

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
U.F.R. DE PHARMACIE**

Année 2004

N°

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE**

**MENTION PHARMACIE**

*Spécialité : Biomolécules et Dynamique Cellulaire*

Par

**Richard WARGNIER**

Né le 07 Octobre 1976

**DOSAGE DE L'ADN TOPOISOMERASE I DANS LES LIGNEES CELLULAIRES  
ISSUES DE TUMEURS SOLIDES  
ET APPROCHE NANOTECHNOLOGIQUE  
DU DOSAGE SIMULTANE DE LA PROTEINE ET DE SON GENE**

Soutenu publiquement le 15 Décembre 2004

Composition du jury :

**Dr. FLEURY Fabrice**, Université de Nantes (France)  
**Pr. NABIEV Igor**, Université de Reims (France)  
**Pr. PLENAT François**, Université de Nancy (France)  
**Pr. PLUOT Michel**, Université de Reims (France)  
**Pr. VOLKOV Yuri**, Trinity College de Dublin (Irlande)

Examineur  
Directeur de Thèse  
Rapporteur  
Président  
Rapporteur

*A Monsieur le Professeur Igor NABIEV*

*Vous avez guidé et dirigé ce travail. Vous m'avez accordé votre confiance et votre soutien, en toute circonstance. C'est avec force sincérité que je vous remercie pour votre patience à mon égard et votre vision éclairée des choses. Recevez le témoignage de ma plus profonde gratitude.*

*A Monsieur le Professeur Michel PLUOT*

*Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de juger ce travail. Votre soutien à mon égard ne s'est jamais démenti. Permettez-moi de vous exprimer mon plus profond respect.*

*A Monsieur le Professeur François PLENAT,*

*Je vous remercie de l'honneur que vous me faites de siéger à ce jury et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.*

*Acceptez l'expression de mes sincères remerciements et de ma reconnaissance.*

*A Monsieur le Professeur Yuri VOLKOV,*

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse et d'être membre de ce jury. Soyez assuré de mes sincères remerciements.*

*A Monsieur le Docteur Fabrice FLEURY*

*Vous avez accepté d'examiner ce manuscrit et d'être membre de ce jury.*

*Veillez être assuré de mes remerciements les plus sincères à votre égard.*

*A Monsieur le Professeur Jean-Claude JARDILLIER*

*Je vous exprime ma respectueuse reconnaissance et vous adresse mes vifs remerciements pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de votre laboratoire.*

*Mes remerciements iront à mes collègues de travail proches et à mon entourage de travail immédiat...*

*A Madame le Docteur Alyona SUKHANOVA qui s'est toujours tenue disponible pour dispenser ses conseils.*

*A Monsieur le Docteur Vitali STSIAPURA pour sa présence, son envie d'aider en toute simplicité et sa gentillesse.*

*Je voudrais remercier tout particulièrement une personne :*

*Mademoiselle Lydie VENTEO dont la disponibilité et l'aide n'ont jamais fait défaut.*

*J'offre un clin d'œil à toutes les personnes de la faculté de Pharmacie de Reims (vous êtes vraiment trop nombreuses) qui m'ont donné un sourire, une aide, quelle qu'elle soit, de la gentillesse...*

*Je tiens également à remercier chaleureusement les personnes qui m'ont aidé à relire ce travail (Je pense entre autres à Chantal et Christine). Je ne vous cite pas non plus, vous vous reconnaîtrez aisément...*

*Merci à Madame Agnès Fallier pour son aide à la correction de la bibliographie.*

*Mes sincères remerciements vont également à l'Association Régionale de Champagne Ardenne pour l'Enseignement et la Recherche Supérieure (ARERS) qui a soutenu financièrement ce travail.*

*Je serai moins protocolaire pour remercier mes ami(e)s...  
(Il va y avoir une redondance mais tant pis...)*

*A Lydie Venteo, pour sa gentillesse sans fin, sa patience et sa compréhension à mon égard. Merci infiniment de ton aide donnée avec tant de générosité, de ton écoute. Merci de ton amitié...*

*A Jérôme « Jéjé » Devy, pour son soutien permanent, sa patience extrême et sa bonne humeur. Merci d'être toujours aussi présent, de m'avoir tant appris à mon arrivée en thèse et honneur à toi d'avoir supporté pendant si longtemps mon caractère sans jamais m'avoir fait défaut de ton amitié...*

*A Mikhaïl « Misha » Ermishov, pour son humour venu d'ailleurs et ses bonnes paroles dans les moments difficiles qui, même si je ne les entends plus, sont gravées en moi. Merci à toi, merci de ton amitié...*

*A Ludovic « Ludo » Granzamy, pour sa vision des choses et son caractère festif. Merci de me comprendre aussi bien, ton amitié m'est précieuse...*

*Je remercie de tout cœur mes amis de toujours :*

*Brice « Brice » Janray, Laurent « Lolo » Laguerre et sa femme, Marie-Joëlle « MJ » Blanchard, Matthias « Mick » Jadot et Arnaud « Nono » Sylvestre. Une bande de copains, un clan d'Ardennais, une amitié de plus de 10 ans... Il n'y a rien à dire. Les années passées ensemble parlent d'elles-mêmes... Merci à vous mes Vieilles Branches d'être à mes côtés...*

*Je m'aperçois qu'il m'est impossible de remercier toutes celles et ceux qui m'ont tant donné et me donnent encore à foison... Je ne vous cite pas... mais je suis loin de pouvoir vous oublier...*

*Enfin, je n'aurais jamais pu mener ce travail sans l'entourage de ma famille...*

*A mes sœurs, Béatrice et Florence.*

*Nous avons perdu beaucoup trop de temps. Vous savoir « ici » est un cadeau dont je mesure aujourd'hui la grandeur. Trouvez en ces mots mes si jolies Sœurs tout mon amour fraternel...*

*A mes beaux-frères, Hervé et Abdelkader.*

*J'apprends à vous connaître à chaque fois que nous sommes ensemble... Et je ne suis ma foi pas déçu. Bien au contraire... Merci de votre gentillesse et de votre présence mes deux « Beaufs »...*

*A mes nièces et neveux, Clara, Clément, Victor, Martin, Marwan, Chéïma, Séphora et Anissa (par ordre d'apparition).*

*Je ne suis pas aussi présent que j'aimerais l'être mais je suis un oncle comblé... Vous m'apportez beaucoup de joie et de bien-être... Je vous aime très fort...*

*A mes parents, Marie-Reine et Robert.*

*Il n'est pas facile de trouver les mots pour vous témoigner ma reconnaissance pour tout ce que vous me donnez. Votre amour est irremplaçable et le mien à votre égard est et demeurera à jamais...*

*À toutes celles et ceux qui me donnent des raisons d'être ce que je suis...*

Les opinions exprimées dans cette thèse n'engagent que son auteur  
et en aucun cas la Faculté de Pharmacie de Reims.

## Résumé

L'ADN topoisomérase I humaine (topoI) est une enzyme jouant un rôle essentiel au cours des mécanismes de changement de topologie et de conformation de l'ADN, tels la réplication et la transcription. De par sa capacité à éliminer les super-tours de l'ADN et ainsi d'éviter l'apparition de cassures dans la double-hélice d'ADN, topoI s'est avérée être une cible de choix en cancérologie. Les agents anti-cancéreux de cette enzyme agissent suivant deux mécanismes : soit par stabilisation du complexe topoI – ADN par empoisonnement, soit par suppression des sites de reconnaissance de topoI au niveau de l'ADN. Les chercheurs en cancérologie s'évertuent à optimiser les traitements existants, mais aussi à déceler et mettre au point de nouvelles thérapeutiques par le biais de nouveaux agents anti-cancéreux.

Notre travail a consisté, dans une première partie, à étudier *in vitro* les effets du topotécan, poison dérivé de la camptothécine et d'ores et déjà utilisé en clinique, sur la « downregulation » de topoI pour les lignées cellulaires issues de tumeurs solides suivantes : A549, CaOV-3, HT29 et MCF7. Les résultats ont montré une variation quand aux réponses induites par le topotécan, en termes d'altération, de quantité et de stabilité de topoI. De manière plus générale, le topotécan a montré une efficacité différente suivant la nature du cancer et la dose de médicament employée.

Dans une deuxième partie, une étude complémentaire, par la technique de résonance plasmonique de surface, a permis d'étudier les vitesses d'association et de dissociation de topoI pour son substrat, en absence ou présence de topotécan, mais aussi d'étudier l'impact de la séquence d'ADN sur l'efficacité de stabilisation du complexe clivable ou de suppression de reconnaissance de cette séquence par topoI. Il a ainsi été possible de faire une distinction entre les agents poisons et supprimeurs et d'appréhender leur potentiel d'inhibition de l'activité de topoI suivant les doses employées.

La troisième partie de ces travaux a porté sur l'identification des perspectives d'application des approches nanotechnologiques en cancérologie. Aujourd'hui, les nanotechnologies ne cessent de croître en intérêt et de montrer l'apport qu'elles représentent dans bien des domaines scientifiques. En cancérologie, l'élaboration de nano-outils ouvre des perspectives quand à l'amélioration des diagnostics et des thérapeutiques. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à mettre au point de nouveaux systèmes de marquage à l'aide de nanocristaux semi-conducteurs, les quantum dots (Qds), dont les propriétés de fluorescence dépassent largement celles des fluorophores organiques traditionnels.

Nous avons ainsi réussi, dans un premier temps, à optimiser les Qds dans le but de les rendre compatibles à une utilisation en analyse biologique. Puis, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir un phénomène de FRET entre 2 Qds et/ou 1 Qd et une particule Nanogold®, rendant pleinement envisageable l'élaboration de « phares » moléculaires, pour un maximum de brillance.

Nos essais de conjugaison des Qds à des oligonucléotides ont également renforcé les perspectives de réalisation d'hybridation *in situ* et de « phares » moléculaires.

L'ensemble de ces résultats offre de réelles perspectives, non seulement d'amélioration et d'optimisation des traitements du cancer, mais ouvre également la voie vers de séduisantes solutions pour une détection plus précoce et plus sensible des cancers.

**Mots-clés :** ADN topoisomérase I humaine, inhibiteurs anti-cancéreux, nanotechnologies, Quantum dots.

## Abstract

Human DNA topoisomerase I (topoI) is the enzyme playing an essential role in the mechanisms of modifications of DNA topology such as transcription and replication. Due to its capacity to eliminate the DNA super-coils and to repair single-strain breaks in double-stranded DNA, topoI became one of the major targets in cancerology. Antitumor drugs targeting this enzyme demonstrate one of the two mechanisms of action: stabilisation of topoI-DNA complex (topoI “poisons”) or blocking of topoI-DNA recognition in specific sites (topoI “suppressors”). One of the aims of research in cancerology is to optimize existing treatments and find new therapeutical approaches employing new antitumor drugs.

The first part of this work researches *in vitro* effects of topotecan, clinical derivative of the camptothecine, on the downregulation of topoI in four cellular lines issued from the solid tumors (A549, CaOV-3, HT29 and MCF7). The results have shown a variation of responses induced by topotecan in terms of alteration of quantity and stability of topoI and may explain different efficacy of the medication in the treatment of cancers of different origins.

In the second part of the work, a complementary study by the technique of surface plasmon resonance has allowed to analyze the rates of association of topoI with and dissociation from the DNA in the absence or presence of topotecan. The impact of the DNA sequence in the specific sited on the efficiency of top1-DNA clivable complex stabilisation by topoI poisons or suppression of topoI-DNA recognition by the suppressors have been also analyzed. These results demonstrated that the surface plasmon resonance technique enables to distinguish poisons and suppressors in terms of their mechanism of anti-topoI action and to evaluate their relative anti-topoI potencies in a real time.

The third part of the work has focused on the identification of possible nanotechnological approaches to simultaneous detection of the protein and its gene in cancerology. Today, nanotechnologies grow in interest and show a major contribution in many scientific areas. In cancerology, the design of nano-devices opens new possibilities for the improvement of diagnostics and therapeutics. That’s why we have aimed to elaborate new label systems with utilization of semiconductors nanocrystals, “quantum dots” (Qds), possessing unique optical and physico-chemical advantages in comparison with organic dyes. We have firstly optimized the biocompatibility of Qds and demonstrated the possibility to obtain a FRET effect between two Qds or Qd and Nanogold® particle. This result is auspicious for elaboration of molecular beacons with a maximal brightness. Secondly, the conjugates of Qds with oligonucleotides have been obtained and the protocols of their characterisation and purification have been developed opening the possibilities of realization of *in situ* hybridization and development of molecular beacons. All these results not only open the perspectives of advancements in more sensible and precocious diagnostics of cancer but also open attractive solutions for development of new techniques of analysis of the mechanisms of cancer appearance and propagation.

**Keywords:** Human DNA topoisomerase I, Antitumor drugs, nanotechnologies, Quantum dots.

# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>IX</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>7</b>
<b>I.1. Les ADN topoisomérases</b>	<b>8</b>
I.1.1. L'ADN topoisomérase I humaine	12
I.1.1.1. Structure et domaines d'organisation	12
I.1.1.2. Mécanisme enzymatique	13
I.1.1.3. Sélectivité de séquence	17
I.1.1.4. Gène et régulation	17
I.1.1.5. Fonctions biologiques	18
I.1.2. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I humaine	19
I.1.2.1. Les camptothécines	21
I.1.2.1.1. Structure et mécanisme d'action	21
I.1.2.1.2. Résistance aux camptothécines	23
I.1.2.2. Les homocamptothécines	26
I.1.2.3. Les benzo[c]phénanthridines	27
<b>I.2. Les Nanobiotechnologies</b>	<b>29</b>
I.2.1. Définition	29
I.2.2. Les nanocristaux fluorescents CdSe/ZnS	31
I.2.3. Applications	34

I.2.3.1. Premières applications en Biologie	35
I.2.3.2. Quantum dots et reconnaissance moléculaire	36
I.2.3.3. Quantum dots et marquage <i>in vivo</i>	37
I.2.3.4. La phagocinétique	37
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b>	<b>39</b>
<b>II.1. Dosage de l'ADN topoisomérase I humaine dans quatre lignées cellulaires après traitement par le topotécan</b>	<b>40</b>
II.1.1. Cultures cellulaires	40
II.1.1.1. Les lignées cellulaires	40
II.1.1.2. Conditions de culture	40
II.1.2. Etude de cytotoxicité	41
II.1.3. Traitement des cellules par le topotécan	42
II.1.4. Préparation des extraits nucléaires	42
II.1.5. Western-blot et analyse semi-quantitative	43
II.1.6. Test d'activité par relaxation de plasmides	44
<b>II.2. Détermination des constantes d'affinité de l'ADN topoisomérase I par résonance plasmonique de surface</b>	<b>45</b>
II.2.1. La technologie BIAcore®	45
II.2.2. Manipulation	47
II.2.2.1. Les médicaments et l'ADN topoisomérase I	47
II.2.2.2. Fixation des oligonucléotides sur la puce « sensor chip »	48
II.2.3. Mesures : génération des sensorgrammes	49
II.2.3.1. Complexe binaire	49
II.2.3.2. Complexe ternaire	49
II.2.4. Interprétation des résultats	50

<b>II.3. Nanobiotechnologies</b>	<b>50</b>
II.3.1. Synthèse des nanocristaux fluorescents semi-conducteurs	50
II.3.1.1. Synthèse des quantum dots CdSe/ZnS	50
II.3.1.2. Synthèse des quantum dots ZnCdSe/ZnS	51
II.3.2. Techniques de solubilisation	51
II.3.2.1. Apport de charges négatives	53
II.3.2.1.1. Solubilisation par les acides	53
II.3.2.1.2. Solubilisation par la D,L-cystéine	54
II.3.2.1.3. Solubilisation par les polymères	54
II.3.2.2. Apport de charges positives	55
II.3.3. Prise des spectres d'absorption et de fluorescence	55
II.3.3.1. Principe de la spectroscopie UV/vis	55
II.3.3.2. Principe de la fluorimétrie	56
II.3.4. Le FRET	57
II.3.4.1. Définition	57
II.3.4.2. Préparation des quantum dots et des Nanogold®	58
II.3.4.3. Mesures et analyse des spectres	59
II.3.4.3.1. Mesures quantum dot/quantum dot	59
II.3.4.3.2. Mesures quantum dot/Nanogold®	59
II.3.5. Conjugaison des nanocristaux à l'ADN	60
II.3.5.1. Modification des oligonucléotides par ajout d'un groupe SH	60
II.3.5.2. Conjugaison des quantum dots	61

<b>III. RESULTATS – DISCUSSION</b>	<b>62</b>
<b>III.1. Etude de l'altération de la quantité et de la stabilité de l'ADN topoisomérase I humaine induite par le topotécan sur différentes lignées cellulaires issues de tumeurs solides</b>	<b>92</b>
<b>III.2. Stabilité comparative du complexe entre l'ADN topoisomérase I et l'ADN en présence de camptothécines et de benzo[c]phénanthridines</b>	<b>97</b>
III.2.1. Etude du complexe binaire	98
III.2.2. Etude de la stabilisation du complexe dit « clivable » par les camptothécines	100
III.2.3. Etude de l'effet des benzo[c]phénanthridines sur les vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I	103
<b>III.3. Transfert d'énergie au sein d'assemblages nanoscopiques en solution aqueuse quantum dot/quantum dot et quantum dot/particule Nanogold®</b>	<b>113</b>
III.3.1. Assemblages de quantum dots de charge opposée	113
III.3.2. Assemblages de quantum dots et de Nanogold® de charge opposée	115
III.3.3. Conclusion générale	115
<b>III.4. Perspective de l'utilisation des quantum dots</b>	<b>116</b>
<b>IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>118</b>
<b>V. ANNEXES</b>	<b>122</b>
<b>VI. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>128</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

A549	Lignée cellulaire issue d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules
ABC	ATP-binding cassette
ACs	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Protéine de contrôle de la phase S
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
BCRP	Breast cancer resistance protein
BET	Bromure d'éthidium
BIA	Biomolecular interaction analysis
CaOV-3	Lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome ovarien
CAPS	Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonique
CdSe/ZnS	Cadmium Selenium/Zinc Soufre
Chk1	Protéine de contrôle de la phase S
CPT	Camptothécine
DMSA	Acide meso-2,3-dimercapto-succinique
DMPS	Acide 2,3-dimercapto-1-propane-sulfonique
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DO	Densité optique
DTT	Dithiothréitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-ethyl-3(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique

ETX	Ethoxidine
FDA	Food and Drug Administration
FGR	Fagaronine
FISH	Fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluoroisothiocyanate
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
hCPT	Homocamptothécine
HeLa	Lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome cervical épithélial
HL60	Lignée cellulaire promyélocytique
HT29	Lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colorectal
IgG	Immunoglobuline G
K562	Lignée cellulaire érythroleucémique
L1210	Lignée cellulaire leucémique murine
MCF7	Lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome mammaire
MDR1	Gène de la Multidrug resistance 1
MSH2	Protéine de réparation de l'ADN
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide ; thiazolyl blue
NCs	Nanocristaux
NF-kB	Necrosis factor kB
NHS	N-hydroxysuccinamide
NTS	Signaux de translocation nucléaire
P388	Lignée cellulaire leucémique murine
PEG	Polyéthylène glycol
PMSF	Phényl-méthyl-sulfonyl-fluoride
Pnk1	Polynucléotide kinase
Qds	Quantum dots
RU	Unité de Résonance
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCLC	Small cell lung cancer

SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sp1	Facteur de transcription
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TAE	Tris Acetate EDTA
TBE	Tris Borate EDTA
topoI	ADN topoisomérase I humaine
TOPO	Trioctylphosphine oxide
TPT	Topotécan
UV	Ultraviolet
UV/vis	Spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Classification des ADN topoisomérases chez les Procaryotes et les Eucaryotes.	11
<b>Tableau 2.</b> Vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I de l'ADN en absence ou en présence de poison.	102
<b>Tableau 3.</b> Vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I en présence de fagaronine ou d'ethoxidine.	103

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Domaines d'organisation de l'ADN topoisomérase I humaine.	12
<b>Figure 2.</b> Structure de l'ADN topoisomérase I humaine reconstituée, sans le domaine de liaison et le domaine terminal NH <sub>2</sub> .	13
<b>Figure 3.</b> Schéma du mécanisme d'action de l'ADN topoisomérase I.	14
<b>Figure 4.</b> Clivage de l'ADN par l'ADN topoisomérase I et formation du complexe de clivage par réaction de transestérification.	15
<b>Figure 5.</b> Mécanisme de rotation contrôlée de l'ADN topoisomérase I.	16
<b>Figure 6.</b> Mécanisme d'action d'un poison de l'ADN topoisomérase I.	20
<b>Figure 7.</b> Mécanisme d'action d'un suppresseur de l'ADN topoisomérase I.	20
<b>Figure 8.</b> Structure de quelques camptothécines.	22
<b>Figure 9.</b> Interconversion réversible et dépendante du pH de la camptothécine par la carboxylestérase.	22
<b>Figure 10.</b> Structure de l'homocamptothécine et de deux dérivés utilisés en essais cliniques.	26
<b>Figure 11.</b> Structures de la nitidine, la fagaronine et son dérivé synthétique, l'ethoxidine.	27
<b>Figure 12.</b> Nanocristaux issus de différents matériaux.	30
<b>Figure 13.</b> La « bandgap ».	32
<b>Figure 14.</b> Nanocristaux CdSe/ZnS.	33
<b>Figure 15.</b> Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la fluorescéine et d'un nanocristal type.	34
<b>Figure 16.</b> Principe de la résonance plasmonique de surface.	46
<b>Figure 17.</b> La technologie BIAcore®.	47
<b>Figure 18.</b> Séquence des oligonucléotides utilisés.	48
<b>Figure 19.</b> Solubilisation des quantum dots.	52
<b>Figure 20.</b> Principe de la solubilisation par les polymères.	53
<b>Figure 21.</b> Diagramme des niveaux énergétiques.	56

<b>Figure 22.</b> Recouvrement des spectres d'émission et d'absorption.	58
<b>Figure 23.</b> Sensorgrammes de complexes binaires.	99
<b>Figure 24.</b> Sensorgrammes du complexe ternaire ADN-topoI-inhibiteur.	100
<b>Figure 25.</b> Electrophorèse du conjugué poly d(C)-Qds.	116
<b>Figure 26.</b> Principe des « phares » moléculaires.	117

# Introduction

## Introduction

Le cancer, du grec « karkinos », nom donné par Hippocrate (460-377 av JC), Père de la médecine grecque, existe depuis la nuit des temps. De nombreux documents tirés du passé en attestent sans équivoque. Il peut être défini comme une multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme, qui échappent aux mécanismes de différenciation et de régulation de leur multiplication. La caractéristique majeure d'une cellule tumorale est de proliférer sans les contraintes fixées par l'homéostasie qui imposent normalement l'arrêt de la prolifération. Les cellules tumorales ne répondent plus à ces règles et continuent de se diviser.

