté de la séquence A_8 peut être attribué à la formation d'une triple hélice. Cette triple hélice se forme même à faible force ionique puisqu'à 100 mM en NaCl (puits 7) on observe déjà 3% de coupure sur la guanine G_8 , et 8,5% sur la G_{19} en milieu neutre. Le traitement en milieu basique fait passer ce pourcentage à 9 % et 14% respectivement. A partir de 250 mM en NaCl les coupures sont de même ordre de grandeur de chaque côté de la séquence A_8 : soit 8% en milieu neutre et 16 % en milieu basique pour la guanine G_8 , 9,3% en milieu neutre et 13,5% en milieu basique pour la guanine G_{19} de chaque côté de la séquence A_8 .

CONCLUSION

L'oligonucléotide T₈-MDAP²⁺ semble toujours former une triple hélice avec le 27^{ème} A₈ et ce, aussi bien à faible qu'à haute concentration en NaCl. L'irradiation des complexes induit :

- Des coupures en milieu neutre du côté 3' du 27^{ème} A₈ dues à l'appariement parallèle du T₈ sur la séquence A₈. Ce dernier est alors apparié par des liaisons de Hoogsteen .

- Des pontages du T₈-MDAP²⁺ sur la cible complémentaire : Deux types de pontages correspondant à l'attachement d'un et de deux T₈-MDAP₂₊ sur le 27^{ème} A₈.

- Des réactions d'oxydation des guanines du côté 5' : Ces réactions ne conduisent pas à des coupures importantes en milieu neutre, mais le traitement en milieu basique met clairement en évidence des coupures au niveau de ces guanines. Les produits d'oxydation du 27^{ème} A₈ peuvent migrer en milieu neutre soit comme le 27^{ème} A₈ intact ou être inclus dans les produits de pontage.

- Les produits de pontage traités en milieu basique donnent des fragments plus courts que le 27^{ème} A₈ intact ou des produits du 27^{ème} A₈ altérés mais migrant de la même façon.

- Dans cette interprétation, les deux molécules de MDAP²⁺ sont certainement dans des environnements différents puisqu'ils sont liés à des T₈ qui n'ont pas le même mode de liaison hydrogène avec la séquence A₈. Bien que la séquence soit identique sur les cinq bases de chaque côté de la séquence A₈, la structure est dissymétrique et doit favoriser une interaction plus forte de la molécule de MDAP²⁺ du côté 3'. La guanine étant meilleur donneur d'électron que la thymine, les réactions de coupure du squelette phosphodiester sont très prononcées au niveau de cette base des deux côtés de la séquence A₈.

- Le T_8 -MDAP²⁺ s'apparie à la séquence A₈ du 27 mère. L'appariement antiparallèle favorisent des réactions de pontage avec la cible, alors que la formation d'une triple hélice induit des coupures directes en milieu neutre.

- L'oligonucléotide T_8 -MDAP²⁺ peut donc s'avérer intéressante comme une nucléase activable lumineusement pour la régulation ou pour l'inhibition de l'expression des certains gènes. Il pourrait être utilisé pour détruire les virus dans les préparations des plasmas sanguins et servir de « **médicament** » anti-tumoral à cause de la capacité du MDAP²⁺ à induire l'**apoptose**.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGRIS C. H., BLAKE K. R., MILLER P. S., REDDY M. R. and TS'O P. O. P. *Biochemistry*, (1986), **25**, 6268-6275

ASSELINE U., THUONG N. T. and HÉLÈNE C. *C. R. Acad. Sci.*, (Paris) (1983), **297**, 369-372

ASSELINE U., TOULMÉ F., THUONG N. T., DELARUE M., MONTENAY-GARESTIER T. and HÉLÈNE C. *EMBO J.*, (1984), **3**, 795-800

ASSELINE U., DELARUE M., LANCELOT G., TOULMÉ F., THUONG N. T., MONTENAY-GARESTIER T. and HÉLÈNE C. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (USA), (1984), **81**, 3297-3301

ASSELINE U., BARBIER C. and THUONG N. T., *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.*, (1986), **26**, 63-73

BERE AUGUSTIN, Thèse de Doctorat d'Etat, Muséum National d'Histoire Naturelle – Université Pierre et Marie Curie (1988), Paris, France

BERE A., MONTENAY-GARESTIER T., HELENE C., and LEHN J.M., *Annales de l'Université de Ouagadougou, Série B*, (1996), **4**, 289-310

BERE A., MONTENAY-GARESTIER T., HELENE C., and LEHN J.M., *Annales de l'Université de Ouagadougou, Série B*, (1996), **4**, 311-335

BLACKER A. J., JAZWINSKI J., LEHN J. M. and WILHEM F. X., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1986), **106**, 1035-1037

BLACKER A. J., Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, (1988), Strasbourg, France

BOIDOT-FORGET M., THUONG N. T., CHASSIGNOL M. and HÉLÈNE C., *C. R. Acad. Sci.*, (Paris), (1986), **302**, 75-80

BOUTOURIN A. S., VLASSOV V. V., KAZAKOV S. A., KUTIIVIN I. V. and PODYMINOYIN M. A., *FEBS L.*, (1984), **172**, 43-46

CHEN B. and SIGMAN D. S., *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (USA), (1986), **83**, 7147-7151

CHU B. C. and ORGEL L. E., *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (USA), (1985), **82**, 963-967