Trois étapes peuvent être distinguées dans le schéma général de genèse d'un cancer dont les deux premières sont connues uniquement par les modèles expérimentaux [Tarin et coll., 1984] et l'étude de l'épidémiologie des tumeurs humaines [Tilly et coll., 1997] :

**L'initiation** : lésion rapide et irréversible de l'ADN après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral,...).

**La promotion** : exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entraîne et stabilise la lésion initiée. La cellule modifiée et ses cellules filles gardent un aspect normal, mais se reproduisent trop vite : c'est la **phase d'hyperplasie**. Quelques années plus tard, une de ces cellules subit une nouvelle mutation qui endommage d'avantage le système de régulation de la croissance.

**La progression** : acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, acquisition de l'indépendance, de la perte de la différenciation, de l'invasion locale et métastatique. La descendance de cette cellule prolifère anormalement, les cellules filles ont une taille et une orientation anormales : c'est la **phase de dysplasie**. Après quelques temps, une nouvelle mutation perturbe le comportement cellulaire. Les cellules filles ont un aspect de plus en plus anormal. Tant que la tumeur n'a pas encore franchi les limites du tissu d'origine, c'est un cancer *in situ* et elle peut rester confinée indéfiniment, mais une des cellules peut acquérir des mutations supplémentaires. Quand ces mutations permettent aux cellules tumorales d'envahir les tissus sous-jacents

et d'atteindre le sang, la tumeur devient **maligne**. De nouvelles tumeurs, ou **métastases**, apparaissent dans tout l'organisme.

Du point de vue biologique, le cancer est donc la conséquence d'une accumulation d'altérations du génome cellulaire, ou de sa transcription cytoplasmique, certaines permettant l'autonomie de la division, d'autres l'invasion locale, l'angiogénèse ou la diffusion métastatique, puis éventuellement la résistance aux drogues. Au fur et à mesure du développement du cancer, les cellules tumorales acquièrent une instabilité génétique de plus en plus marquée, aboutissant à des mutations de plus en plus nombreuses.

Le traitement des cancers est multidisciplinaire : chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie.

Au cours des 20 dernières années, des progrès substantiels ont été réalisés dans la guérison des cancers humains, grâce à l'amélioration des moyens thérapeutiques utilisés et à une meilleure prise en charge des complications aiguës (antibiothérapie, transfusions, facteurs de croissance hématopoïétique, traitements antalgiques).

Les différents traitements sont le plus souvent associés et réalisés de manière successive dans le temps.

**La chirurgie** : elle a longtemps représenté le traitement standard des cancers, et conserve une place de choix. Même si elle n'est plus la seule thérapeutique dont disposent les praticiens, la chirurgie des cancers reste, de manière générale, le premier point d'entrée dans le processus de traitement de la maladie. Son but a d'abord été d'enlever l'organe touché en totalité ainsi qu'une partie des tissus sains voisins pour déterminer une marge de sécurité et réduire le risque de récurrence : c'est la chirurgie spécifique des cancers ou d'exérèse à visée curative [Pinet et coll., 1990].

**La radiothérapie** : depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, le traitement par des rayonnements ionisants a renforcé l'arsenal anticancéreux jusque là réduit à la seule chirurgie. La radiothérapie s'est peu à peu développée, à partir d'études chez l'animal [Suit, 1967] et des observations faites chez l'Homme [Sagan, 1971]. Elle est une spécialité

récente où l'on distingue radiothérapie externe utilisant une source d'irradiation située à l'extérieur du malade (appareils à rayons X, source de cobalt, accélérateurs) et la curiethérapie utilisant des sources radioactives placées à l'intérieur de l'organisme.

**L'hormonothérapie** : Elle a pour but de réduire la croissance tumorale en luttant contre l'environnement hormonal et en mettant ainsi les cellules dans un état quiescent, non proliférant. Le caractère hormono-dépendant d'un certain nombre de cancers a été démontré depuis longtemps. Sont inclus parmi les cancers hormono-dépendants, le sein [Rouesse, 1994], la prostate [Cellini, 1998], le col de l'utérus, la thyroïde et quelques réponses fugaces au niveau de l'ovaire et du rein.

**L'immunothérapie** : l'élucidation progressive des mécanismes de fonctionnement du système immunitaire au cours des années 1970 et 1980 a peu à peu fait apparaître l'immunothérapie comme une solution complémentaire des traitements traditionnels, ces derniers provoquant de pénibles effets secondaires. Son but est de stimuler le système immunitaire pour qu'il soit à même de reconnaître les antigènes spécifiques retrouvés à la surface des cellules tumorales [Hayes, 2001].

**La chimiothérapie** : La chimiothérapie constitue une arme thérapeutique supplémentaire à disposition pour lutter contre le cancer et fait appel à des produits chimiques, des médicaments extraits de végétaux ou produits de synthèse [Madelaine et coll., 1993]. Dès le début de son évolution, un cancer peut donner des métastases à distance. Ainsi, il échappe aux traitements locaux (chirurgie, radiothérapie). Les traitements médicaux des cancers, et notamment la chimiothérapie anticancéreuse, ont pour but principal d'enrayer une telle évolution. Les différents médicaments utilisés aujourd'hui sont classés selon leur mode d'action thérapeutique et leurs cibles cellulaires. Les 3 principales cibles sont l'ADN (perturbation de la duplication, de la transcription ; destruction de l'ADN), les enzymes (inhibition des voies métaboliques de synthèse des bases puriques et pyrimidiques ; inhibition des ADN topoisomérases I et II) et les microtubules (perturbation de la division cellulaire).

## *Introduction*

Au vu des moyens d'ores et déjà à disposition pour tenter de soigner les patients atteints du cancer, il ne faut pas oublier que le diagnostic d'un cancer conditionne l'attitude thérapeutique. En effet, ce diagnostic doit être précis et le plus précoce possible afin de majorer les chances de succès thérapeutiques.

De nouvelles technologies en plein essor à ce jour, comme les nanobiotechnologies, offrent des perspectives prometteuses dans le dépistage des cancers. Des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents aux caractéristiques fluorescentes exceptionnelles sont à même d'améliorer la détection par une meilleure sensibilité et une plus grande stabilité de marquage. Améliorer la sensibilité revient à détecter plus tôt l'apparition du processus précancéreux ou de transformation maligne et d'ainsi procéder à un geste thérapeutique moins radical, moins lourd pour le patient.

Les travaux présentés dans le cadre de notre travail s'articulent sur deux grands points :

- ✘ l'ADN topoisomérase I humaine.
- ✘ les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents, ou « Quantum dots » (Qds).

Les rappels bibliographiques sur l'ADN topoisomérase I humaine et ses inhibiteurs (notamment les camptothécines et les benzo[c]phénanthridines), ainsi que sur les nanobiotechnologies et les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents « Quantum Dots » seront développés dans un premier temps.

Par son rôle joué dans les problèmes topologiques de l'ADN survenant au cours de processus comme la réplication ou encore la transcription, l'ADN topoisomérase I représente une cible de choix en cancérologie. Ses inhibiteurs se différencient en deux classes : les **poisons** qui bloquent l'action de religation du brin coupé d'ADN par l'enzyme et les **suppresseurs** qui bloquent l'accès au site de reconnaissance de l'enzyme [Pommier, 1998].

## Introduction

Nous exposerons dans un deuxième temps, les résultats de différentes études sur l'ADN topoisomérase I et ses inhibiteurs. Nous verrons l'effet du topotécan, dérivé soluble de la camptothécine, sur la quantité et la stabilité de l'ADN topoisomérase I au sein de 4 lignées cellulaires issues de tumeurs solides. Dans une étude suivante, nous aborderons les différences dans les vitesses d'association et de dissociation de l'enzyme pour son site de reconnaissance en présence ou en absence d'inhibiteurs comme la camptothécine, le topotécan et des benzo[c]phénanthridines comme la fagaronine et l'éthoxidine.

Enfin, nous aborderons une des possibles utilisations des quantum dots. Dans le but de pouvoir mettre aux points des « **phares** » **moléculaires**, nous verrons que nous pouvons obtenir un transfert d'énergie par le phénomène de « Fluorescence Resonance Energy Transfer » (FRET) entre 2 quantum dots de charge opposée et de longueur d'onde d'émission de fluorescence différente, mais également entre un quantum dot et une particule Nanogold® de charge opposée. La possibilité de réaliser des sondes oligonucléotide-Qd sera également discutée, afin de réaliser des marquages en hybridation *in situ*. Ces résultats constituent des perspectives encourageantes des nanobiotechnologies en cancérologie.

**I. Rappels**

**Bibliographiques**

### **I.1. Les ADN topoisomérases**

Les Années 1950 apparaissent comme un âge d'or pour la science, en particulier en raison de la découverte de la structure en double-hélice de l'ADN et de son matériel génétique supportant les informations de l'hérédité.

Initialement, le matériel génétique était imaginé comme étant linéaire. Cependant, dans les années 1960, il fut montré que des molécules circulaires d'acide nucléique double-brin existaient dans la Nature. Cette découverte conduisit rapidement à la conclusion que, aussi séduisante soit-elle, la structure de l'ADN posait des problèmes de topologie non encore pressentis jusque-là. Comment, par exemple, la réplication de l'ADN, entre autres processus, est-elle possible malgré l'important surenroulement de la double hélice au cours de l'avancement de la fourche de réplication ?

Une solution à ce problème topologique des acides nucléiques fut émise en 1971 par le Dr. James Wang qui purifia une enzyme d'*Escherichia coli*, nommée protéine  $\omega$ , capable de relaxer les supertours négatifs de la double hélice d'ADN [Wang, 1971]. Ces travaux furent suivis par la découverte d'une activité dans des extraits cellulaires de souris qui relaxent les supertours positifs et négatifs de l'ADN [Champoux et coll., 1972] et d'une activité dépendante de l'ATP, chez *E. coli*, capable d'introduire des supertours négatifs dans un ADN relaxé [Gellert et coll., 1976]. Ces trois enzymes, collectivement appelées ADN topoisomérases, sont aujourd'hui connues sous les dénominations respectives d'ADN topoisomérase I de *E. coli*, ADN topoisomérase I de souris et ADN topoisomérase II (ou gyrase) de *E. coli*. Elles représentent les trois familles distinctes d'ADN topoisomérases.

Les ADN topoisomérases sont des enzymes qui altèrent l'état topologique des acides nucléiques (comme le sur- et le sous- enroulement, ou l'enchevêtrement) en générant des cassures transitoires dans la chaîne sucre-phosphate de l'ADN. Pour maintenir l'intégrité du matériel génétique durant ces cassures, les ADN topoisomérases forment des liaisons covalentes avec l'ADN, n'altérant ainsi que l'orientation spatiale de la double hélice.

Il existe trois grands types d'ADN topoisomérases, dépendant de leur structure et des mécanismes qu'elles emploient pour agir sur la topologie de l'ADN : le type I sous-divisé en type IA et type IB et le type II [Wang, 1996 ; Roca, 1995].

- Les ADN topoisomérases de type II agissent par clivage des deux brins d'ADN. Dans cette réaction en association avec la liaison et l'hydrolyse d'ATP, ces protéines clivent un duplex d'ADN, transportent le second duplex à travers la cassure, puis relient le duplex clivé [Berger, 1998]. Chez les Eucaryotes, les deux parties de l'enzyme sont formées par deux chaînes polypeptidiques identiques dont le poids moléculaire est compris entre 160 et 180 kDa. Chez la bactérie ou le phage, chaque partie de la topoisomérase est formée par au moins deux chaînes polypeptidiques. Ces protéines sont essentielles et hautement conservées dans tous les organismes vivants.

- Les ADN topoisomérases de type I sont définies par leur intermédiaire catalytique et le complexe de clivage. Ce dernier consiste en une coupure simple-brin de l'ADN réalisée par ces enzymes. Elles se lient de façon covalente à l'une des extrémités de l'ADN coupé par une réaction de transestérification avec la tyrosine 723 de leur site catalytique [Pommier, 1998]. De plus, ces enzymes, en majorité monomériques, ne nécessitent pas l'utilisation d'ATP. La direction de chaque réaction est alors déterminée par les énergies libres des segments d'ADN impliqués [Wang, 1982<sup>A</sup>].

Deux sous-familles d'enzymes de type I ont été caractérisées, différant par le type de complexe intermédiaire qu'elles engendrent [Berger, 1998] :

#### ✕ Type IA

L'enzyme de 97 kDa [Berger, 1998] clive et ouvre des entrées transitoires dans les segments simple brin d'ADN, pour permettre le passage d'un autre segment d'ADN, simple ou double brin. Dans cette étape de clivage, un intermédiaire ADN – enzyme est formé entre un résidu tyrosine et l'extrémité 5' phosphate de l'ADN générée par la coupure.

Les représentants de cette famille sont, entre autres, les ADN topoisomérases I et III d'*E. coli* [Champoux et coll., 1972 ; Dean et coll., 1983 ; Srivenugopal et coll., 1984]

---

A : cité in:

Nucleases.  
ROBERTS R, LINN S (eds.).  
New York : Cold Spring Harbor Laboratory Presse ; 1982, 41-57.

et la gyrase reverse de l'archaebactérie thermophile *Sulfolobus acidocaldarius* [Kikuchi et coll., 1984].

✘ Type IB

Il comprend l'ADN topoisomérase I Eucaryote (chez la levure [Durnford et coll., 1978], le thymus de veau [Pulleyblank et coll., 1975] ou encore les cellules HeLa [Liu et coll., 1983]), la topoisomérase V de l'archaebactérie *Methanopyrus kandlerii* [Slesarev et coll., 1993, 1994] et les topoisomérases I de poxvirus [Bauer et coll., 1977 ; Shaffer et coll., 1987 ; Shuman et coll., 1987]. Ici, l'enzyme, d'un poids moléculaire compris entre 80 et 100 kDa, se lie préférentiellement à l'ADN double brin [Roca, 1995] et forme un intermédiaire, comme pour le type IA, mais via l'extrémité 3' de l'ADN générée par la coupure.

Le tableau 1 donne un bref récapitulatif général des différents types d'ADN topoisomérases rencontrés chez les Procaryotes et les Eucaryotes.

Dans ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'ADN topoisomérase I humaine (topoI).

Rappels bibliographiques

ADN topoisomérase	Type	Structure	Taille (acides aminés)
ADN top I Eubactérie ( <i>E. coli</i> )	IA	Monomère	865
ADN top II Eubactérie ( <i>E. coli</i> )	IA	Monomère	653
ADN top 3 de levure ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	IA	Monomère	656
ADN top 3 $\alpha$ de mammifère (humaine)	IA	Monomère	1001
ADN top 3 $\beta$ de mammifère (humaine)	IA	Monomère	862
Gyrase reverse d'Eubactérie et d'archaebactérie ( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> )	IA	Monomère	1247
Gyrase reverse d'Eubactérie ( <i>Methanopyrus kandlerii</i> )	IA	Hétérodimère	A, 358 B, 1221
ADN top 1 Eucaryote	IB	Monomère	765
ADN top 1 de poxvirus (Vaccinia)	IB	Monomère	314
ADN top V d'Eubactérie hyperthermophile ( <i>Methanopyrus kandlerii</i> )	IB	Monomère	Gène non cloné
ADN gyrase d'Eubactérie ( <i>E. coli</i> )	IIA	Hétérotetramère A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	GyrA, 875 GyrB, 804
ADN top IV d'eubactérie	IIA	Hétérotetramère C <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	ParC, 752 ParE, 630
ADN topo 2 de levure ( <i>S. cerevisiae</i> )	IIA	Homodimère	1428
ADN top 2 $\alpha$ de mammifère (humaine)	IIA	Homodimère	1531
ADN top 2 $\beta$ de mammifère (humaine)	IIA	Homodimère	1626
ADN top IV d'archaebactérie ( <i>Sulfolobus shibatae</i> )	IIB	Hétérotetramère A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	A, 389 B, 530

**Tableau 1.** Classification des ADN topoisomérases chez les Procaryotes et les Eucaryotes. Par convention, les topoisomérases Procaryotes sont notifiées par des chiffres romains et les ADN topoisomérases Eucaryotes par des chiffres arabes [Champoux, 2001].

### I.1.1. L'ADN topoisomérase I humaine

#### I.1.1.1. Structure et domaines d'organisation

L'ADN topoisomérase I humaine (topoI) est une protéine monomérique de 765 acides aminés [D'Arpa et coll., 1988]. Elle est constituée de quatre régions majeures (Figure 1) : le domaine terminal NH<sub>2</sub>, le cœur, le domaine de liaison et le domaine terminal COOH. Le domaine terminal NH<sub>2</sub>, d'environ 210 résidus, est hautement chargé, contient très peu d'acides aminés hydrophobes et est grandement désordonné [Stewart et coll., 1996]. Ce domaine contient plusieurs signaux nucléaires [Alsner et coll., 1992]. Il est impliqué dans la localisation nucléaire, par des interactions avec la nucléoline [Bharti et coll., 1996], phosphoprotéine nucléolaire possédant diverses fonctions, dont le transport nucléocytoplasmique. Le domaine terminal COOH, d'environ 50 résidus, contient l'essentielle Tyrosine 723 qui forme une liaison phosphoester avec le phosphate 3' du brin d'ADN coupé, du site de clivage [Madden et coll., 1992]. Le cœur est constitué d'environ 430 résidus et le domaine de liaison, qui n'est pas requis pour l'activité de l'enzyme, de 70 résidus. [Stewart et coll., 1997]. TopoI apparaît donc comme une enzyme multi-domaines comportant :

- ✘ deux domaines globulaires hautement conservés (le cœur et le domaine terminal COOH) qui sont cruciaux pour l'activité catalytique.
- ✘ deux régions (le domaine terminal NH<sub>2</sub> et le domaine de liaison) qui ne sont pas indispensables aux fonctions catalytiques et de relaxation de l'enzyme.

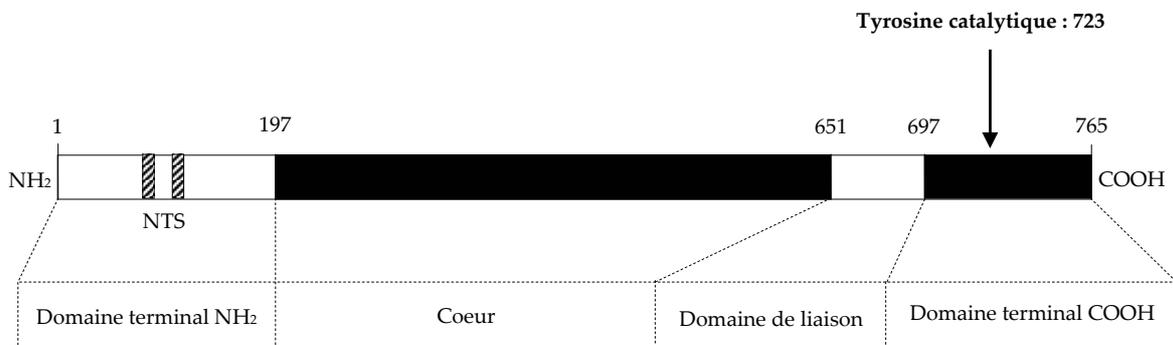
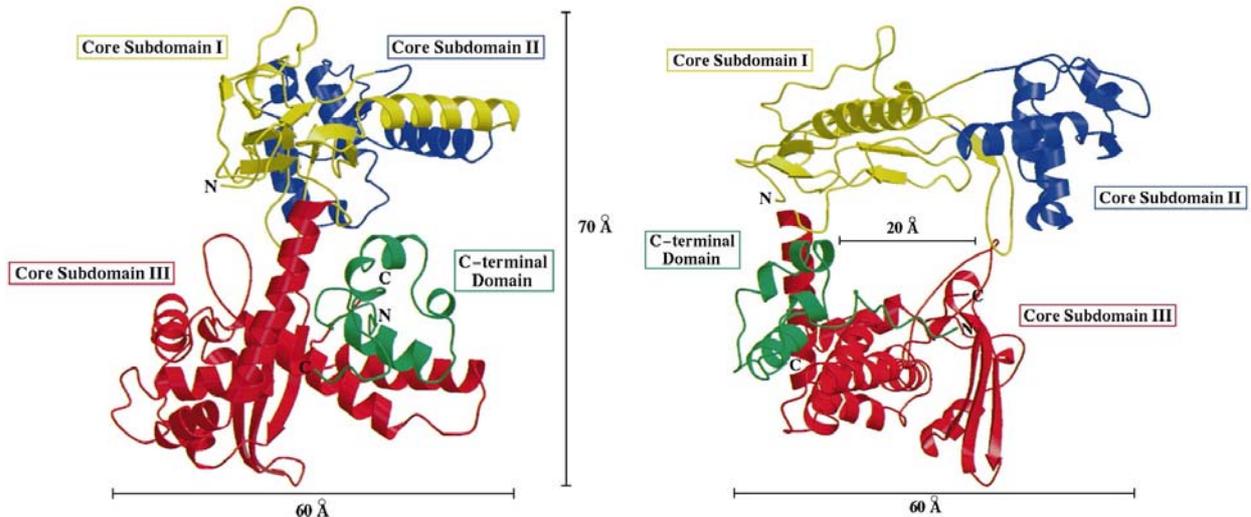


Figure 1. Domaines d'organisation de l'ADN topoisomérase I humaine [Pommier, 1998].



**Figure 2.** Structure de l'ADN topoisomérase I humaine reconstituée, sans le domaine de liaison et le domaine terminal NH<sub>2</sub>. Vue perpendiculaire au pore, et après une rotation de 90° suivant l'axe vertical [Redinbo et coll. 1998].

La figure 2 représente la structure en 3 dimensions de topoI reconstituée, composée d'un cœur de 58 kDa (Sous-domaines I, II et III) et d'un domaine terminal COOH de 6.3 kDa. Elle a une même activité spécifique que la protéine native complète. Cette représentation met en évidence un pore central composé en majorité de résidus chargés positivement, 15 lysines et 8 arginines, conférant un haut potentiel électrostatique autour du pore. Les résidus catalytiques de l'enzyme, incluant la tyrosine 723, sont situés à l'intérieur de cette région hautement positive.

#### I.1.1.2. Mécanisme enzymatique

Le cycle catalytique de topoI peut être divisé en quatre étapes : liaison de l'enzyme à l'ADN, clivage d'un brin, relaxation de l'ADN et, enfin, religation et libération de topoI (Figure 3).

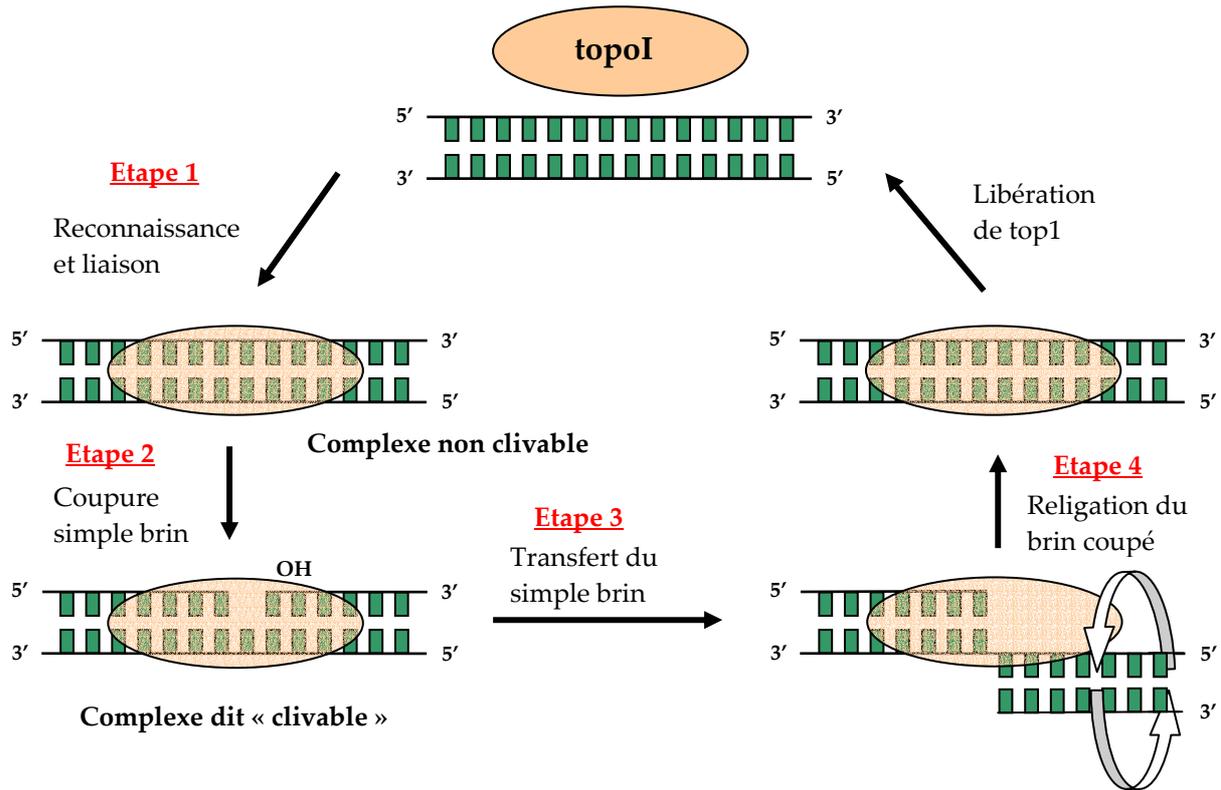


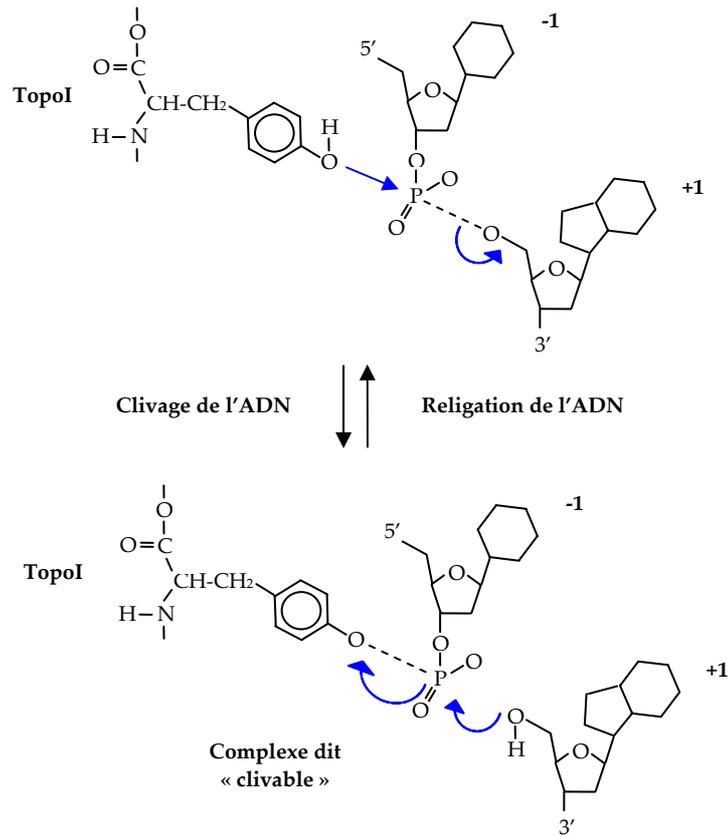
Figure 3. Schéma du mécanisme d'action de l'ADN topoisomérase I.

#### ✘ Liaison de l'enzyme à l'ADN

TopoI se lie uniquement à l'ADN double brin [Been et coll., 1984 ; Jaxel et coll., 1991] de manière non covalente. Cette liaison apparaît comme étant plus efficace au niveau des régions coudées ou sur-enroulées de l'ADN. [Caserta et coll., 1989 ; Krogh et coll., 1991].

#### ✘ Clivage de l'ADN

Le clivage de l'un des brins d'ADN, suivi de l'attachement de manière covalente de topoI à l'extrémité 3' de l'ADN coupé, conduit à la formation d'un complexe covalent : le complexe dit « clivable ». La coupure du brin est réalisée par une réaction de transestérification. Le groupement hydroxyle de la tyrosine catalytique 723 de topoI se lie au phosphate en 3' d'une liaison phosphodiester d'un brin d'ADN, libérant alors l'hydroxyle 5' pour générer la coupure du brin (Figure 4) [Champoux, 1981 ; Lynn et coll., 1989]. Le clivage de l'ADN nécessite l'interaction entre l'enzyme, le brin qui sera clivé et le brin non clivé [Christiansen et coll., 1993].



**Figure 4.** Clivage de l'ADN par topoI et formation du complexe de clivage par réaction de transestérification. La religation de l'ADN s'effectue par une deuxième réaction de transestérification. La position (-1) correspond à la base située à l'extrémité 3' du brin clivé d'ADN et la position (+1) à la base située à l'extrémité 5' du brin clivé d'ADN.

#### ✂ Relaxation de l'ADN

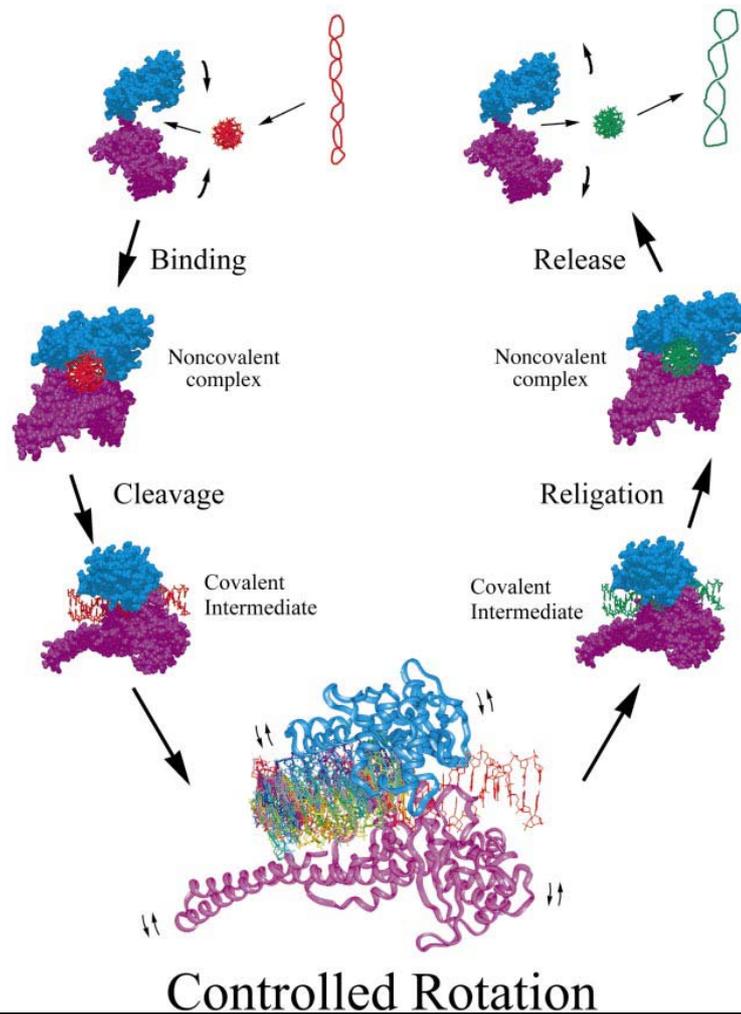
Plusieurs hypothèses sont émises quant aux mécanismes de relaxation de l'ADN, après la formation du complexe covalent et avant la religation de l'ADN. Parmi ceux-ci figurent « le passage simple-brin » et « le modèle de rotation libre ».

Le mécanisme de passage simple brin propose que le brin non coupé passe à travers un espace formé entre la liaison covalente de l'extrémité 3' et la liaison non covalente de l'extrémité 5' du brin coupé avec l'enzyme. Dans ce cas, un seul événement de désenroulement peut être réalisé lors d'un cycle clivage/religation [Christiansen et coll., 1993].

Le modèle de rotation libre suppose que l'extrémité 5' du brin coupé soit libérée du site actif de l'enzyme et puisse ainsi tourner librement autour du brin

complémentaire non coupé. Ceci sous-entend que de multiples évènements de désenroulement peuvent être réalisés pour chaque cycle de clivage/religation [Stivers et coll., 1997].

Cependant, un mécanisme intermédiaire a été proposé par Stewart et coll. en 1998, sous le nom de « rotation contrôlée » (Figure 5), dans lequel les interactions ioniques entre l'ADN et certaines régions de l'enzyme régularaient le processus de désenroulement [Stewart et coll., 1998]. Dans ce cas, les surtensions de l'ADN seraient libérées par un ou plusieurs cycles de rotation contrôlée.



**Figure 5.** Mécanisme de rotation contrôlée de topoI. L'ADN hautement surenroulé de tours négatifs (en rouge) devient à la fin du processus moins surenroulé (en vert). TopoI est figuré comme une structure bilobée avec, en cyan, le lobe « chapeau » et en magenta, le lobe « catalytique » [Stewart et coll., 1998].

### ✂ Religation et libération de topoI

La religation se fait par une deuxième réaction de transestérification où les deux brins clivés de l'ADN sont reliés et topoI libérée.

#### I.1.1.3. Sélectivité de séquence

Il est connu que les sites de clivage de l'ADN par topoI ne sont pas distribués au hasard au sein des fragments d'ADN, signifiant que topoI reconnaît des séquences spécifiques.

Neuf nucléotides sur le brin coupé et cinq sur le brin non coupé s'avèrent être essentiels pour une forte liaison de topoI à l'ADN [Svejstrup et coll., 1990]. De plus, il est important de noter que cette spécificité change en présence d'agents antitumoraux. En effet, les intensités relatives de clivage des sites varient selon la présence de différents composés chimiques. Chaque drogue peut stimuler le clivage de l'ADN à certains sites, mais l'enzyme ne les reconnaît pas tous, suggérant que l'efficacité des interactions des drogues dépend de la séquence des bases. Ainsi, la présence de nucléotides spécifiques, immédiatement adjacents au brin coupé, est indispensable pour une stimulation du clivage par la drogue [Capranico et coll., 1998].

#### I.1.1.4. Gène et régulation

Trois loci ont été mis en évidence, par hybridation à l'aide d'une sonde ADNc de topoI [Kunze et coll., 1989]. Les deux premiers sont des pseudogènes (rétroséquences) situés sur les chromosomes 1 et 22 [Yang et coll., 1990]. Le troisième locus, situé sur le chromosome 20 et constitué de 21 exons, correspond au gène actif de topoI [Juan et coll., 1988 ; Kunze et coll., 1989].

TopoI est régulée à trois niveaux : transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel.

Les éléments de régulation TATA et CCAAT sont absents de la région promotrice du gène de topoI. Cependant, il existe des motifs de liaison pour plusieurs facteurs transcriptionnels, comme Sp1 (facteur de transcription octamérique), les

éléments de réponse cAMP, NF-kB et les protéines membres des protéines hélice-boucle-hélice et leucine zippers [Heiland et coll., 1993 ; Kunze et coll., 1990]. Ainsi, suivant les conditions physiologiques, topoI est régulée par une trame complexe de facteurs de transcription positifs et négatifs [Kunze et coll., 1991].

TopoI fait partie des protéines dont l'activité est régulée par différentes kinases. La phosphorylation/déphosphorylation apparaît comme un mécanisme clé de la régulation de topoI *in vivo*. Par exemple, la phosphorylation des résidus sérine augmente son activité [Samuels et coll., 1989 ; Pommier et coll., 1990] tandis que la déphosphorylation inhibe son activité de relaxation [Pommier et coll., 1990]. De plus, la phosphorylation régule l'activité de topoI par stabilisation des complexes de clivage et par le recrutement de topoI pour la transcription ou pour l'interaction avec d'autres facteurs de transcription.

Il a également été montré que la poly(ADP-ribosylation) diminuait l'activité catalytique de l'enzyme *in vitro* [Kasid et coll., 1989 ; Ferro et coll., 1984].

Enfin, certaines interactions de topoI avec d'autres protéines peuvent affecter son activité, sa stabilité et sa distribution intracellulaire.

#### I.1.1.5. Fonctions biologiques

Elles sont diverses et variées au niveau de l'ADN.

Durant la réplication, des super-tours positifs s'accumulent dans la portion non répliquée de l'ADN, créant ainsi des forces de torsion. En absence de topoI, le mouvement de la fourche de réplication est alors arrêté. Cet effet est pallié par l'activité de coupure/reliation de topoI.

TopoI est impliquée dans la transcription de certains gènes. Les sites de liaison et de clivage de topoI ont été cartographiés le long de régions d'ADN activement transcrites comme les gènes des ARN polymérase I et II [Kroeger et coll., 1992 ; Gilmour et coll., 1986]. TopoI agit comme un pivot pour soulager les contraintes de torsion causées par la génération de super-tours positifs en amont et de super-tours négatifs en aval du mouvement de l'ARN polymérase [Liu et coll., 1987 ; Wang et coll., 1993]. De

plus, il a été récemment montré que topoI était associée à la protéine se liant à la boîte TATA et impliquée dans la répression et l'activation de la transcription [Merino et coll., 1993 ; Kretzschmar et coll., 1993].

Enfin, des expériences *in vitro* avec des oligonucléotides ont démontré que topoI peut produire des recombinaisons illégitimes entre un complexe de clivage et un ADN exogène possédant un groupement hydroxyle terminal en position 5' [Shuman et coll., 1992 ; Christiansen et coll., 1994 ; Pommier et coll., 1995].

TopoI s'avère aussi être capable de couper les mésappariements de bases au niveau de son site de clivage [Yeh et coll., 1994].

### I.1.2. Les inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I humaine

Les inhibiteurs de topoI sont de prometteurs agents anti-cancéreux. Ils sont divisés en deux groupes principaux : les poisons et les supprimeurs. Ils inhibent tous les deux l'activité catalytique de l'enzyme, mais selon des modes d'action différents.

#### ✘ Les poisons

Ils tuent les cellules en stabilisant les complexes de clivage ADN-topoI, ceci empêchant la religation des brins coupés d'ADN et la libération de topoI (Figure 6).

Il a été montré que la sensibilité des cellules aux poisons augmentait avec la surexpression de topoI [Bjornsti et coll., 1989 ; Madden et coll., 1992] et qu'une réduction de l'activité de topoI est une cause de résistance des cellules aux poisons [Gupta et coll., 1995 ; Pommier et coll., 1996<sup>B</sup>].

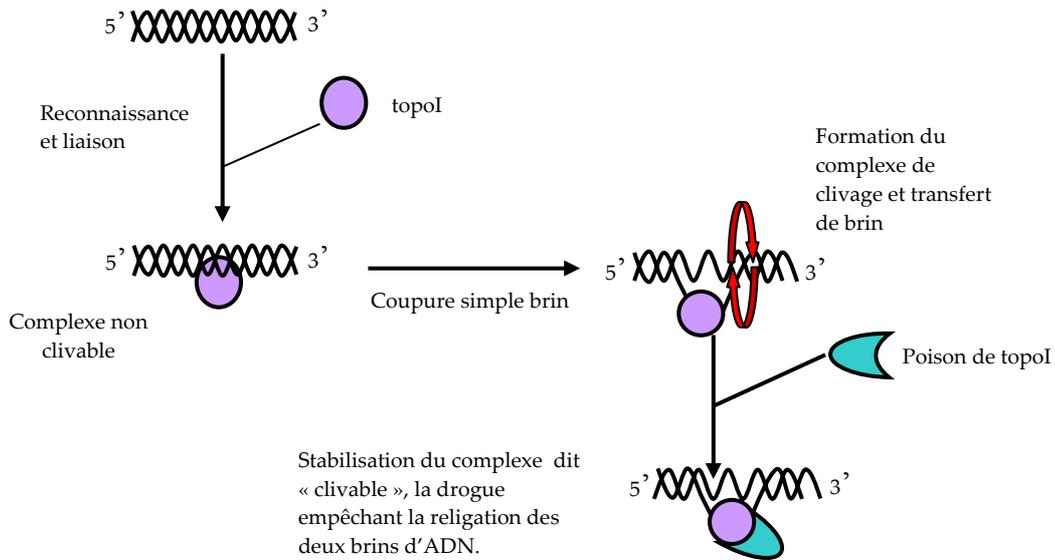
Les grandes classes de poisons sont les camptothécines et les benzo[c]phénanthridines (qui feront l'objet de sous chapitres), les benzoanthracènes, les protoberbérines, des composés hétérocycliques comme les indoloquinolinediones, les indolocarbazoles, les benzimidazoles [Pommier et coll., 1998].

---

B : cité in :

PANTAZIS P, GIOVANELLA BC, ROTHENBERG ML (Eds.).  
Cellular resistance to camptothecins.  
New York : The New York Academy of Sciences ; 1996, 60-73.

## Rappels bibliographiques

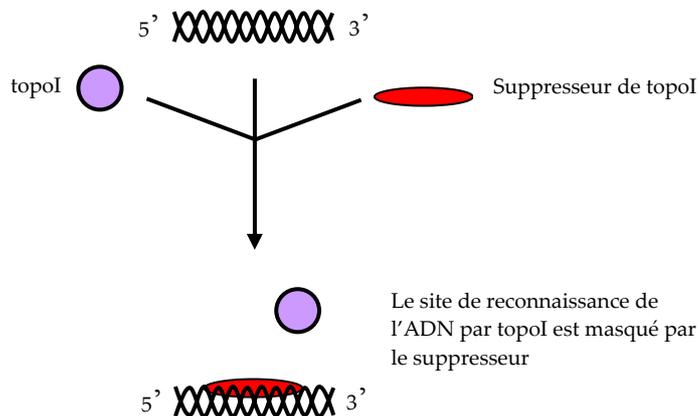


**Figure 6.** Mécanisme d'action d'un poison de l'ADN topoisomérase I.

### ✘ Les suppresseurs

Ils agissent en empêchant la reconnaissance de topoI à son site de fixation, inhibant ainsi la formation des complexes de clivage.

Il apparaît que les suppresseurs sont plus actifs dans les cellules possédant un faible taux de topoI.



**Figure 7.** Mécanisme d'action d'un suppresseur de l'ADN topoisomérase I.

En général, les ligands de l'ADN, incluant les intercalants comme la doxorubicine [Wassermann et coll., 1990], l'aclacinomycine A [Sorensen et coll., 1994], et les ligands du sillon mineur de l'ADN comme la distamycine A [Mortensen et coll.,

1990] ou le Hoechst 33258 [Beerman et coll., 1992] peuvent supprimer la liaison de topoi à l'ADN. Cet effet est observé à des concentrations de drogue relativement élevées [Wassermann et coll., 1990] et apparaît directement lié à l'affinité de liaison à l'ADN [Beerman et coll., 1992]. De ce fait, la drogue se liant à l'ADN empêche l'accès à topoi et/ou distord la structure de l'ADN.

#### I.1.2.1. Les camptothécines

La camptothécine (CPT) fut découverte il y a environ 38 ans comme étant un alcaloïde antitumoral [Wall et coll., 1966]. Extraite de l'arbre chinois *Camptotheca acuminata*, elle s'avère posséder une activité d'inhibition de topoi [Liu et coll., 1989 ; Pommier et coll., 1993<sup>c</sup>]. En raison de son insolubilité dans l'eau, CPT constitua le point de départ d'un important développement de dérivés solubles, formant la grande famille des camptothécines.

Deux dérivés de CPT ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation en clinique : le topotécan (hycamtin®), utilisé pour le traitement des cancers ovariens et pulmonaires à petites cellules (SCLC), et le CPT-11 (irinotécan®), pro-drogue convertie en métabolite actif SN-38, qui est approuvé pour le traitement des carcinomes métastatiques coliques et rectaux.

D'autres dérivés sont en cours d'essais cliniques, comme la 9-aminocamptothécine, la 9-nitrocamptothécine, l'exatecan mesylate, le ST1481, ou encore la karénitécine [Rasheed et coll., 2003].

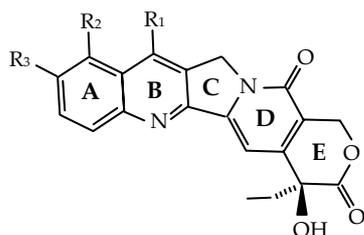
##### I.1.2.1.1. Structure et mécanisme d'action

CPT est une molécule plane, en forme d'arc. N'étant pas soluble dans l'eau, de nombreuses recherches ont visé à obtenir des dérivés solubles, avec des efficacités antitumorales variables, tels le topotécan (TPT), le CPT-11 et son métabolite actif le SN-38 (Figure 8).

---

C : cité in :

HICKMAN J, TRITTON T (Eds.).  
Mammalian DNA topoisomerase I and its inhibitors.  
Oxford : Blackwell Scientific ; 1993, 214-250.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Camptothécine	H	H	H
Topotécan	H	CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	OH
SN-38	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	OH
CPT-11	CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	H	

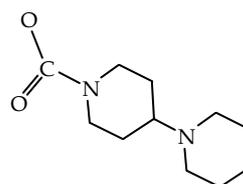


Figure 8. Structure de quelques camptothécines

CPT existe sous deux formes (Figure 9) : une forme lactone où le cycle E de la molécule est fermée et une forme carboxylate, où le cycle E est ouvert. Il s'avère que le cycle E sous forme lactone est critique pour l'activité antitumorale *in vivo* de CPT [Hertzberg et coll., 1989].