DAMLE V., *Biopolymers*, (1970), **9**, 353-363

DREYER G. B. and Dervan P. B. *Pro. Natl. Acad. Sci.* (USA), (1985), **82**, 968-972

FRANÇOIS J. C., SAISON-BEHMOARAS T., CHASSIGNOL M., THUONG N. T., SUN J. S. and HÉLÈNE C., *Biochemistry*, (1988), **27**, 2272-2276

FRANÇOIS J. C., SAISON-BEHMOARAS T., CHASSIGNOL M., THUONG N. T. and HÉLÈNE C., *J. Biol. Chem.*, (1989), **264**, 5891-5898

GREEN P. J., PINES O. and Inouye M., *Ann. Rev. Biochem.*, (1986), **55**, 569-597

HÉLÈNE C., MONTENAY-GARESTIER T., SAISON-BEHMOARAS T., TANSUKI M., TOULMÉ J. J., ASSELINE U., LANCELOT G., MAURIZOT J. C., TOULMÉ F., and THUONG N. T., *Biochimie*, (1985), **67**, 777-800

HÉLÈNE C., TOULMÉ F., DELARUE M., ASSELINE U., TAKASUGI M., MAURIZOT J. C., MONTENAY-GARESTIER T., and THUONG N. T., *Biomolecular Stereodynamics III. Proceeding of the fourth Conservation in Biomolecular Stereodynamics*. Albany, New York, USA, Adenine Press. (1986), pp., 119-130

HÉLÈNE C., *Photochem. Photobiophys., Supplement*, (1987), **1**, 3-22

HÉLÈNE C., in *DNA-Ligand Interaction*, (1987); (Guschlbauer W. and Scienger W. edits). pp, 127-140; Plenum Publishing Corp., New-York

LE DOAN T., PERROUAULT L., HÉLÈNE C., CHASSIGNOL M. and THUONG N. T., *Biochemistry*, (1986), **25**, 6736-6739

LE DOAN T., PERROUAULT L., PRASEUTH D., HABHOUB N., DECOUD J. L., THUONG N. T., LHOMME J. and HÉLÈNE C., *Nucleic Acids Res.*, (1987), **15**, 7749-7760

LE DOAN T., PERROUAULT L., CHASSIGNOL M., THUONG N. T., and HÉLÈNE C., *Nucleic Acids Res.*, (1987), **15**, 8643-8659

MALINGE J.M.; SIP M.;BLACKER A. J.;LEHN J. M. and LENG M., *Nucleic Acids Res.* (1990), **18 (13)**, 3887-3891

LE DOAN T., CHAVANY C. and HÉLÈNE C., *Bull. Cancer*, (1989), **76**, 849-852

LEMAÎTRE M., BAYARD P. and LEBLEU B. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (USA), (1987), **84**, 648-652

MOSER H. E. and DERVAN P. D., *Science*, (1987), **238**, 645-650

MAXAM A. M. and Gilbert W., *Methods in Enzymology*, (1980), **65**, 497-559

PRASEUTH D., CHASSIGNOL M., TAKASUGI M., LE DOAN T., THUONG N. T., *Biochemistry*, (1986), **25**, 6736-6739

PRASEUTH D., CHASSIGNOL M., TAKASUGI M., LE DOAN T., THUONG N. T and HÉLÈNE C., *J. Mol. Biol.*, (1987), **196**, 936-942

RILEY M., MALING B. and CHAMBERLIN M.J., *J. Mol. Biol.*, (1966), **20**, 359-389

ROKNIC S., GLAVAS-OBROVAC L., KARNER I., PIANTANIDA I., ZINIC M. and PAVRLIC K., *Chemotherapy*, (2000), **46 (2)**, 143-149

SLAMA-SCHWOK A., JAZWINSKI J., BÉRÉ A., MONTENAY-GARESTIER T., ROUGÉE M., HÉLÈNE C. and LEHN J.M., *Biochemistry*, (1989), **28**, 3227-3234

SLAMA-SCHWOK A., ROUGÉE M., IBANEZ V., GEACINTOV N. E., MONTENAY-GARESTIER T., LEHN J. M. and HÉLÈNE C., *Biochemistry*, (1989), **28**, 3234-3242

SMITH C. C., AURELIAN L., REDDY M. P., MILLER P. S. and Ts'o P. O. P. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (UAS), (1986), **83**, 2787-2791

STEIN C. A. and COHEN J. S., *Cancer Research*, (1988), **48**, 2659-2668

SUN J. S., Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, (1987), Paris, France

SUN J. S., FRANÇOIS J. C., LAVEY R., SAISON-BEHMOARAS T., MONTENAY-GARESTIER T., THUONG N. T., and HELENE C., *Biochemistry*, (1988), **27**, 6039-6045

TOULMÉ J. J. and HÉLÈNE C., *Gene (Amst.)*, (1988), **72**, 51-58

ZAMECNIK P. C. and STEPHENSON M. L. *Pro. Natl. Acad. Sci.* ,(USA), (1978), **75**, 280-284

ZAMECNIK P. C., GOADCHILD T., TAGUCHI Y. and SARIN P. S., *Pro. Natl. Acad. Sci.*, (USA), (1986), **83**, 4143-4146

ZERIAL A., THONG N. T. and HÉLÈNE C.,. *Nucleic Acids Res.*, (1987), **15**, 9909-9919