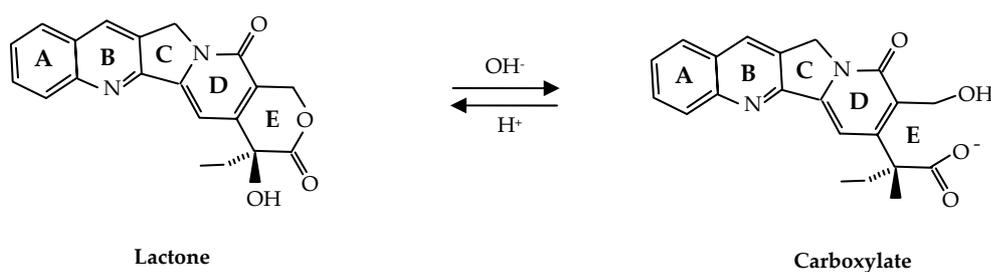


Figure 9. Interconversion réversible et dépendante du pH de la camptothécine par la carboxylestérase.

CPT, comme ses dérivés, stabilise les complexes de clivage topoI-ADN par formation d'un complexe ternaire et inhibe l'activité catalytique de l'enzyme en prévenant la religation de l'ADN [Covey et coll., 1989 ; Hsiang et coll., 1985]. Les

modèles de complexe ternaire montrent CPT comme intercalée entre la position (-1) et la position (+1) du site de clivage, formant des liaisons hydrogène avec topoI et l'ADN. Ceci stabilise ainsi le complexe ternaire [Fan et coll., 1998 ; Redinbo et coll., 1998 ; Kerrigan et coll., 2001].

En raison de son action, CPT a été utilisée pour localiser les sites de clivage de topoI dans les gènes [Jaxel et coll., 1989] et ainsi corréler la position de ces sites avec le rôle de topoI. Néanmoins, il a été montré que CPT ne stabilise pas tous les sites de clivage et que sa présence en induit de nouveaux [Jaxel et coll., 1988 ; Wassermann et coll., 1990]. La séquence d'ADN, au niveau du site de clivage de topoI, est donc importante pour l'action de CPT, notamment la base située en position (+1). Ainsi, en l'absence de drogue, il est trouvé préférentiellement une thymine en position (-1), la position (+1) ne montrant pas de préférence de base significative. En présence de CPT, la guanine devient la base préférentielle en position (+1) [Jaxel et coll., 1991].

#### I.1.2.1.2. Résistance aux camptothécines

Les mécanismes de résistance clinique aux camptothécines restent encore mal connus. Cette résistance résulterait d'une accumulation inadéquate de la drogue dans la tumeur, d'altérations de topoI et/ou d'altérations dans la réponse cellulaire à l'interaction topoI-CPT.

##### ✘ Accumulation cellulaire et transport des camptothécines

Des données obtenues *in vitro* ont indiqué que de brèves expositions à des concentrations sous-micromolaires de CPT étaient nécessaires pour cibler topoI et tuer les cellules cancéreuses en prolifération [Goldwasser et coll., 1995]. Cependant, la concentration intracellulaire de CPT active s'avère être dépendante de l'assimilation cellulaire, du métabolisme et des mécanismes d'efflux.

Plusieurs travaux de recherche ont pu montrer que les protéines ABC (ATP-Binding Cassette) sont impliquées dans l'efflux et la résistance cellulaire aux CPTs chez les Eucaryotes [Reid et coll., 1997]. Combinées à ces protéines ABC, la surexpression du

gène MDR1 confère également une résistance aux CPTs [Chen et coll., 1991]. De plus, une surexpression du gène BCRP [Honjo et coll., 2001] s'est montrée liée à une résistance multidrogue.

Tous ces résultats donnent un bref aperçu de la diversité des mécanismes pouvant conduire à l'efflux des drogues des cellules cibles.

#### ✘ Altérations de topoI

Des mutations au sein de topoI confèrent une résistance aux CPTs. Ces points de mutations sont en majeure partie groupés en trois régions, dont l'une est située à proximité de la tyrosine 723 [Tamura et coll., 1991 ; Tsurutani et coll., 2002].

Des interactions entre topoI et d'autres protéines peuvent affecter la sensibilité cellulaire aux CPTs. Par exemple, la perte de la nucléoline conduit à une localisation nucléaire diffuse de topoI. Ceci a pour effet une diminution de la quantité totale de topoI liée à l'ADN, réduisant alors les effets des CPTs [Edwards et coll., 2000]. Enfin, topoI est connue pour changer rapidement de localisation, suite à une exposition cellulaire à la CPT [Buckwalter et coll., 1996]. Cette relocalisation est associée à l'action de SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur topoI [Muller et coll., 2001], conduisant à une diminution des interactions topoI-ADN [Mo et coll., 2001] et donc, à une diminution d'efficacité de la CPT.

Des modifications post-traductionnelles de topoI observées après un traitement de cellules par la CPT seraient impliquées dans la résistance. Il s'agit d'une ubiquitination de topoI apparaissant lorsque l'enzyme est imbriquée dans le complexe ternaire [Desai et coll., 1997].

#### ✘ Altérations dans la réponse cellulaire à la formation du complexe ternaire

Il est bien établi que topoI est la cible spécifique de CPT, celle-ci induisant la formation de complexes ternaires CPT-topoI-ADN. Cependant, ces complexes sont réversibles et leur formation est insuffisante à expliquer les effets cytotoxiques de la CPT [Hsiang et coll., 1989]. La cytotoxicité de CPT prend effet lors de la phase S du

cycle cellulaire. La collision des fourches de réplication avec le complexe ternaire conduit alors à des cassures double brin au niveau de l'ADN. Ce processus est nécessaire à l'induction de la mort cellulaire.

L'exposition cellulaire à la CPT conduit à l'activation des protéines de contrôle de la phase S comme Chk1 [Wan et coll., 1999] ou ATR [Cliby et coll., 2002]. Une perte de leur fonction est associée à une augmentation de la sensibilité cellulaire pour CPT. De plus, les protéines intervenant dans la réplication de l'ADN sont aussi impliquées dans la modulation de la cytotoxicité de CPT.

Les mécanismes de réparation des erreurs et d'excision de base sont également impliqués. En effet, des cellules présentant une déficience dans la protéine de réparation MSH2 ont montré une hypersensibilité à la CPT [Pichierri et coll., 2001]. Récemment, des études sur Pnk1, une polynucléotide kinase jouant un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN induits par la CPT, ont montré qu'une déficience dans le gène de cette protéine rendait les cellules hypersensibles à la CPT [Meijer et coll., 2002]. Toutes ces études indiquent que la perte des protéines de réparation de l'ADN augmente la sensibilité cellulaire.

Les camptothécines possèdent deux limitations majeures dans leur emploi en clinique :

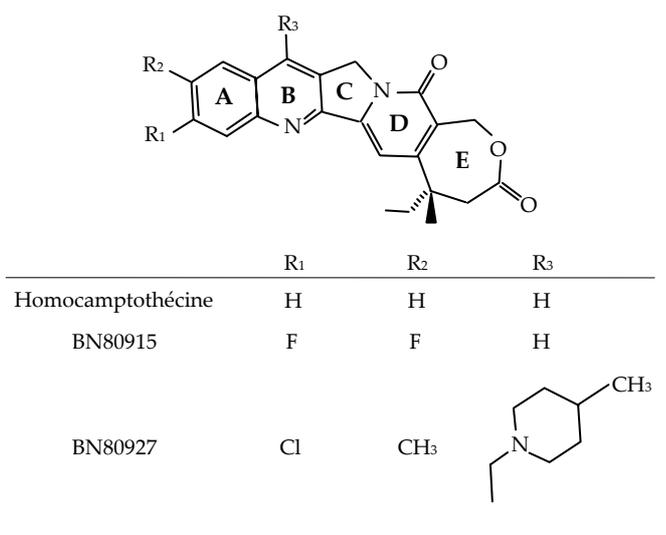
1°- Un équilibre s'établit entre leur forme active lactone et leur forme inactive carboxylate à pH physiologique.

2°- Les complexes ternaires sont réversibles au bout de quelques minutes après retrait de la drogue, ce qui impose des temps d'infusion longs pour les traitements en clinique.

C'est pourquoi les recherches se portent également vers d'autres types d'inhibiteurs de topoI.

I.1.2.2. Les homocamptothécines

C'est une classe prometteuse de poisons efficaces contre topoI. Pour pallier aux limitations des CPTs notamment dues à l'interconversion de leur cycle E, des études se sont attachées à modifier directement le cycle E dans le but de ralentir son hydrolyse. C'est ainsi que l'homocamptothécine (hCPT) fut synthétisée avec succès en 1997 [Lavergne et coll., 2000] par extension du cycle E (Figure 10) de la CPT. Elle présente une stabilité dans le plasma accrûe, une action d'inhibition envers topoI plus grande que les CPTs et des activités cytotoxique et antitumorale efficaces [Lesueur-Ginot et coll., 1999]. Ceci prouva qu'il était possible de modifier le cycle E de CPT sans perdre l'activité inhibitrice. Cette découverte stimula la mise au point de nouveaux dérivés, formant une nouvelle famille d'inhibiteurs : les homocamptothécines (hCPTs).



**Figure 10.** Structure de l'homocamptothécine et de deux dérivés utilisés en essais cliniques.

L'un des dérivés de hCPT est actuellement en phase I d'essais cliniques : BN80915 (ou diflomotécan). Les résultats préliminaires sont très encourageants et la phase II a très récemment débuté.

Il est à noter qu'un autre dérivé, BN80927, montre également un grand potentiel antiprolifératif des cellules tumorales. Ce dérivé est actuellement en développement préclinique [Bailly et coll., 2003].

### I.1.2.3. Les benzo[c]phénanthridines

Les benzo[c]phénanthridines ont attiré l'attention depuis la découverte d'une activité antileucémique de la nitidine et de la fagaronine [Messmer et coll., 1972], alcaloïdes naturels tirés de *Zanthoxylum nitidum* [Arthur et coll., 1958] et *Fagara zanthoxyloides* [Messmer et coll., 1972], respectivement.

Ces deux composés piègent le complexe de clivage de topoI et sont des intercalants efficaces de l'ADN [Fang et coll., 1993].

Bien que la nitidine (Figure 11) ait montré une activité anti-leucémique dans des modèles animaux [Larsen et coll., 1993], elle a été abandonnée du fait de sa faible activité contre les tumeurs solides [Janin et coll., 1993]. De ce fait, les études ultérieures se sont attachées à la fagaronine (FGR) et à la recherche de dérivés synthétiques, tels l'ethoxidine (ETX), tous deux étant des intercalants du sillon majeur de l'ADN [Janin et coll., 1993].

FGR est connue pour être un inhibiteur efficace de topoI, par stabilisation du complexe de clivage entre l'enzyme et l'ADN [Wang et coll., 1993]. Il en est de même pour ETX mais avec une plus grande cytotoxicité au niveau cellulaire. Les différences de modes de liaison à l'ADN mais aussi d'interactions moléculaires de certains groupements de ces molécules au niveau du sillon mineur de l'ADN, modulent l'effet d'inhibition de topoI par ces drogues.

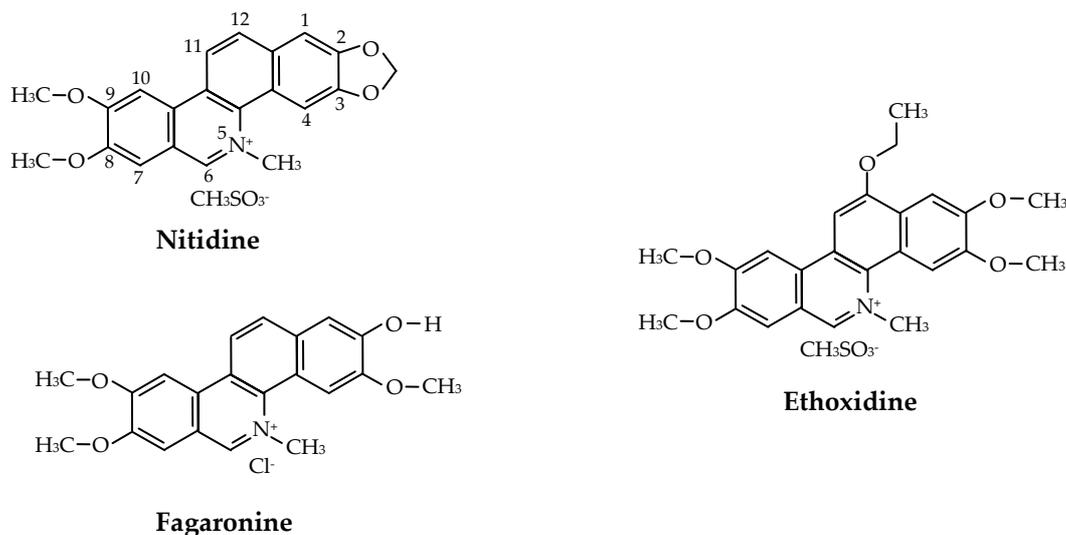


Figure 11. Structures de la nitidine, la fagaronine et son dérivé synthétique, l'ethoxidine.

✘ La fagaronine

Elle montre des activités biologiques diverses, comme une activité antitumorale dans les leucémies murines P388 et L1210 *in vivo* [Douros et coll., 1981], une induction de la différenciation des cellules erythroleucémiques humaines K562 et promyélocytopiques HL60 [Comoe et coll., 1987]. FGR inhibe la synthèse des acides nucléiques par interaction avec l'ADN et l'étape d'élongation de la synthèse protéique [Torres et coll., 1986].

FGR ne possède pas de spécificité de séquence, en rapport avec la nature des bases situées en position (+1) et (-1) du site de clivage de l'ADN mais traduit cependant une préférence pour une guanine en position (+1), en relation avec le rôle clé que joue le résidu hydroxyle de FGR dans les interactions de la drogue avec l'ADN. En effet, FGR s'oriente de telle façon que son groupement OH est dirigé vers le sillon mineur de l'ADN [Ianoul et coll., 1998]. Des interactions moléculaires sont alors possibles (ici, sous forme de liaisons hydrogène) entre le groupement OH et le groupement amine de la guanine, base de la position (+1) du site de clivage de l'ADN.

L'orientation de la FGR fait envisager que l'azote quaternaire électrophile se trouve partiellement exposé dans le sillon mineur de l'ADN, pouvant alors être l'objet d'une attaque nucléophile par l'un des groupements de topoI pour former une liaison covalente labile. Il en résulte une stabilisation du complexe de clivage topoI-ADN [Fleury et coll., 2000].

Enfin, FGR a montré un mode d'action dépendant de sa concentration. A faibles concentrations, elle agit sur topoI comme un poison alors qu'à fortes concentrations, elle supprime la reconnaissance des sites de clivage pour topoI [Wang et coll., 1993].

✘ L'éthoxidine

Dérivé synthétique de FGR, avec notamment l'ajout d'un groupe ethoxy en position 12, ETX est un inhibiteur de l'activité de relaxation de l'ADN par topoI 10 fois plus efficace que le composé dont elle dérive.

ETX ne peut piéger le complexe de clivage mais agit comme un suppresseur suivant une spécificité de séquence. Les sites de clivage possédant une thymine en position (-1) et une adénine en position (+1) sont supprimés plus efficacement que les autres. Ceci est dû au groupe 12-ethoxy qui, faisant sailli dans le sillon mineur de l'ADN, a plus de facilités pour pénétrer à l'intérieur d'un duplex d(AT) que d(GC), plus rigide.

Actuellement, de nombreuses études sont axées sur la synthèse de nouveaux dérivés comme les isostères des benzo[c]phénanthridines. Plusieurs groupes de recherche s'attachent à développer des benzo[i]phénanthridines non chargées, leur but étant d'obtenir une classe alternative d'agents ciblant topoI, dépourvues des limitations associées aux alcaloïdes chargés positivement, notamment dans leur absorption et leur biodisponibilité [Makhey et coll., 2003]. Des benzo[c]phénanthrolines ont été déjà synthétisées, montrant d'intéressantes activités cytotoxiques et une capacité à s'intercaler dans l'ADN [Prado et coll., 2004].

## **I.2. Les Nanobiotechnologies**

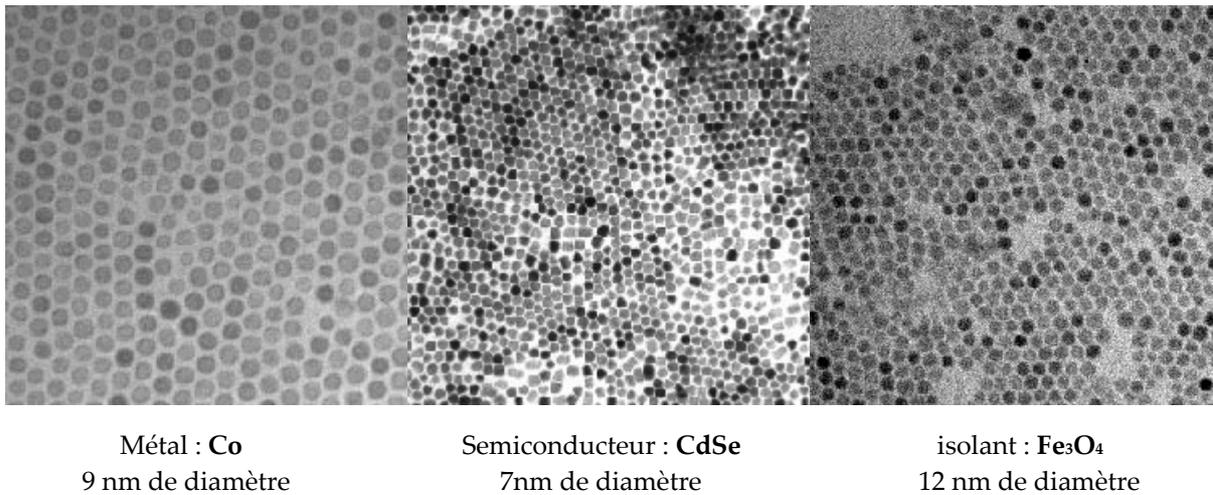
### **I.2.1. Définition**

Les nanotechnologies forment un champ de recherche révolutionnaire où physique, chimie et biologie convergent. Elles sont définies comme étant l'étude et l'utilisation de structures d'une taille inférieure à 100 nm. Les nanoparticules, produits des nanotechnologies, sont en pleine émergence en ce début du XXI<sup>ème</sup> siècle. Ceci est dû à leurs propriétés chimiques et physiques dépendant de leur taille, mais aussi aux perspectives commerciales qu'elles engendrent.

Les applications des nanosciences en biologie et biotechnologies ont donné naissance au terme « nanobiotechnologies ». Celles-ci sont importantes par l'accès qu'elles donnent à de nouveaux outils d'analyse et ouvrent ainsi la voie à des solutions pour résoudre des problèmes biologiques et médicaux. En contrepartie, la biologie offre

des exemples de nanostructures fonctionnelles pouvant servir de bases d'études pour le développement de nouveaux types de nanosystèmes.

Un intérêt tout particulier concerne les nanocristaux (NCs). Ce sont des regroupements cristallins de quelques centaines à milliers d'atomes pour des tailles de quelques nanomètres. En raison de leur petite taille, leurs propriétés chimiques et physiques sont dominées par leurs surfaces et non par leur masse [Alivisatos, 1996]. Les NCs peuvent être synthétisés à partir de différents matériaux (Figure 12) : des matériaux métalliques comme l'or [Brown et coll., 1999], l'argent [Quaroni et coll., 1999] ou le cobalt [Ershov et coll., 2000] ; des matériaux semi-conducteurs comme le cadmium sulfide [Murray et coll., 1993], le cadmium selenide [Peng et coll., 2001] ou le cadmium telluride [Talapin et coll., 2001] entre autres ; des isolants comme l'oxyde de fer [Rockenberger et coll., 1999] ou l'oxyde de titane [Trentler et coll., 1999].



**Figure 12.** Nanocristaux issus de différents matériaux. Chaque sphère représente un nanocristal unique [Parak et coll., 2003].

Trois propriétés sont importantes pour la qualité des NCs. Ils doivent être cristallins, posséder une distribution de taille aussi étroite que possible et être de forme régulière [Parak et coll., 2003].

Les cellules d'un organisme vivant ont une taille de 10  $\mu\text{M}$  en moyenne, avec des compartiments internes bien plus petits. C'est ici que les NCs jouent pleinement leur rôle en biologie. En effet, en raison de leur taille de l'ordre du nanomètre, les NCs sont à

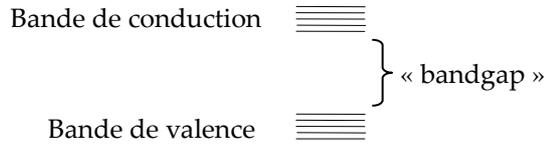
la base de la conception de très petites sondes permettant d'explorer la machinerie cellulaire sans y adjoindre d'interférences conséquentes [Taton et coll., 2002]. C'est notamment le cas pour les NCs semi-conducteurs fluorescents ou « Quantum dots ».

### I.2.2. Les nanocristaux fluorescents CdSe/ZnS

Ce sont des nanocristaux sphériques avec un cœur Cadmium Selenium (CdSe) recouvert d'une couche de Zinc Soufre (ZnS), dans lesquels les électrons libres et les lacunes électroniques sont confinés.

Les électrons dans un cristal formé de matériel semiconducteur possèdent une gamme d'énergie. Un électron avec une énergie différant d'un second électron est placé dans un niveau d'énergie différent. Les niveaux d'énergie sont dans ce cas si proches les uns des autres qu'ils sont décrits comme continus. Il existe cependant une région où aucun niveau d'énergie pour les électrons n'existe : c'est la bande interdite ou « bandgap » (Figure 13). Les électrons occupant les niveaux d'énergie en-dessous de la « bandgap » sont dans la bande de valence, et ceux occupant les niveaux d'énergie au-dessus dans la bande de conduction. Pour passer d'une bande à l'autre, les électrons doivent acquérir l'énergie suffisante pour traverser la « bandgap ».

Au niveau d'un NC semiconducteur possédant un petit nombre d'atomes pour une dimension physique allant jusqu'à 10 nm, les niveaux d'énergie sont dits discrets, c'est-à-dire que l'addition ou la soustraction d'un atome au sein du NC cause un changement mesurable dans l'énergie de la « bandgap ». L'existence de ces niveaux d'énergie discrets amène la notion de confinement quantique et justifie le nom de « quantum dots » pour ces NCs dont la « bandgap » est modulable et dépendante de la taille du Qd [Brus, 1986].



**Figure 13.** La « bandgap ». Elle représente l'énergie minimale qui doit être amenée par un photon pour que les électrons puissent passer de la bande de valence à la bande de conduction.

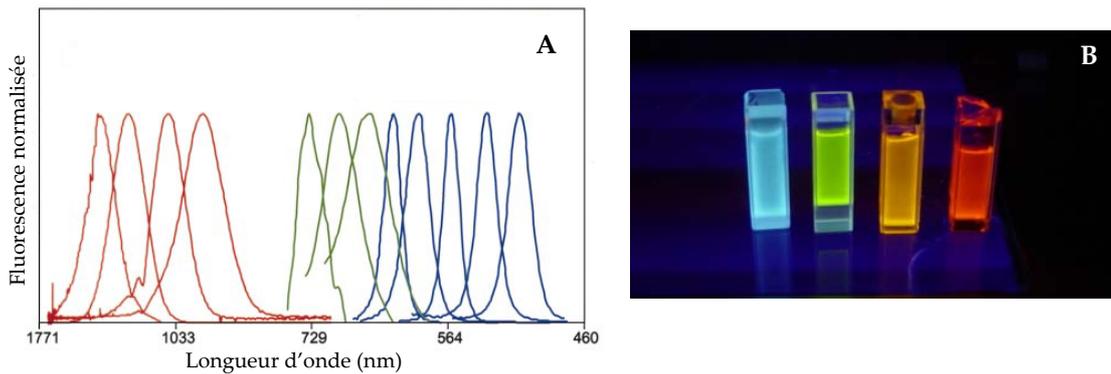
L'énergie d'un photon est définie par la relation de Planck :

$$E = h\nu, \text{ avec } \nu = c/\lambda$$

avec  $E$ , énergie du photon ;  $h$ , constante de Planck ;  $\nu$ , fréquence du photon ;  $c$ , vitesse de la lumière et  $\lambda$ , longueur d'onde.

Quand un photon d'énergie  $h\nu$  suffisante (supérieure à celle de la « bandgap » qui est située dans l'infrarouge pour les Qds) va exciter un électron, celui-ci va passer de la bande de valence à la bande de conduction. Cette promotion de l'électron vers la bande de conduction laisse un « trou » dans la bande de valence. Ce « trou » peut être considéré comme une particule avec sa propre charge (positive) et sa masse. La paire électron-trou est appelée exciton. L'électron promu va rester momentanément dans la bande de conduction avant de retomber en-dessous de la « bandgap », à son niveau d'énergie naturel. Lors de sa relaxation, l'énergie perdue de cet électron sera émise notamment sous forme d'émission d'une fluorescence dans le domaine du visible.

En contrôlant la taille des Qds par le nombre d'atomes les constituant, il est possible de moduler la « bandgap » et d'obtenir toutes les couleurs d'émissions de fluorescence couvrant le domaine du visible (Figure 14) [Bawendi et coll., 1990].



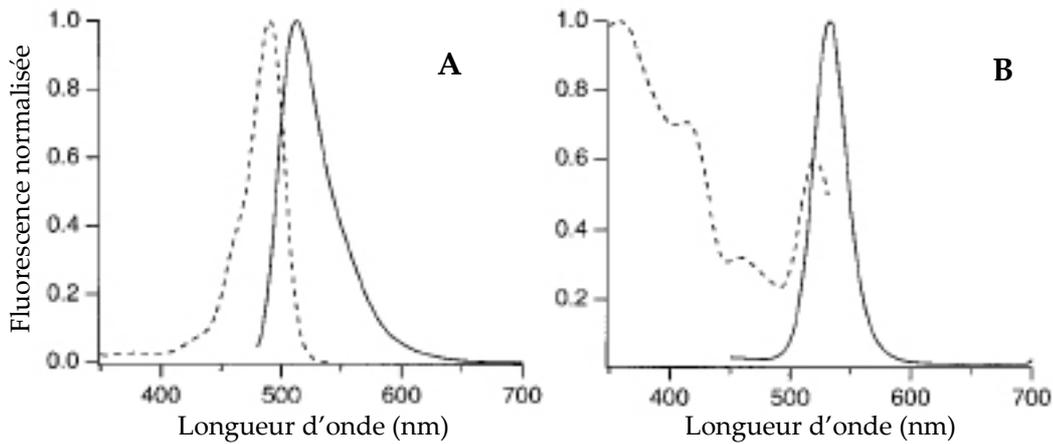
**Figure 14.** Nanocristaux CdSe/ZnS. (A)-Spectres d'émission de plusieurs nanocristaux semiconducteurs de taille différente. En bleu, Qds CdSe; en vert, Qds InP; en rouge, Qds InAs. Pour chaque type de Qds, les diamètres vont croissants, de la droite vers la gauche [Bruchez et coll., 1998]. (B)-Qds de taille différente excités simultanément.

La synthèse des Qds est réalisée dans un solvant organique, sous haute température, dans le but d'obtenir une bonne distribution de taille. Les Qds obtenus sont hydrophobes, recouverts par une couche de surfactant, le trioctylphosphine oxyde (TOPO). Cette couche stabilise les Qds dans les solvants comme le toluène ou le chloroforme et évite leur agglomérat. Cependant, pour une utilisation en biologie, la surface des Qds doit être hydrophile. C'est pourquoi différentes stratégies de solubilisation ont été mises au point :

- ✘ Par l'échange des molécules de TOPO adsorbées à la surface des Qds avec des molécules bifonctionnelles, hydrophiles d'un côté (par un groupement –COOH par exemple) et liées par ZnS de l'autre (via un groupement –SH par exemple), comme l'acide mercaptoacétique [Chan et coll., 1998].
- ✘ Par silanisation de la surface des Qds, par des silanes [Parak et coll., 2002] ou des silanes possédant de longues chaînes hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) [Skaff et coll., 2003].
- ✘ Par adsorption d'une couche de polymère à la surface des Qds [Guo et coll., 2000].

Avec un rendement quantique de 70 à 80% [Hines et coll., 1996], les Qds montrent d'énormes avantages sur les colorants organiques traditionnels. Ils possèdent

un spectre d'excitation large pour un spectre d'émission étroit et symétrique. A l'inverse, un spectre d'excitation étroit pour un spectre d'émission large et asymétrique caractérise les fluorophores organiques (Figure 15). Dans ces conditions, les Qds peuvent être excités à plusieurs longueurs d'onde différentes, ce qui rend possible une excitation simultanée de Qds de taille différente. De plus, aucun chevauchement des spectres d'émission de fluorescence ne sera à déplorer, pouvant rendre difficile une interprétation en marquage simultané. Les Qds s'avèrent également avoir une sensibilité moindre au photoblanchiment en comparaison avec les fluorophores organiques comme le FITC ou l'Alexa Fluor [Sukhanova et coll., 2002], rendant possibles des suivis de marquage sur plusieurs jours.



**Figure 15.** Spectres d'excitation (en pointillés) et d'émission de la fluorescéine (A) et d'un nanocristal type (B) solubilisé dans le PBS [Bruchez et coll., 1998].

Ces différentes caractéristiques rendent le champ d'application des Qds très étendu dans le domaine biologique, la fluorescence constituant un outil largement utilisé.

### I.2.3. Applications

Les Qds tirent leur avantage par rapport aux colorants organiques traditionnels de l'effet de confinement quantique, leur donnant des propriétés optiques et électroniques uniques. C'est pourquoi les études actuelles portent sur la construction de nouvelles sondes fluorescentes utilisant les Qds comme marqueurs fluorescents dans le

but de réaliser des marquages plus sensibles (pour détecter des quantités moindres de cibles comme des protéines, l'ADN) et plus stables dans le temps (pour réaliser des suivis de marquage *in vivo*). Les développements s'attachent aussi à supprimer les problèmes de chevauchement des émissions de fluorescence qui peuvent survenir lors des marquages multiple.

#### I.2.3.1. Premières applications en biologie

C'est en 1998 que deux équipes publièrent les premiers résultats de marquage biologique au moyen des Qds, prouvant l'intérêt de leur utilisation.

Tout d'abord, un marquage de fibroblastes de souris 3T3 fût réalisé via l'emploi de 2 Qds CdSe/ZnS de taille différente rendus solubles par silanisation. L'un, de fluorescence verte, marquait le noyau des cellules et l'autre, de fluorescence rouge, était couplé à de la biotine pour la détection de l'actine F, après incubation des cellules avec un conjugué phalloïdine-biotine puis avec de la streptavidine [Bruchez et coll., 1998]. Cette étude montra également que le photoblanchiment s'avérait très faible par rapport aux molécules fluorescentes conventionnelles.

Par la suite, une autre étude montra que le marquage de la transferrine avec les Qds ne perturbait pas l'endocytose de celle-ci dans les cellules HeLa. De plus, il fut également montré que des bioconjugués Qds-IgG étaient à même de reconnaître des antigènes [Warren et coll., 1998]. L'observation en temps réel d'interactions ligand-récepteur et du trafic moléculaire dans les cellules vivantes fût alors envisageable.

Au vu de ces deux études, les conclusions furent claires quand au potentiel qu'apportent les Qds en biologie, notamment dans les possibilités de détection de biomolécules à l'état unique, mais aussi dans les marquages multiples.

### I.2.3.2. Quantum dots et reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire tient au fait que certaines molécules biologiques peuvent reconnaître et se lier à d'autres molécules avec une très grande sélectivité et spécificité.

Deux classes de molécules biologiques sont d'un grand intérêt pour la reconnaissance moléculaire : les anticorps (ACs) pouvant reconnaître des antigènes et les oligonucléotides pouvant s'hybrider à leur séquence complémentaire. De plus, le système avidine(streptavidine)-biotine est souvent utilisé en raison de la très grande affinité de la streptavidine pour la biotine. Ainsi, des sondes fluorescentes d'applications diverses peuvent être obtenues par couplage d'ACs, d'oligonucléotides ou de streptavidine à la surface des Qds. Beaucoup de travaux se sont attachés à réaliser et optimiser ce type de marquage biologique.

Il a ainsi été possible de détecter le marqueur Her2 du cancer du sein à la surface de cellules cancéreuses fixées, de mettre en évidence les filaments d'actine et les microtubules de ces cellules mais aussi de détecter des antigènes nucléaires. Tous ces marquages utilisant des bioconjugués Qd-AC ou Qd-streptavidine se sont avérés spécifiques, très brillants et considérablement plus photostables que les colorants organiques [Wu et coll., 2003].

Les Qds ont également montré leur efficacité dans la détection d'anomalies ou de mutations chromosomiques par la technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Dans une étude de Pathak, une séquence répétée localisée au niveau du chromosome Y a pu être mise en évidence par FISH sur des cellules de sperme humain en utilisant un bioconjugué Qd-oligonucléotide, pour une très faible aspécificité [Pathak et coll., 2000]. Des SNPs (Single Nucléotide Polymorphisms) ont également pu être détectées par le système Qbead, consistant à introduire dans des microsphères couplées à des oligonucléotides des Qds possédant des couleurs d'émission différentes pour obtenir des signatures spectrales uniques [Xu et coll., 2003].

#### I.2.3.3. Quantum dots et marquage *in vivo*

Le suivi des interactions entre différentes protéines ou entre les cellules d'un organisme est une étape clé pour comprendre la complexité et la dynamique des interactions biologiques. Les applications utilisant les fluorophores organiques dans les cellules vivantes sont sujettes à certaines limitations dues notamment au photoblanchiment. Les Qds apparaissent aujourd'hui comme une alternative prometteuse aux fluorophores. Une étude a montré qu'il était possible de marquer des cellules HeLa sur une longue période (de l'ordre de 12 jours) sans avoir d'effets délétères et sans perturber la croissance cellulaire [Jaiswal et coll., 2003]. Différents outils ont été mis au point comme des Qds encapsulés dans des micelles pour le marquage d'embryons de *Xenopus* au stade blastomère, dans le but de suivre les premières étapes des lignées cellulaires. Ces nano-outils se sont avérés biologiquement neutres (pas d'activité biologique ni de toxicité) et stables [Dubertret et coll., 2002].

#### I.2.3.4. La phagocinétique

Les cellules exposées à des nanocristaux CdSe/ZnS silanisés sont capables de les incorporer. Ce phénomène dont le mécanisme reste à élucider n'a qu'un faible impact sur les cellules [Parak et coll., 2002] et rend possible certaines techniques comme la phagocinétique : une surface est recouverte d'une couche de Qds silanisés de fluorescence rouge, puis des cellules sont déposées sur cette couche. La progression des cellules sur la surface peut ainsi être suivie, du fait de l'incorporation des Qds par les cellules au fur et à mesure de leur migration. Aucune fluorescence n'est alors détectable sur le trajet des cellules. Ce procédé est amené à être utilisé pour différencier les cellules cancéreuses des cellules non cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses incorporent les Qds de façon plus rapide et migrent plus vite que les cellules saines. L'étude de cette caractéristique est envisagée dans l'évaluation du potentiel métastatique des cellules cancéreuses [Parak et coll., 2002].

### *Rappels bibliographiques*

La détection d'échantillons biologiques à de très faibles quantités est un challenge important pour le diagnostic clinique et la détection biologique. Les Qds montrent leur pleine potentialité dans la réalisation de sondes moléculaires plus sensibles et plus stables que celles existant aujourd'hui. Ceci tient aux propriétés exceptionnelles des Qds mais aussi du point de vue de la conjugaison avec des biomolécules. En effet, tandis que les fluorophores organiques demandent une chimie de surface « personnalisée » pour la conjugaison aux biomolécules, une approche universelle peut être utilisée pour conjuguer les biomolécules aux Qds.

Les recherches actuelles tendent à optimiser les techniques de synthèse, de solubilisation et de conjugaison des Qds aux biomolécules tout en veillant à leur biocompatibilité, critère inévitable pour leur utilisation en biologie.

## **II. Matériels**

## **et Méthodes**

## II.1. Dosage de l'ADN topoisomérase I humaine dans quatre lignées cellulaires issues de tumeurs solides après traitement au topotécan

### II.1.1. Cultures cellulaires

#### II.1.1.1. Les lignées cellulaires

Quatre lignées cellulaires (ATCC) de tumeurs solides ont été utilisées afin de doser topoI par Western-blot. Ces quatre lignées cellulaires sont adhérentes en culture *in vitro* et présentent une morphologie de type épithélial.

La lignée A549 est issue d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules d'un homme de 58 ans. Les cellules de cette lignée hypotriploïde peuvent synthétiser la lécithine avec un grand pourcentage d'acides gras insaturés en utilisant la voie de la cytidine diphosphocholine.

La Lignée CaOV-3 est issue d'un adénocarcinome ovarien d'une femme de 54 ans.

La lignée HT29 est issue d'un adénocarcinome colorectal d'une femme de 44 ans. Elle présente des caractéristiques ultrastructurales comme des microvillosités, des microfilaments, un reticulum endoplasmique lisse et rugueux. Ces cellules expriment les récepteurs à l'urokinase.

La lignée MCF7 est issue d'un adénocarcinome mammaire d'une femme de 69 ans. Cette lignée a gardé quelques caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié comme par exemple la capacité d'exprimer des récepteurs aux oestrogènes.

#### II.1.1.2. Conditions de culture

Les différentes lignées cellulaires sont cultivées en flasques (Nunc™) dans un milieu RPMI 1640 + Glutamax I™ (GibcoBRL) avec ajout de 10% de sérum de veau foetal (GibcoBRL). Ce sérum est préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes afin d'éliminer les facteurs du complément. Le milieu est renouvelé deux fois par semaine. A 80% de confluence, les cellules sont repiquées après utilisation de la trypsine (GibcoBRL) afin de les détacher de leur support plastique. Les flasques sont maintenues dans une étuve à 37°C, sous une atmosphère humide saturée en CO<sub>2</sub> à 5%.

En vue du traitement par le topotécan, les cellules sont repiquées dans des boîtes de Petri de 100 mm de diamètre (Nunc™). Sept boîtes par lignée cellulaire sont préparées, à raison de  $0,5 \times 10^6$  cellules par mL pour un volume total de 3 mL par boîte de Petri.

Le topotécan utilisé dans cette étude est l'Hycamtin® (SmithKline Beecham). Il est préparé dans l'éthanol afin d'obtenir une solution stock à  $10^{-2}$  M et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cette solution est par la suite diluée dans de l'eau déionisée pour préparer extemporanément les concentrations désirées.

### II.1.2. Etude de cytotoxicité

Une étude de cytotoxicité a été réalisée pour chaque lignée cellulaire. Le topotécan a été testé dans une gamme croissante de neuf concentrations ( $5 \times 10^{-9}$  M à  $10^{-5}$  M) qui ont permis de déterminer un pourcentage d'inhibition de croissance de 50%, par rapport à la croissance d'une population cellulaire témoin.

Les cellules ont été déposées dans les puits d'une plaque 96 puits (Nunc™). Chaque puits contient  $5 \times 10^3$  cellules pour un volume de 100  $\mu\text{L}$  à  $J_1$ . A  $J_0$ , les différentes concentrations de médicament ont été ajoutées. Après 72h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  en présence ou non d'inhibiteurs, 20  $\mu\text{L}$  de MTT (Sigma) à 2,5 mg/mL ont été ajoutés dans chaque puits. Le MTT (3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide ; Thiazolyl blue) est un sel de tetrazolium soluble de couleur jaune qui peut être converti en un précipité pourpre de formazan insoluble [Marks et coll., 1992]. Cette conversion est effectuée par la déshydrogénase mitochondriale.

Au bout de trois heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , le milieu de chaque puits a été aspiré (les cellules vivantes étant adhérentes au fond du puits). Puis, les cristaux de formazan ont été dissous dans 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. Pour chaque puits, la mesure de la densité optique a été réalisée à 495 nm par un lecteur automatique série 750 microplate reader (Cambridge Technology). Le pourcentage de viabilité cellulaire pour chaque puits a été déterminé par rapport à un témoin. Une courbe de cytotoxicité a été alors

établie afin de déterminer la concentration de médicament pour laquelle une inhibition de croissance de 50% est observée. Cette concentration est appelée IC<sub>50</sub>.

#### II.1.3. Traitement des cellules par le topotécan

Les lignées cellulaires ont été traitées en phase exponentielle avec deux concentrations de topotécan correspondant à 10x et 100x la valeur de l'IC<sub>50</sub> de chaque lignée cellulaire. Il est à noter que pour chaque type cellulaire, un contrôle a été réalisé où les cellules ne sont pas traitées par le topotécan.

Après une heure de traitement, le milieu de culture de chaque boîte de Petri a été changé. Les boîtes ont alors été remises à incubation à 37°C suivant différents temps : 0h, 1h, 6h. Puis commence l'extraction nucléaire.

#### II.1.4. Préparation des extraits nucléaires

Pour l'extraction nucléaire, un nombre équivalent de cellules a été utilisé pour chaque lignée cellulaire. L'extraction a été réalisée sur de la glace pour inhiber les protéases endogènes, et suivant les recommandations du protocole TopoGEN. Chaque boîte de Petri a été rincée deux fois dans du tampon TD (100 mM NaCl, 20 mM KCl, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM Tris), 4 mL de tampon TD ont été ajoutés et le fond de la boîte a été gratté pour recueillir les cellules, puis le tout a été récupéré dans un tube. Deux lavages ont été effectués dans 4 mL de tampon TD par centrifugation à 1500 trs/min pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été repris dans 2 mL de tampon A (100 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM PMSF, 10% glycérol, 0.2% NP-40, 0.1% triton-X 100) + anti-protéases (Boehringer Mannheim) et laissé dans la glace pendant 10 minutes, dans le but de lyser les membranes plasmiques des cellules. Puis, une nouvelle centrifugation à 1500 trs/min pendant 10 minutes a été effectuée, à la suite de laquelle le culot a été repris dans 200 µL de tampon A + anti-protéases. Les extraits nucléaires ont été conservés à -80°C.

### II.1.5. Western-blot et analyse semi-quantitative

Les échantillons ont été préparés pour l'électrophorèse. Chaque extrait nucléaire a été traité par 0.1% de SDS. Le SDS permet de se placer en conditions dénaturantes ; les protéines ne migrent alors pas selon leur charge mais selon leur poids moléculaire. Puis, du tampon d'échantillon a été ajouté. Ce tampon contient du sucrose pour alourdir l'échantillon et du bleu de bromophénol afin de pouvoir suivre le front de migration. Les échantillons ont été soniqués quelques secondes afin de fragmenter l'ADN et chauffés pendant 2 min à 96°C dans le but de dénaturer les protéines.

L'électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration (2.5 mL tampon de concentration 4x (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS), 6.6 mL H<sub>2</sub>O, 0.8 mL acrylamide 40%, 100 µL APS, 10 µL temed) et d'un gel de résolution 8% (2.5 mL tampon de résolution 8x (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS), 5.4 mL H<sub>2</sub>O, 2 mL acrylamide 40%, 50 µL APS 10%, 10 µL temed).

Les dépôts se présentent de la façon suivante :

- ✘ 20 µL de chaque échantillon d'extraits nucléaires.
- ✘ 20 µL de tampon d'échantillon contenant 0,5 µg de topoI-68 kDa comme témoin.
- ✘ 20 µL de marqueur de taille (Sigma).

Il est à noter que la forme topoI-68 kDa est le produit de protéolyse de la partie N-terminale de la forme native de 100 kDa. Elle présente une plus grande stabilité que la forme native et possède la même activité et la même spécificité de séquence que la forme topoI-100 kDa.

La migration a été faite à 30 V pendant les 30 premières minutes puis à 60 V pendant 1h30 dans un tampon de migration (25 mM tris base, 0.192 mM glycine, 0.1% SDS).

A la suite de l'électrophorèse, un transfert sur feuille de nitrocellulose (Amersham Pharmacia Biotech) dans un tampon de transfert (10 mM CAPS pH 11 (Sigma)) a été réalisé. Ce transfert a été effectué en chambre froide à 35 V, 90 mA pendant 14h, sous agitation et en présence de glace. Puis, les membranes ont été

récupérées et plongées dans du Rouge Ponceau (0.3% Ponceau S, 1% acide acétique) pour vérifier le bon déroulement du transfert. Après rinçage à l'eau distillée, les membranes ont été saturées dans du lait écrémé en poudre (Merck) à 5%, la dilution se faisant dans du TBST (0.5% NaCl, 0.1% tween 20, 10 mM Tris-HCl pH7). La saturation a lieu durant 2h sous agitation. A la suite de cette étape, l'anticorps monoclonal de souris anti-topoI (Dr Igor Bronstein, Département de chimie, Université de York, Grande-Bretagne) dilué au 1/250<sup>e</sup> dans du TBST a été ajouté et les membranes placées sous agitation pendant 1h30. Trois lavages successifs dans du TBST ont été effectués pendant 10 minutes, puis l'anticorps secondaire polyclonal de mouton anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort (Amersham Life Science) dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du TBST a été mis à incuber pendant 1h30 sous agitation. Trois lavages de 10 minutes dans du TBST ont été effectués. Ensuite, la révélation a été réalisée avec le kit ECL<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech). Ce kit contient un peracide qui, par réaction avec la peroxydase de raifort, donne du luminol. Par oxydation, le luminol émet de la lumière. Cette réaction de chemiluminescence permet ainsi d'impressionner du papier X-OMAT<sup>TM</sup> (Kodak) pour obtenir des images de Western-blot.

A partir des images obtenues, une analyse densitométrique a été réalisée grâce au logiciel Bio1D (Vilbert Lourmat). Les résultats ont été exprimés en fonction d'un contrôle correspondant au taux de topoI détecté dans les cellules non traitées par le topotécan. Des courbes ont alors été établies, montrant l'évolution au cours du temps des différentes formes de topoI.

#### II.1.6. Test d'activité par relaxation de plasmides

L'activité des extraits nucléaires a été testée sur des plasmides pGEM<sup>®</sup> surenroulés. Ces derniers ont été obtenus par transformation de bactéries JM109 par le vecteur pGEM<sup>®</sup> [Méthode Inoue et coll., 1990]. Après multiplication des bactéries, une purification des plasmides a été réalisée par utilisation du kit « Wizard plus Minipreps » (Promega) et leur surenroulement a été vérifié sur gel d'agarose 0.7% avec emploi de TAE (0.04 M Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8.3).

Chaque extrait nucléaire est testé dans du tampon TEMG (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5% glycérol, 0.5 M EDTA, 0.3 mM 2-mercaptoethanol). Les plasmides surenroulés ont été ajoutés. La réaction a été arrêtée après 30 minutes par ajout d'un tampon composé de 1% SDS, 0.04% Bleu de bromophénol, 0.04% Xylène cyanol et 3% de Ficoll. Puis, les échantillons sont analysés sur gel d'agarose 0.8% dans du tampon TAE. Suite à la migration à 40 V, 40 mA pendant 1h30, le gel d'électrophorèse a été mis à incuber 20 minutes en présence d'une solution de bromure d'éthidium (BET) à 1 µg/mL, puis rincé et lavé abondamment. La révélation s'est effectuée sous lampe UV.

## **II.2. Détermination des constantes d'affinité de l'ADN topoisomérase I par résonance plasmonique de surface**

### **II.2.1. La technologie BIAcore®**

L'analyse d'interactions biomoléculaires (BIA) utilise la technologie de résonance plasmonique de surface couplée à un système microfluidique permettant de suivre en temps réel les interactions entre des partenaires moléculaires. Cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter l'emploi de marqueurs ni même de réaliser une purification préalable des molécules.

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie réfractée à travers la surface.

Selon l'angle d'incidence du faisceau, toute la lumière peut être réfléchi. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. La zone balayée par l'onde est appelée champ évanescent (Figure 16).

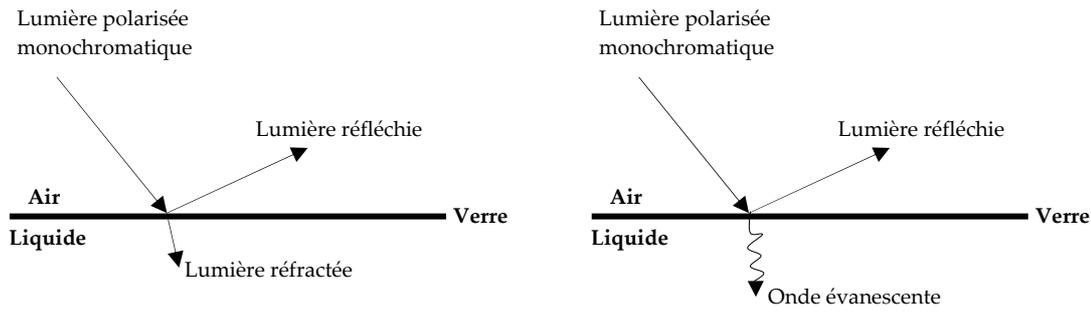
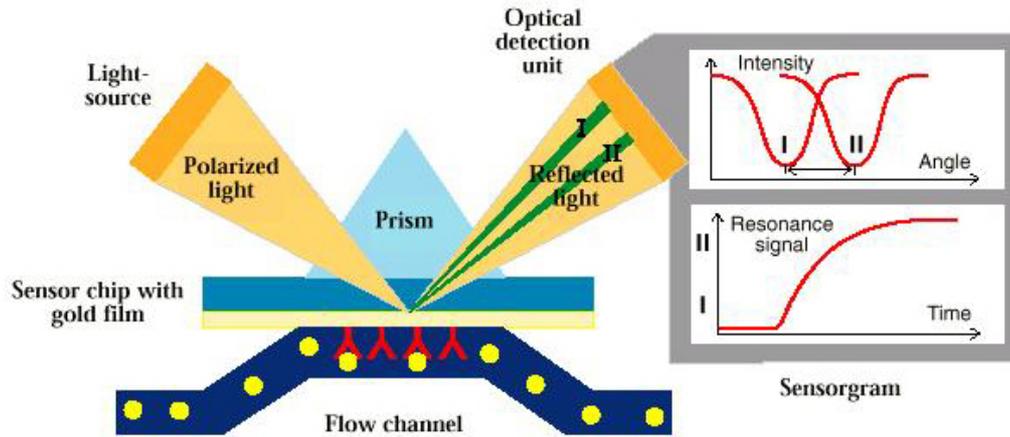


Figure 16. Principe de la résonance plasmonique de surface.

Si une couche fine de métal, riche en électrons libres, est déposée à l'interface, ceux-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident (phénomène de résonance plasmonique de surface). Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé avec une barrette de diodes, présente une chute d'intensité à un angle défini (angle de résonance). Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Le système de détection optique des appareils BIAcore® est calibré pour que le faisceau rencontre l'interface biospécifique dans ces conditions dites de réflexion interne totale ( $\lambda=760\text{nm}$ ). Le BIAcore® a pour fonction de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées dans un débit continu de tampon. Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur une interface appelée « sensor chip » (biocapteur). Les biocapteurs les plus fréquemment utilisés sont constitués d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or et d'un hydrogel réticulé de dextran carboxyméthylé. Sur ces surfaces seront immobilisés de façon covalente des ligands hydrosolubles dans un milieu hydrophile. Les autres partenaires, les analytes, sont injectés à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance (Figure 17).



**Figure 17.** La technologie BIAcore®. Les changements de masse à la surface de la « sensor chip » sont détectés via le décalage de la position de l'angle de résonance, créant une perturbation dans le signal de résonance détecté.

L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de 0.1 degré, ainsi qu'à une fixation de 1 ng de protéine par mm<sup>2</sup> de surface. L'enregistrement de ce signal s'appelle un sensorgramme.

Pour notre étude, le BIAcore® X (Biacore AB, Uppsala, Suède) a été utilisé pour les mesures d'interactions réalisées à 25°C.

## II.2.2. Manipulation

### II.2.2.1. Les médicaments et l'ADN topoisomérase I

CPT et TPT ont été préparés comme solutions stocks à des concentrations de 10<sup>-2</sup> M dans du DMSO, puis dilués à une concentration de 10 µM pour CPT et à des concentrations variant de 0.05 à 10 µM pour TPT.

FGR et ETX ont été préparées comme solutions stocks à des concentrations de 10<sup>-2</sup> M dans le méthanol, puis diluées à des concentrations variant de 0.001 µM à 100 µM pour leur utilisation.

TopoI 68 kDa a été utilisée, à 5 concentrations différentes, de 800 à 50 nM. Son activité dans le tampon de course utilisé a été préalablement vérifiée par des expériences de relaxation de plasmides.

#### II.2.2.2. Fixation des oligonucléotides sur la puce « sensor chip »

Deux types d'oligonucléotides double brin synthétiques (Eurogentec) ont été utilisés lors de cette étude : l'un montrant un site à forte affinité pour topoI et l'autre un site CPT-dépendant. Leur séquence respective est montrée figure 18. Chaque oligonucléotide est composé de 21 paires de base et biotinylé à l'une de ses extrémités 5'.

Oligonucléotide avec site CPT-dépendant

B- G C G C G G A A T G G T | G C A T G A A A A  
C G C G C C T T A C C A C G T A C T T T T

Oligonucléotide avec site à forte affinité pour topoI

B- C G C A A A A G A C T T | A G A A A A A A A  
G C G T T T T C T G A A T C T T T T T T

**Figure 18.** Séquence des oligonucléotides utilisés. Le trait bleu figure le site de clivage de topoI.

Une quantité correspondant à 0.5 ng d'oligonucléotide a été fixée (400-500 RU) sur une puce CM5 (polymère de dextran carboxyméthylé) obtenue chez Pharmacia & Upjohn, via une fixation préalable de streptavidine (Pierce) sur la puce, suivant le protocole BIAcore®. Toutes les solutions tampons utilisées ont été filtrées et dégazées avant utilisation.

Les deux canaux d'une puce CM5 ont donc été activés par un mélange de 0.2 M d'EDC (N-éthyl-N'(diméthylaminopropyl)-carbodiimide) et 50 mM de NHS (N-hydroxysuccinamide). Puis, la streptavidine (préparée dans l'acétate de sodium pH 6.0 à une concentration de 400 µg/mL) a été injectée. Celle-ci réagit spontanément avec la surface de la puce activée pour s'y fixer. Après cette étape, 4000 RU sont ajoutés aux lignes de base des deux canaux. Enfin, une injection d'éthanolamine 1 M pH 8.0 a été

effectuée dans le but de désactiver la surface. Toutes les injections sont réalisées à 5 $\mu$ L/min pendant 7 minutes.

Puis, l'ADN biotinylé est injecté sur un seul des deux canaux dans le but d'obtenir une fixation de l'ordre de 0.5 ng (correspondant à une augmentation du signal de 500 RU). Le deuxième canal n'ayant pas reçu d'oligonucléotide sert alors de référence pour détecter une interaction non spécifique de topoI et/ou des drogues avec la surface streptavidinée de la puce.

### II.2.3. Mesures : génération des sensorgrammes

Chaque mesure a été réalisée en triplicette et ce, pour 5 concentrations différentes de topoI, allant de 50 à 800 nM.

#### II.2.3.1. Complexe binaire

Un tampon de course HBS-EP pH 7.4 (0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, 0.01 M HEPES) supplémenté par 10 mM MgCl<sub>2</sub> a été appliqué sur les 2 canaux de façon permanente, avant et après l'injection de topoI. Un cycle de mesure comprend 4 étapes :

- ✗ attente de stabilisation de la ligne de base.
- ✗ injection de top1 à la vitesse de 30  $\mu$ L/min pendant 50 s.
- ✗ Etape de dissociation (150 s).
- ✗ Etape de régénération de la ligne de base par injection de 0.5M NaCl pendant 50 s.

#### II.2.3.2. Complexe ternaire

L'étude du complexe ternaire s'appuie sur le même protocole que précédemment. La différence réside en la présence d'inhibiteur dans le tampon de course, mais aussi dans l'échantillon de topoI injecté.

Une concentration de 10  $\mu$ M a été utilisée pour CPT et des concentrations variant de 0.05 à 10  $\mu$ M pour TPT.

Des concentrations variant de 0.001  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$  ont été utilisées pour FGR et ETX.

#### II.2.4. Interprétation des résultats

Chaque mesure a donné naissance à un sensorgramme, résultat de la soustraction entre le canal où est fixé l'oligonucléotide et le canal référence uniquement streptavidiné.

L'analyse des données a été réalisée par le logiciel BIAeval® en utilisant le modèle analyte bivalent. Les données de dissociation ont été traitées sur une période de 100 s située 100 s après l'injection de topol.

### **II.3. Nanobiotechnologies**

#### II.3.1. Synthèse des nanocristaux fluorescents semi-conducteurs

##### II.3.1.1. Synthèse des quantum dots CdSe/ZnS

Les NCs CdSe/ZnS ont été synthétisés en adaptant le protocole de Hines et Guyot-Sionnest [1996]. Cette méthode a permis la synthèse de NCs homogènes émettant une fluorescence entre 500 et 620 nm, ceci dépendant de leur diamètre.

Une quantité appropriée de trioctylphosphine oxide ou TOPO (Aldrich) a été chauffée à 180 °C sous argon, séchée puis dégazée sous vide à la même température. TOPO a ensuite été chauffé à 340 °C sous un flux d'argon et sous agitation intensive. Des solutions de précurseurs de diméthylcadmium (Strem, Bischheim, France) et de selenium (Poudre élémentaire ; Aldrich) préparées dans le trioctylphosphine (Fluka) ont été injectées en moins d'une seconde. La solution a été refroidie à 300°C puis une solution de diméthylzinc (Aldrich) 1M préparée dans l'heptane et une solution d'hexaméthylsilthiane (Fluka) ont été ajoutées sous agitation vigoureuse.

La solution a été refroidie à 50°C et les NCs ont été précipités par ajout de méthanol anhydre suivi d'une centrifugation à 14000 trs/min. Le précipité a ensuite été lavé dans le méthanol puis séché.

Les Qds obtenus montrent une grande homogénéité (variation de moins de 5%) et un rendement quantique de photoluminescence de près de 60% dans le chloroforme.

#### II.3.1.2. Synthèse des quantum dots ZnCdSe/ZnS

Ces nanocristaux possèdent les mêmes caractéristiques et sont soumis aux mêmes modes de solubilisation et d'utilisation que les Qds CdSe/ZnS.

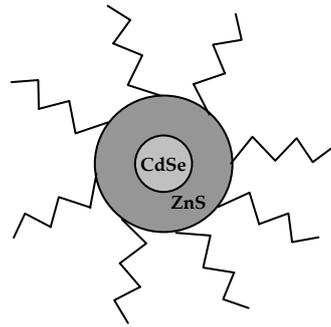
Leur synthèse débute par la synthèse de NCs ZnSe de 8 nm selon le protocole de Hines [Hines et coll., 1998]. Après addition d'une quantité appropriée d'un mélange de trioctylphosphine oxide/hexadecylamine, une solution de cadmium acétate préparée dans du trioctylphosphine est ajoutée sous agitation intensive, à une température située entre 250-290°C. La position spectrale de la bande de photoluminescence est contrôlée par la quantité de précurseur de cadmium ajoutée. Elle peut varier de 420 à 560-580 nm.

Puis, la couche ZnS est ajoutée au cœur ZnCdSe par addition à 200 °C d'une quantité appropriée d'une solution de diethylzinc et d'hexamethyldisilthiane préparée dans le trioctylphosphine.

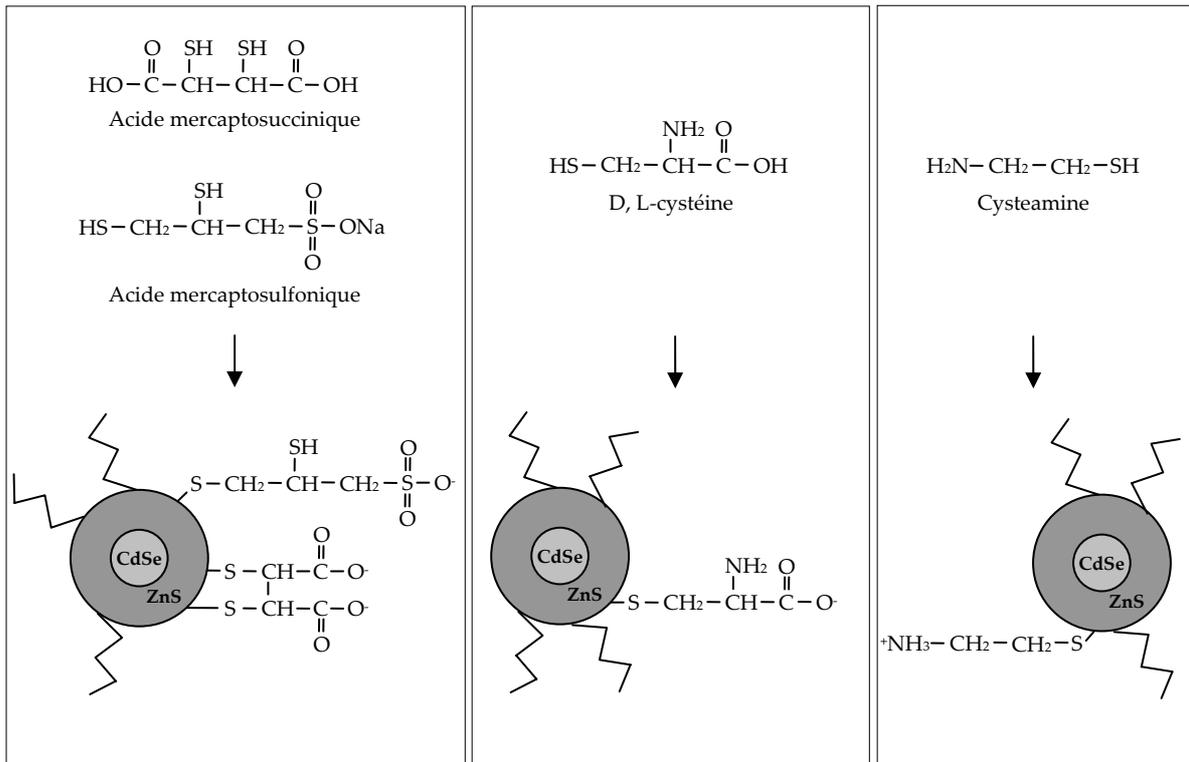
Les Qds ZnCdSe/ZnS sont alors isolés par précipitation avec du méthanol, puis lavés à deux reprises avec du méthanol et enfin séchés.

#### II.3.2. Techniques de solubilisation

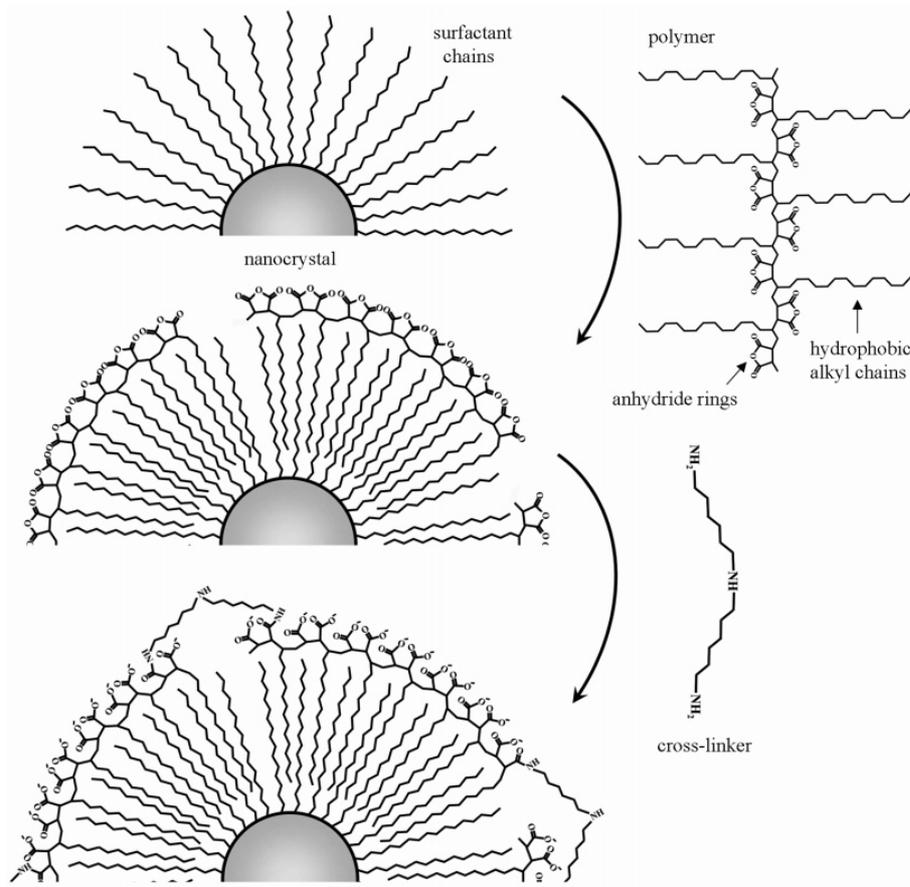
Insolubles dans l'eau à l'état organique, les Qds ont été rendus solubles en milieu aqueux pour permettre leur utilisation. De nombreuses techniques de solubilisation ont été mises au point, dont les solubilisations par le mélange acide mercaptosuccinique/acide mercaptosulfonique, par la D-L cystéine ou encore la cysteamine. La solubilisation des Qds par ajout d'une couche de polymère amphiphile selon le protocole de Parak [Pellegrino et coll., 2004] a été également utilisée. Les figures 19 et 20 donnent une vue d'ensemble de ces différentes solubilisations.



Quantum dot CdSe  
couvert de TOPO



**Figure 19.** Solubilisation des Quantum dots. La solubilisation par le mélange acide mercaptosuccinique/acide mercaptosulfonique et par la D,L-cystéine apporte des charges négatives, tandis que la solubilisation par la cysteamine apporte des charges positives.



**Figure 20.** Principe de la solubilisation par les polymères [Pellegrino et coll., 2004].

### II.3.2.1. Apport de charges négatives

#### II.3.2.1.1. Solubilisation par les acides

25 mg de Qds organiques ont été solubilisés dans du chloroforme, re-précipités dans du méthanol, ceci deux fois, dans le but d'éliminer le maximum de TOPO résidant à la surface des Qds. Le précipité a été redissout dans 1 mL de chloroforme puis 1 mL d'acide mercaptoacétique glacial (Sigma) a été ajouté jusqu'à l'agrégation des Qds. Après 10 minutes, une centrifugation à 4000 trs/min pendant 5 minutes a été réalisée. Le surnageant a été éliminé puis 2 mL de PBS pH 7.4 ont été ajoutés. A ce stade, la solution obtenue est trouble. Une solution de NaOH 1 M a été ajoutée jusqu'à ce que la solution de Qds devienne claire. Puis, un volume de 50% (v/v) d'acétone a été ajouté pour re-précipiter les Qds et une nouvelle centrifugation à 4000 trs/min pendant 5 minutes réalisée. Le précipité de Qds a alors été repris dans 2 mL de PBS puis un mélange d'acide meso-2,3-dimercapto-succinique (DMSA) /acide 2,3-

dimercapto-1-propane-sulfonique (DMPS) avec un ratio de 3:1 a été ajouté (la concentration finale de DMSA voulue étant de  $1 \times 10^{-3}$  M). La solution a ensuite été mise à incuber dans le noir à température ambiante pendant une nuit.

Le lendemain, 50% (v/v) d'acétone a été ajouté pour précipiter les Qds et une centrifugation à 14000 trs/min pendant 10 minutes a été effectuée. Le précipité a alors été récupéré et concentré par Concentrator 5301 (Eppendorf). La poudre de Qds obtenue a été stockée à 4°C jusqu'à sa dilution dans l'eau à la concentration désirée pour les besoins des manipulations.

#### II.3.2.1.2. Solubilisation par la D,L-cystéine

25 mg de Qds organiques ont été dissous dans le chloroforme, puis précipités avec du méthanol, ceci deux fois. Le précipité obtenu suite à ces lavages a été redissous dans 1 mL de chloroforme. En parallèle, une solution de D,L-cystéine (Aldrich) à 10 mg/mL a été préparée dans le méthanol ; 200  $\mu$ L de cette solution ont été ajoutés à la solution de Qds puis une centrifugation a été effectuée à 14000 trs/min pendant 10 minutes. Le précipité a été lavé 3 fois dans le méthanol, repris dans de l'eau puis soniqué. Enfin, 15  $\mu$ L de NaOH ont été ajoutés.

#### II.3.2.1.3. Solubilisation par les polymères

5 mg de Qds organiques ont été dissous dans le chloroforme et reprécipités par un ajout de méthanol. Après centrifugation, le culot a été repris dans 500  $\mu$ L de chloroforme. Parallèlement, une solution de poly(maleic anhydride alt-1-tetradecene) 0.136 M a été préparée dans le chloroforme puis ajoutée à la solution de Qds. Après agitation pendant 2 heures à température ambiante, le solvant a été évaporé. Une solution de bis(6-aminohexyl)amine préparée dans le chloroforme à 0.02 M a été ajoutée. Après une sonication de 20 minutes, le solvant a de nouveau été évaporé. La poudre obtenue a finalement été reprise dans un tampon phosphate 0.5 M pH 6.8.

La solution de Qds a ensuite été purifiée par colonne de filtration sur gel (Sephadex G-100, Sigma).

#### II.3.2.2. Apport de charges positives

Les Qds peuvent être rendus positifs par une solubilisation par la cysteamine (Sigma). Le protocole de solubilisation est le même que celui de la solubilisation par la D,L-cystéine présenté ci-dessus. La différence est qu'ici, la cysteamine a été utilisée à 10 mg/mL en lieu et place de la D,L-cystéine et qu'il n'y a pas eu de rajout de NaOH en fin de solubilisation.

Toutes les solutions de Qds obtenues ont été caractérisées par absorbance et fluorescence pour déterminer leur concentration et leur longueur d'onde d'émission de fluorescence.

### II.3.3. Prise des spectres d'absorption et de fluorescence

#### II.3.3.1. Principe de la spectroscopie UV/visible

Un spectre d'absorbance résulte de l'absorption de radiations UV ou visibles par une molécule. Dans les régions UV et visible, les longueurs d'onde correspondent à des différences d'énergie  $\Delta E = E_1 - E_0$  ( $\Delta E = hc/\lambda$  avec  $h$ , constante de Planck ;  $c$ , vitesse de la lumière et  $\lambda$ , longueur d'onde de la radiation) qui affectent le domaine des transitions électroniques, soit le passage d'une orbitale d'énergie  $E_0$  à une orbitale d'énergie  $E_1$  plus élevée (Figure 21).

La spectroscopie d'absorption UV/vis permet notamment de réaliser des études quantitatives en utilisant la loi de Beer-Lambert comme suit :

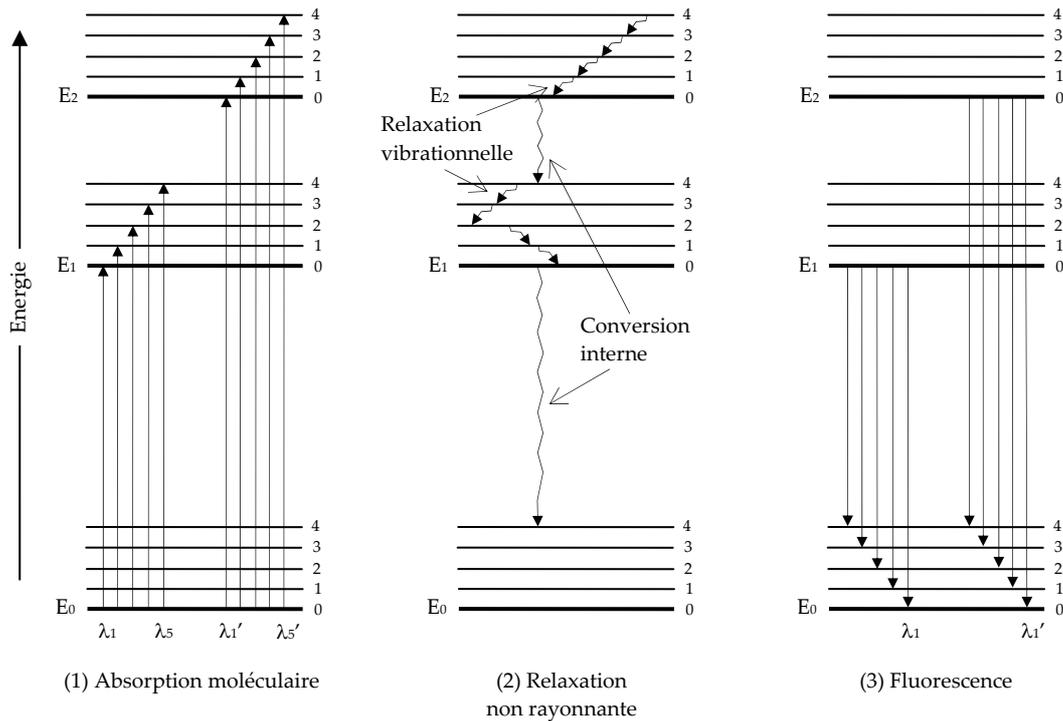
Si  $I_0$  est l'intensité du rayon lumineux à l'entrée de la solution

$$\text{et } I \text{ son intensité à la sortie, } D.O. = \log (I_0/I) = \epsilon l C,$$

avec D.O., densité optique ;  $I_0$ , intensité lumineuse incidente ;  $I$ , intensité lumineuse transmise ;  $\epsilon$ , coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée ;  $l$ , épaisseur traversée et  $C$ , concentration.

Cette technique est facile à utiliser, possède un vaste champ d'application et fournit une bonne exactitude dans les résultats (les erreurs relatives sur la concentration sont de l'ordre de 1-5%).

Un spectrophotomètre Beckman Coulter DU 640 a été utilisé pour toutes les mesures d'absorbance avec des cuves de trajet optique 1 cm.



**Figure 21.** Diagramme des niveaux énergétiques montrant les variations d'énergie qui se produisent lors de l'absorption (1), la relaxation non rayonnante (2) et la fluorescence (3) d'une espèce moléculaire.

### II.3.3.2. Principe de la fluorimétrie

La luminescence est la propriété que possèdent certaines substances à restituer sous forme de photons d'énergie  $\Delta E = hc/\lambda$  une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation. C'est la désactivation d'une molécule excitée vers un état énergétique moins élevé (Figure 21). En terme de luminescence, il est fait une distinction entre fluorescence et phosphorescence. Si le délai de temps entre l'irradiation de la molécule et son émission est inférieur à  $10^{-8}$  s, il est fait référence à de la fluorescence.

La puissance rayonnée par fluorescence est mesurée généralement à 90° du faisceau incident de longueur d'onde  $\lambda_{exc}$ . Quand  $\lambda_{exc}$  varie, un spectre d'excitation est enregistré, représentant la fonction de  $\lambda_{exc}$ . Si  $\lambda_{exc}$  est fixée et si  $\lambda_{em}$  varie, un spectre d'émission est enregistré.

La fluorimétrie est  $10^3$  fois plus sensible que l'absorption. Elle permet la détection simultanée de composés fluorescents à des concentrations faibles et de manière sélective. Tout comme le spectre d'absorbance, le spectre de fluorescence d'un composé lui est tout à fait caractéristique. Il est ainsi possible de réaliser des études qualitatives du fait que les longueurs d'onde d'émission sont caractéristiques des substances étudiées mais aussi des analyses quantitatives car, dans certaines conditions, l'intensité lumineuse est proportionnelle à la concentration.

Dans nos études, les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un spectrofluorimètre Perkin Elmer LS 50 B.

## II.3.4. Le FRET

### II.3.4.1. Définition

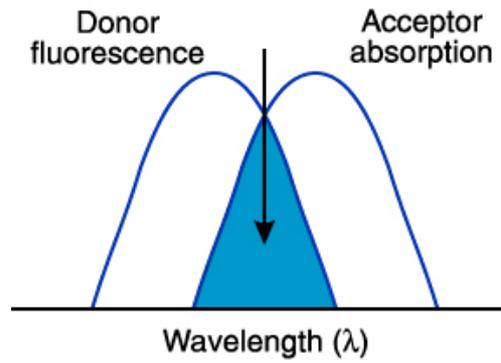
Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un processus de transfert d'énergie d'une molécule fluorescente appelée « donneur » vers une autre molécule fluorescente appelée « accepteur ».

L'énergie électronique d'une excitation peut être transférée sur des distances de l'ordre de 30 Angströms. Ainsi, si un donneur est excité par une lumière incidente et si un accepteur est à proximité, l'énergie de l'état excité du donneur peut être transféré. Ceci conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence et de la demi-vie de l'état excité du donneur et à une augmentation de l'intensité d'émission de l'accepteur. En 1948, Förster a montré que le transfert se produit par une interaction de résonance dipole-dipole entre les chromophores du donneur et de l'accepteur. L'efficacité du transfert est proportionnelle à 6 fois l'inverse de la distance entre le donneur et l'accepteur.

$$\text{Soit } E = 1/(1+[R/R_0]^6)$$

avec E, énergie transférée ; R, distance entre le donneur et l'accepteur et R<sub>0</sub>, distance pour laquelle 50% de l'énergie est transférée.

La valeur du transfert dépend de l'orientation entre eux des chromophores des deux molécules, de l'index de réfraction du solvant et du recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur (Figure 22).



**Figure 22.** Recouvrement des spectres d'émission et d'absorption. Cette condition est requise pour le FRET.

Le FRET a trouvé de larges applications en biologie structurale et en biochimie pour la mesure et la détection de changements de distances de l'ordre de 20 à 60 Angströms.

#### II.3.4.2. Préparation des Quantum dots et des Nanogold®

Des Qds CdSe/ZnS ont été solubilisés par les acides (cf. section II.3.2.1.1.), dans le but de leur apporter des charges négatives. Ils ont un diamètre de 4 nm et émettent un maximum de fluorescence à 563 nm (Qds « rouges »).

Deux types de Qds ZnCdSe/ZnS ont été solubilisés par la cysteamine (cf. section II.3.2.2.), pour un apport de charges positives. Le premier type a un diamètre de 6 nm et émet à une longueur d'onde maximale de 518 nm (Qds « verts »). Le deuxième type, d'un diamètre de 7 nm, a une longueur d'onde d'émission de fluorescence maximale à 558 nm (Qds « jaunes »).

Des Nanogold® (Nanoprobes) de 1.8 nm de diamètre ont également été préparés.

Toutes les solutions stocks des différents Qds et de Nanogold® (NGs) ont été préparées dans l'eau, ainsi que les dilutions nécessaires aux différentes mesures.

### II.3.4.3. Mesures et analyse des spectres

#### II.3.4.3.1. Mesures quantum dot/quantum dot

Deux types de Qds ont été choisis suivant le critère de recouvrement du spectre d'émission de l'un par le spectre d'absorption de l'autre. Ils ont été mélangés à des ratios molaires différents et le spectre de fluorescence de ces mélanges a été enregistré.

Les Qds « verts » positifs ( $\lambda_{em} = 518$  nm) et les Qds « rouges » négatifs ( $\lambda_{em} = 563$  nm) ont été utilisés, comme « donneurs » et « accepteurs », respectivement. La concentration des Qds « rouges » a été maintenue constante à  $5 \times 10^{-8}$  M tandis que celle des Qds verts variait de  $2.5 \times 10^{-8}$  M à  $1.5 \times 10^{-6}$  M, dans le but de réaliser les mesures suivant des ratios Qds « verts »/Qds « rouges » allant de 0.5 :1 à 30 :1.

Une série de mesure a consisté à enregistrer les spectres témoins des Qds seuls pour toutes les concentrations utilisées dans les différents ratios.

#### II.3.4.3.2. Mesures quantum dot/Nanogold®

Dans cette série de mesure, les Qds « jaunes » positifs ( $\lambda_{em} = 558$  nm) jouant le rôle de « donneur » ont été mélangés avec des Nanogold® (Nanoprobes) négatifs à différents ratios molaires et le spectre de fluorescence de ces différents ratios a été enregistré.

Tout d'abord, la concentration en NGs a été maintenue constante à  $5 \times 10^{-8}$  M et celle des Qds « jaunes » variable, de  $5 \times 10^{-8}$  M à  $6 \times 10^{-7}$  M, pour l'obtention de ratios molaires Qds « jaunes »/NGs allant de 1 :1 à 12 :1.

Puis, la concentration des Qds « jaunes » a été fixée à  $5 \times 10^{-8}$  M et celle des NGs a varié de  $5 \times 10^{-10}$  M à  $1 \times 10^{-7}$  M, pour l'obtention de ratios molaires Qds « jaunes »/NGs allant de 100 :1 à 1 :2.

Comme précédemment, une série de mesures a été réalisée pour enregistrer les spectres témoins de Qds « jaunes » en absence de NGs à toutes les concentrations utilisées lors des ratios.

Les spectres de fluorescence des mélanges ont été déconvolués par rapport à leurs spectres témoins à partir du logiciel GRAMS®. Ceci a permis de quantifier la baisse de la fluorescence des donneurs et l'augmentation de fluorescence des accepteurs et ainsi de détecter et de déterminer de manière qualitative l'efficacité du phénomène de FRET suivant les ratios utilisés.

### II.3.5. Conjugaison des nanocristaux à l'ADN

#### II.3.5.1. Modification des oligonucléotides par ajout d'un groupement SH

L'oligonucléotide utilisé est un poly d(C) simple brin de 39 bases (Eurogentec). Il a été préparé à une concentration de 1  $\mu\text{mole/mL}$  puis aliquoté pour sa conservation à  $-20^\circ\text{C}$ . L'ajout d'un groupement SH à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide se fait par la cystamine (Sigma-Aldrich).

L'EDC (1-ethyl-3-(3-diméthylanminopropyl)carbodiimide) et le DTT (dithiothréitol) sont sortis de leur lieu de stockage à  $4^\circ\text{C}$  pour qu'ils s'équilibrent à température ambiante ; 15 nmoles d'oligonucléotide poly d(C) ont été ajoutés à 1.25 mg d'EDC puis 5  $\mu\text{L}$  de Cystamine 0.25 M (préparée dans une solution de 0.1 M Imidazole pH 6.0) ont été ajoutés. Une centrifugation de 5 minutes à 14000 trs/min, à  $4^\circ\text{C}$ , a été réalisée puis 20  $\mu\text{L}$  d'Imidazole 0.1 M pH 6.0 ont été ajoutés. La solution a été vortexée puis laissée 30 minutes à température ambiante ; 20  $\mu\text{L}$  de DTT 1 M ont été ensuite ajoutés, avec une incubation à température ambiante de 15 minutes.

L'oligonucléotide modifié obtenu a été purifié par dialyse (Spectra Laboratories) d'un cut off de 10 kDa, contre de l'eau déminéralisée à 4°C pendant une nuit.

#### II.3.5.2. Conjugaison des quantum dots

Les Qds utilisés possèdent une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 558 nm. Ils ont été solubilisés par la technique des acides (cf. section II.3.2.1.1.) et préparés à 10 mg/mL.

Le mélange de conjugué a été préparé de façon à obtenir un ratio de 30 :1 (Oligonucléotide :Qd).

20 µL de Qds à 10 mg/mL ont été ajoutés à la solution d'oligonucléotide modifié. Après mélange et courte incubation à température ambiante, une dialyse a été réalisée contre de l'eau déminéralisée afin d'éliminer les oligonucléotides non conjugués aux Qds. Puis, une électrophorèse du conjugué oligonucléotide-Qd a été réalisée sur un gel d'agarose 0.5% dans du TBE (0.089 M Tris Borate, 2 mM EDTA, pH 8.3) 0.5 fois.

Deux témoins ont été préparés : l'oligonucléotide poly d(C) seul (20 µg) et les Qds seuls (0.6 µg). Tous les échantillons ont été préparés dans un tampon de charge contenant 0.089 M de Tris Borate, 2 mM EDTA pH 8.3, 5% de glycérol et 0.04% de xylène cyanol.

La migration a été effectuée à 80 V pendant 1h dans le TBE. La fluorescence a été visualisée sous lampe UV puis photographiée. Après une incubation de 20 minutes dans le BET (1µg/mL) suivie de 2 lavages à l'eau déminéralisée, la fluorescence a de nouveau été visualisée puis photographiée.

## **III. Résultats**

### **Discussion**

Le chapitre « Résultats – Discussion » est composé de quatre sous-chapitres.

Les deux premiers regroupent les résultats des études sur L'ADN topoisomérase I humaine, avec :

- ✘ L'étude de la dégradation et de la « downregulation » de topoI après traitement par le topotécan de quatre lignées cellulaires issues de tumeurs solides. Ce sous-chapitre est agrémenté d'un article à comité de lecture international.
- ✘ L'étude des cinétiques d'association et de dissociation de topoI pour l'ADN en présence de camptothécines et de benzo[c]phénanthridines.

Les deux derniers regroupent les résultats des études réalisées sur les « quantum dots », avec :

- ✘ L'étude du transfert d'énergie par effet de FRET sur des assemblages Qd/Qd et Qd/Nanogold en milieu aqueux. Ce sous-chapitre est agrémenté d'un article à comité de lecture international.
- ✘ La réalisation de conjugaisons des Qds avec des oligonucléotides et les perspectives qui en découlent.

ARTICLE N°1

**Topotecan-induced alterations in the amount and stability of human DNA topoisomerase I in solid tumor cell lines.**

*“Experimental study”*

**Topotecan-Induced Alterations of Quantity and Stability of Human DNA  
Topoisomerase I within the Solid Tumor Cell Lines**

**Jérôme Devy, Richard Wargnier, Michel Pluot, Igor Nabiev and Alyona Sukhanova**

EA n°3306 « Interactions Cellulaires et Moléculaires en Cancérologie », IFR n°53  
« Biomolécules », UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne,  
51100 Reims, France

**Correspondance to:** Igor Nabiev, EA 3306 “Interactions Moléculaires et Cellulaires en Cancérologie”, IFR n°53 “Biomolécules”, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France. Tel and Fax : +33-326 91 81 27, e-mail : igor.nabiev@univ-reims.fr

**Abbreviations:** topo 1, DNA topoisomerase I; CPT, camptothecine; Tpt, topotecan (hycamtin®).

**Key words:** DNA topoisomerase I; topotecan; down-regulation; solid tumor cell lines

**Running title:** Devy et al: Topotecan-induced alterations of topoisomerase I

**Abstract. Background:** Human DNA topoisomerase I (topo 1) is an essential nuclear enzyme involved in the cellular vital processes and the sole target of antitumor drugs of the camptothecin (CPT) family. Water-soluble CPT derivative topotecan (Tpt, hycamtin®) is currently in clinical use. Despite Tpt demonstrated significant anticancer activity in preclinical and clinical studies, it shows very different potencies in the treatment of different types of cancer. The aim of this research was to compare Tpt-induced time- and dose-dependent cellular responses in terms of alterations of quantity and stability of topo 1 within lung carcinoma (A-549), ovarian adenocarcinoma (CaOv-3), colorectal adenocarcinoma (HT-29), and breast adenocarcinoma (MCF-7) cell lines. **Materials and Methods:** Western blot analysis of time-dependent redistribution of full-size 100 kDa topo 1 and of its proteolytical 80 kDa, 72 kDa and 68 kDa fragments has been performed upon Tpt exposure during 1 h at concentrations 10-fold or 100-fold higher than the Tpt IC<sub>50</sub> values for corresponding cell lines. **Results:** Tpt treatment of the CaOv-3 cell line produces strong time-dependent decrease of quantity of topo 1 immunoprotein. Conversely, MCF7 cell line did not exhibit any topo 1-associated response on the Tpt treatment. Strong but quite different time- and dose-dependent effects of topo 1 down-regulation were clearly identified for the HT-29 and A-549 cell lines. **Conclusion:** The data presumes an implication of dose- and time-dependent drug-induced effects on topo 1 degradation, expression and redistribution of enzyme's molecular forms to the mechanism of Tpt activity against different solid tumor cell lines.

## **1. Introduction**

Topo 1 is an abundant nuclear enzyme involved in the control of the topological state of DNA. It is able to relax DNA supercoils by cleaving a single strand of duplex DNA and passing complementary strand through the nick before religation [1]. Topo 1 participates in many vital cellular processes, such as DNA replication, transcription and recombination. Moreover, it was identified as a sole intracellular target of the promising class of anticancer drugs, derivatives of camptothecin (CPT) [2-5]. Such topo 1-targeting agents inhibit religation step of the topo 1 catalysis by stabilization of the enzyme-DNA cleavable complex in which tyrosine 723 of the enzyme is covalently bound to the 3'-termini of the broken DNA strand [6]. Drug-stabilized cleavable complexes are converted to the cytotoxic lesions by their interaction with advancing replication fork leading to a cell death [7].

Irinotecan (CPT-11) and Tpt are the first derivatives of CPT approved for the clinical trials. Because of their structural similarity, Tpt and SN-38 (active metabolite of CPT-11), exert their cytotoxicity through the stabilization of the cleavable complexes between topo 1 and DNA [8]. These drugs possess similar activity toward different cancer cell lines but exhibit very different activity in the clinical studies [9]. CPT-11 is active against colorectal cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC) [10,11]. Tpt exhibits the best activity against ovarian cancer and SCLC [12,13] and does not appear to be efficient against colorectal cancer [14]. Different schedules of administration for both drugs result in response rates always below 50%, which is somewhat disappointing relative to their potential observed in xenograft models [15]. The mechanisms of revealed clinical resistance are yet to be determined.

Three groups of factors exist, which may lead to resistance of cancer cells to the CPT drugs: factors related to the drug metabolism and uptake, drug-induced alteration of topo 1, and post-cleavage complex mechanisms related to the multiple pathways of cell death [16]. Recent data

indicate that CPTs are not S-phase-specific drugs and that the level of topo 1 expression is not only critical determinant of cancer cell sensitivity to CPTs [17]. Moreover, the cellular responses downstream of cleavable complexes formation are not homogeneous in the different types of cancer cells and presumably determinate cells sensitivity to the drug treatment. It was shown that CPTs induce activation of the DNA double-strand break repair pathway and ubiquitin/26S-proteasome-dependent degradation of topo 1 [18]. Contrary, topo 1 caspase-mediated cleavage to some relatively stable fragments was observed in cells undergoing apoptosis induced by Tpt treatment [19]. Since the protein stability seems to be a critical for the apoptotic initiation and execution, study of topo 1 proteolysis after Tpt treatment may provide information concerning the mechanisms of cellular resistance that can be evaluated clinically.

This paper describes comparative study of Tpt-induced cellular response within a panel of four human solid tumors cell lines. These specific responses were expressed in terms of alterations of total quantity of topo 1 immunoprotein, full-size 100 kDa topo 1 and its proteolytical 80kDa, 72 kDa and 68 kDa fragments as a function of time of Tpt-treatment and dose of Tpt. The choice of cell lines was determined by different clinical sensitivity of ovarian, colon, lung and breast cancers to the Tpt treatment in clinics. The strongest Tpt time-dependent decrease of quantity of topo 1 immunoprotein was detected for ovarian adenocarcinoma cell line, whereas no any detectable topo 1 alterations were found for breast adenocarcinoma cells. In addition, clear dose- and time-dependent effects of topo 1 down-regulations were identified for colorectal adenocarcinoma and lung carcinoma cell lines.

The data reveal differential cellular effects induced by Tpt and should be taken into account when the potencies of Tpt in the treatment of different types of cancers are concerned.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Drug and cell culture*

Tpt (Hycamtin®) was obtained from Laboratoire GlaxoSmithKline, Marly le Roi, France, and used as received. Stock solution was prepared by dissolving in ethanol to concentration  $10^{-2}$  M and the aliquots were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . A-549, HT-29, MCF-7 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) and CaOv-3 cells (kindly provided by Dr. L. Devy, University of Liege, Belgium) were maintained as monolayer in RPMI 1640 with Glutamax (Gibco-BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf thymus (Gibco) in a humidified atmosphere containing 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  at  $37^{\circ}\text{C}$ .

### *2.2. Test of growth inhibition*

Drug cytotoxicity assay was performed using tetrazolium-based compound 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma). Briefly, 100  $\mu\text{l}$  of drug solution (or drug solvent used as a control) was added to the exponentially growing cells plated ( $1 \times 10^4/100\mu\text{l}$ ) in 96-well tissue culture plate (Nunc). After incubation for 72 h, 50  $\mu\text{l}$  of 2.5 mg/ml MTT solution in PBS were added and the cells were incubated for an additional 3 h. Then, entire medium was removed and 100  $\mu\text{l}$  of SDS were added to allow solubilization of the formazan crystals. The absorbance value for each well was determined with the microplate reader Cambridge Technologies, model 750.  $\text{IC}_{50}$  values were obtained by a linear regression analysis of percentage of absorbance at a 490 nm versus log of drug concentration.

### *2.3. Topotecan treatment*

Exponentially growing cells were trypsinized and plated in 100 mm Petri dishes (Nunc). The cells were allowed to attach and grow for 48 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing

5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Then, Tpt was diluted with the medium to the desired concentrations and added to the cells. Following Tpt exposure during 1 h, the cells were washed two times with a fresh medium and used for preparation of the nuclear extracts immediately after washing out of Tpt or after additional incubation in the Tpt-free medium for 1 h or 6 h.

#### *2.4. Preparation of nuclear extracts*

The nuclear extracts of cells treated with Tpt were prepared according to TopoGEN (USA) protocol for the Western blotting applications. Briefly, medium was decanted and cells were rinsed with 15 ml of TD buffer (100 mM NaCl, 20 mM KCl, 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5). Cells were scraped into 2 ml of ice cold TD buffer, transferred into a 15 ml conical tube and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to pellet nuclei. Supernatant was discarded and nuclei were resuspended in 2 ml of ice cold buffer A (100 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% glycerol, 0.2% NP40, 0.1% Triton-X 100) containing a protease inhibitors cocktail (Boehringer-Ingelheim). Samples were incubated in ice for 10 minutes and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to pellet nuclei. Supernatant was discarded and nuclei were resuspended in 180 µl per plate of cold buffer A, containing a protease inhibitors cocktail, 20 µl of 10% (w/v) SDS solution was added, samples were sonicated for 15 seconds and the aliquots were taken to estimate the protein concentration according to the Bradford standard protocol [20]. Then, SDS-PAGE loading buffer was added to the samples to give a final concentration of 25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 2.5 % 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and 0,05% bromphenol blue. Samples then were heated and loaded on to the 8% PAGE.

*2.5. Western blotting and densitometry analysis*

Proteins of nuclear extracts were separated by 8% PAGE and then transferred to the nitrocellulose membrane. The blotting was performed with anti-topo 1 antibodies (kindly provided by Dr. Igor Bronstein, University of York, UK). The primary antibodies were detected by using peroxidase-conjugated polyclonal anti-mouse Ig (Amersham) and blots were developed using an enhanced chemiluminescence technique (ECL detection system, Amersham and Kodak X-Omat AR film). The film was scanned and intensity of each band was analyzed by densitometry analyzing BIO 1D software (Vilbert Lourmat Bio-Profil). Comparison of the total quantity of topo 1 immunoprotein was corrected taking into account differences in protein concentration in the samples loaded to the gels.

### **3. Results**

It has been previously shown that full-size 100 kDa topo 1 protein expression is down-regulated in response to the CPT treatment in the different cell lines [21,22] and that this effect depends on inhibitor structure but is independent on cell death [23]. However it is known that at least two proteolytic topo 1 fragments, 66 kDa and 72 kDa [24], lacking the parts of the N-terminal domain, exist in the eukaryotic cells and exhibit *in vitro* nearly the same catalytic activities as the full-size enzyme, and their roles in the down-regulation of topo 1 immunoprotein remain to be defined.

In this paper, we compared the effect of Tpt treatment on the dynamic of redistribution of full-size topo 1 and of its 68 kDa, 72 kDa and 80 kDa fragments within the panel of four solid tumor cell lines. We have attempted to find a link between dynamics of topo 1 molecular forms down-regulation *in vitro* and very different Tpt efficiency in the clinical trials.

#### *3.1. Topotecan cytotoxicity within different solid tumor cell lines*

Table I shows the results of analysis of Tpt cytotoxicity within A-549, CaOv-3, HT-29, and MCF-7 solid tumor cell lines. Values given in Table I are an average of three independent experiments. Tpt potencies toward ovarian and breast cancer cell lines were found to be same whereas Tpt was two-fold less cytotoxic toward colorectal adenocarcinoma and was much more potent toward lung adenocarcinoma. These data are in good agreement with those reported before [25,26] and were used for calculation of the 10-fold and 100-fold Tpt IC<sub>50</sub> concentrations values for the corresponding cell line. These calculated values were used for the cells treatment followed by preparation of nuclei extracts and analysis of dose- and time-dependent effects of drug.

*3.2. Dose and time dependence of topotecan-induced alterations of human DNA topoisomerase I within nuclear extracts from different solid tumor cell lines*

Comparative quantifications of total topo 1 immunoprotein, full-size 100 kDa topo 1 and its proteolytical fragments were done by Western blotting analysis of nuclear extracts prepared from untreated cells and cells treated at 90% of confluence for 1 h with the 10-fold or 100-fold Tpt  $IC_{50}$  concentrations for the corresponding cell line. The time-dependent effects of the drug treatment on topo 1 were investigated by comparison of topo 1 pattern after 1 h treatment with Tpt and following additional incubation for 1 h or 6 h with fresh Tpt-free medium (Figures 1 and 2).

*MCF-7 - breast adenocarcinoma cell line.* The only one molecular form of topo 1 which corresponds to the full-size 100 kDa protein was detected in nuclear extracts prepared from this cell line (Figure 1). Most pronounced effects were observed after one hour of treatment, leading to 20%-decrease of full-size protein followed by its restoration to initial value. Despite of this fact, no effects of redistribution of topo 1 molecular forms were found for MCF-7 cell line after its treatment with 10 x  $IC_{50}$  (3  $\mu$ M, Table I) or 100 x  $IC_{50}$  (30  $\mu$ M) Tpt concentrations (Figures 2B and 2A, respectively). It should be noted that MCF-7 cell line was found to be the only cell line among four solid tumor cell lines tested in this paper, which does not demonstrated any evidence of the presence of other than 100 kDa topo 1 molecular forms.

*A549 - lung adenocarcinoma cell line.* The immunoblot of the nuclear fraction of non-treated with Tpt A549 cells contains an obvious contribution of 100 kDa, 68 kDa and 72 kDa topo 1 (Figure 1). Tpt treatment induces dose- and time-dependent variations of relative quantities of the correspondent immunoreactive bands (Figures 2A,2B).

10 x IC<sub>50</sub> (1 μM, Table I) dose of Tpt applied for 1 h induces increase of all forms of topo 1 with a very pronounced effect on the 72 kDa proteolytical product (200% up to the control), whereas full-size protein and 68 kDa topo 1 proteolytical product increased on 20% (Figure 2A).

Incubation of cells with Tpt-free medium for 1h before the preparation of nuclei extract induces 20% decrease of the full size topo 1, whereas the quantity of 72 kDa topo 1 drops on 50%, and of 68 kDa topo 1 increases on 20%. Longer (6 h) cells incubation with Tpt-free medium provokes additional 40% decrease of 72 kDa topo 1 and 100 kDa topo 1 quantities, whereas a total topo 1 and 68 kDa topo 1 proteins increase to 150 % related to the control level. Concerning the dynamic of variation of total topo 1 protein (Figure 2A), one can observe a significant increase after 1 h (90% up to the control), followed by a decrease to the control value and a stabilization of this level after 6 h in Tpt-free medium.

When 100 x IC<sub>50</sub> (10 μM, Table I) dose of Tpt was used, the dynamic of variations of total topo 1 and 72 kDa topo 1 forms (Figure 2B) were found to be the same, with an increase of 50% and 90% respectively after one hour of treatment followed by additional increase of 300% and 150% respectively after one hour in Tpt-free medium. After 6 h of Tpt-free incubation, these two forms decreased and kept a value superior to the control, 90% and 200% for the total proteins and for the 72 kDa topo 1 form, respectively.

For the full size and the 68 kDa topo 1 forms, one can observe an increase throughout the treatment. The quantity of 100 kDa topo 1 increases on 10% upon 1h treatment with Tpt and on additional 10% for 1h incubation of cells without Tpt. This effect is further 20% -increased after

additional 6h of cells incubation with Tpt-free medium (Figure 2B). Variations of the 68 kDa topo 1 form are similar of those observed for 100 kDa but slightly more pronounced.

It should be noted that for both,  $10 \times IC_{50}$  and  $100 \times IC_{50}$  Tpt doses, the final level of total topo 1 (Figures 2A,2B) was found to be higher than that for the nuclear extracts from the Tpt-untreated cells.

*HT-29 - colorectal adenocarcinoma cell line.* Tpt treatment of this cell line with the  $10 \times IC_{50}$  (6  $\mu$ M, Table I) dose induces immediate effect of 72 kDa topo 1 degradation (70%), accompanied by a slight variation of 100 kDa topo 1 (20%). At the same time, the quantity of 68 kDa topo 1 is found to be unchanged (Figure 2A). 1 h incubation of cells in Tpt-free medium induces slight increase of 68 kDa topo 1 quantity (10%) accompanied by strong decrease of the full size topo 1 and of the 72 kDa protein (80 and 90% respectively). Further increase of the time of cells incubation in the Tpt-free medium induces increase of 68 kDa, 72 kDa and full size topo 1 molecular forms (Figure 2A). Dynamic of variation of the total amount of topo 1 showed a significant decrease after 1 h of treatment (20%) and after 1 h in Tpt-free medium (40%) followed by a new synthesis (40%) of topo 1 after 6 h in Tpt-free medium.

The increase of the Tpt dose of cells treatment up to  $100 \times IC_{50}$  (60  $\mu$ M, Table I) changes dramatically kinetics of the topo 1 quantities variations induced by the drug (Figure 2B). The level of 68 kDa topo 1 is found to be decreased immediately after treatment down to 25% in comparison to the untreated cells and absolutely disappears after 1 h cells incubation in Tpt-free medium. After 6 h cells incubation, the quantity of 68 kDa topo 1 was found to be restored up to the control level while the quantity of 72 kDa form strongly decreased. Along with these effects, the quantity of the full-size protein form exhibits variations being within 5% of the control level (Figure 2B). Concerning the total amount of topo 1, dynamic of variation after 1 h of treatment and 1 h in Tpt-free medium is less pronounced than for  $10 \times IC_{50}$  (with a decrease of 15% and

40% respectively) followed by a re-synthesis of topo 1 after 1 h of incubation in Tpt-free medium.

*CaOv-3 cell line - ovarian adenocarcinoma.* The 100 x IC<sub>50</sub> (30 μM, Table I) Tpt doses induce nearly complete degradation of the both full-size and 68 kDa topo 1 forms (Figure 2B), while the 10 x IC<sub>50</sub> (3 μM, Table I) dose induces a mild decrease of these two forms. It should be noted that the 72 kDa topo 1 molecular form was not found in the Western blots of nuclei extracts from this cell line (Figure 1). In addition, 80 kDa form exists in the sample of nuclear extract of non-treated cells. This form disappears completely upon Tpt exposure and its quantity is restored after 1 h of cells incubation in Tpt-free medium only in a case of cells treatment with 10 x IC<sub>50</sub> (3 μM) Tpt concentration (Figure 2A).

For the 10 x IC<sub>50</sub> Tpt dose, the cells restore the quantities of both 68 and 80 kDa topo 1 forms after 1 h of their incubation in Tpt-free medium. At the same time, the amount of full size topo 1 decreases to reach 80% of initial control value. Increase of the time of incubation in Tpt-free medium (6h) provokes decrease of the quantities of both 80 kDa and 68 kDa topo 1 forms and restore of the full size topo 1 up to 20% of the control value. Finally, the quantity of total topo 1 was found to be restored with a 20% exceed of the control level and the quantity of 68 kDa topo 1 is restored up to 50% of the control level. It is important that this schedule of treatment leads to the appearance of high molecular weight ladders of topo 1 immunoprotein (Figure 1). Presumably, the upper bands on the Figure 1 corresponds to the ubiquitin- or SUMO-1- topo 1 conjugates, indicating that in this cell line Tpt is able to induce specific down-regulation of topo 1 via the ubiquitin/26S proteasome pathway, like it was reported for the KB-cells, derived from an epidermoid carcinoma [24] or ZR-75-1 and BT474 breast cancer lines [23].

For the 100 x IC<sub>50</sub> Tpt dose, the cells did not restore the quantities of the topo 1 after neither 1h nor 6h of incubation (Figure 2B). Otherwise, both the quantities of full-size protein and total

topo 1 were found to be completely restored up to 40% of the control level and the quantity of 68 kDa topo 1 was restored up to 50% of control level after the 6 h of cells incubation in the Tpt-free medium.

#### **4. Discussion**

Tpt, a water-soluble semisynthetic CPT derivative, was approved for the use in a treatment of cisplatin-refractory ovarian carcinoma and in a second-line therapy in SCLC [27]. Tpt acts by trapping the topo 1 catalytic intermediate, referred as the ternary cleavable complex, and this trapping converts topo 1 into a cellular poison [28]. Existent model of the mechanism of CPTs cytotoxicity postulates that topo 1-mediated DNA double-strand breaks may induce apoptosis where the CPT concentration is the most important factor determined the mode of cell killing. Low concentration of drug causes reversible G2 delay due to the mild DNA damage [29], whereas the high drug concentration induces more extensive DNA damage and may leads to permanent G2 arrest or apoptotic cell death [30]. It seems that the pattern of genes down-regulated after drug treatment is not the same in the different cell culture models. Hence, the exact mechanism of CPT cytotoxicity could be dependent not only on the concentration of drug but also on the type of cells.

Apoptosis is a major determinant for the response of cancer to chemotherapy. Characteristic apoptotic changes have been described in solid tumors after treatment of mice with various cytotoxic drugs, including cytarabine, 5-fluorouracil, fludarabine, doxorubicin, cyclophosphamide, cisplatin, etoposide, datinomycin and camptothecin [30]. A correlation between cytotoxicity and apoptosis has also been reported for adriamycin and etoposide in 11 human cancer cell lines of different origin, including leukemia, lung and ovarian cancer [31].

Reduction of topo 1 protein levels may explain why some cell lines are resistant to Tpt [27,32]. In the other cases, the level of topo 1 couldn't be predictive for the evaluation of the response to Tpt. Previous studies have compared the level of topo 1 and cleavage complexes and shown that these two parameters are not correlated [33], because some other factors may

influence the efficiency of the response: drug uptake, topo 1 intracellular distribution, phosphorylation pattern and chromatin structure [32].

In this paper, we have characterized the cellular responses to the Tpt treatment within four human solid tumor cell lines and influence of the level and redistribution of topo 1 molecular forms. Our goal was to establish a pharmacodynamic relationship between Tpt and amount of topo 1 molecular forms (primary targets) in order to try to find a correlation with the clinical data concerning Tpt activities in the treatment of different cancers. Our study indicates that evaluation of topo 1 after Tpt-treatment could be an interesting index for the predicting of the clinical response on topo 1-targeting chemotherapeutic agent.

It was shown before that Tpt demonstrates similar activity patterns in the panel of different cancer cell lines [9] and our data confirm this fact demonstrating no significant variation of the IC<sub>50</sub> values ranged from 0.1 to 0.6  $\mu$ M for the tested cell lines (Table I). Contrary, we have demonstrated that response on Tpt treatment within four different human solid tumor cell lines varies significantly in term of topo 1 down-regulation and redistribution of quantities of enzymes' proteolytic fragments. Consequently, no correlation between the level of Tpt cytotoxicity and topo 1 response could be considered.

Western blot analysis of nuclear extracts prepared from the MCF-7 breast adenocarcinoma cells demonstrates an expression of significant quantity of full-size topo 1 but does not identify existence of lower molecular weight active topo 1 proteolytic fragments (Figure. 1). Otherwise, besides this cell line exhibits an important level of topo 1, there's also a possibility to have a mutated topo 1 version which is not well recognized by Tpt and unable to participate in formation of the ternary complex [34].

Dose- and time-dependent analysis of Tpt-induced topo 1 variations within the MCF-7 cell line does not demonstrate any significant changes in quantity of full-size topo 1 immunoprotein or of appearance of any proteolytically digested topo 1 molecular forms (Figures 1,2A,2B).

These facts correlate with the previous studies of topo 1 cleavage in apoptotic MCF-7 cells which do not identify any cleavage of topo 1 in this cell line [19]. It's known that although 12 human caspases have been identified to date, caspase-3 and caspase-6 are the most widely studied with respect to the protein cleavage during apoptotic cell death. It was also reported that topo 1 is a substrate be cleaved by a non-caspases protease that was activated downstream of the caspases and it was possible too that the caspase site is catalytically less favorable [35]. MCF-7 cell line is characterized by the absence of caspase 3 and demonstrates resistance to the apoptotic induction by Tpt [36,37]. Moreover, MCF-7 cell line exhibits a high level of Bcl-2 proved to be a strong inhibitor of the apoptosis pathway [37]. We suppose that the absence of any topo 1 downregulation after the Tpt treatment in the MCF-7 breast adenocarcinoma may be explained by the absence of caspase 3 and/or overexpression of Bcl-2 in this cell line.

The results obtained for A-549, a NSCL cell line show significant effects of Tpt-induced topo 1 down-regulation (Figures 1,2A,2B). In this case, we found that for both 10-fold  $IC_{50}$  and 100 fold  $IC_{50}$ , the level of total amount of topo 1 is higher than the control value, 50% and 100% respectively. These results are correlated with the clinical data demonstrating a modest activity of Tpt in the treatment of NSCL cancer [38]. Some authors have shown that Tpt induces apoptotic effect in this cell line which may be determined by the down-regulation of the proteinase k B [39] being involved in diverse sets of apoptotic machinery. Even in the absence of important effect of Tpt on the A-549 cell line in terms of topo 1 quantity, our data may serve as an index for the clinical trial indicating the low Tpt activity against the non small cell lung cancer.

In the HT-29 cell line, both concentrations 10 x  $IC_{50}$  and 100 x  $IC_{50}$  provoke completely different results. Indeed, for the 10 x  $IC_{50}$ , full size and 72 kDa topo 1 forms seem to be the main target after one hour of treatment and after 1 hour in Tpt free medium although for the 100 x  $IC_{50}$ , main target is the 68 kDa topo 1 form. Level of all topo 1 forms (excepted for 72 kDa topo

1 form) are completely restored using 100 x IC<sub>50</sub> treatment after 6 h in Tpt free medium. Although for 10 x IC<sub>50</sub> concentration level of full size reach a value corresponding to 55% of initial value, and the 68 kDa topo 1 form reach a value up to 25% of the control value. We can suggest also the least effect on the level of a new synthesis of 100 kDa topo 1 form and so the global effect on the level of the different form of topo 1 seems to be more important for the 10-fold IC<sub>50</sub> Tpt concentration.

Effect of topo 1 down-regulation may be determined by the protein p53: an overexpression of this protein sensitize the cell to apoptosis whereas a mutation of p53 may lead to resistance to chemotherapy [40]. The lack of response on Tpt in the colon cancer line should not be determined by the low level of topo 1 in the cells but may be caused by a low proportion of cycling cell [41] or by the presence of mutated p53 protein in this cell line. There was a lot of enthusiasm for use topo 1-targeted drugs in the treatment of colon cancer. Some preclinical data have demonstrated effectiveness of these agents, but, surprisingly, clinical trials with Tpt in patients with colon cancer have shown only modest results [43]. Our data show that this lack of effectiveness may be explained by the low level of topo 1 and by specific responses of this cell line on the Tpt treatment in terms quantities of topo 1 molecular forms. It should be noted that for the HT-29 and A-549 cell lines some clinical trials were found to be successful when Tpt was used in combination with others agents [27].

The most pronounced effects of Tpt on the level and variations of topo 1 molecular forms were obtained on the CaOV-3 ovarian carcinoma cell line (Figures 1,2A,2B). In this cell line the best results are again obtained with a 100-fold IC<sub>50</sub> Tpt concentration which induced the lower dynamics of topo 1 quantity restoration upon incubation of cells in the Tpt-free medium, compared to the 10-fold IC<sub>50</sub> Tpt concentration. This fact may partially explain an efficiency of Tpt in the treatment of ovarian cancer. It should be noted that in some cases Tpt may provoke an up-regulation of the topo 2 and a possible combination of Tpt with other agents in order to

inhibit the two enzymes topo 1 and topo 2 was found to very useful [44]. Effects of topo 1 down-regulation in this cell line may also be explained by a multi-ubiquitination occurring in the vicinity of the topo 1 cleavable complex [40] and this fact may describe our finding of high-molecular-weight protein bands.

Our results demonstrate that the down-regulation of topo 1 is independent of Tpt-induced cell death and that topo 1 protein levels recover after Tpt removal differently in the different solid tumor cell lines. The data show that the differential cellular effects induced by Tpt should be taken into account when the potencies of Tpt in the treatment of diverse types of cancers are concerned.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from ARERS, France (M.P., I.N.), NATO, Région Champagne-Ardenne, France, ARC, France (I.N., A.S) and from the European Community INTAS 01-2331 (I.N.). A.S. was supported by the FEBS fellowship.

## **References**

1. Wang JC: DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 635-692, 1996.
2. Champoux JJ: Mechanism of catalysis by eukaryotic DNA topoisomerase I. *Adv Pharmacol* 29A: 71-82, 1994.
3. Chen AY, Liu LF: DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34: 191-218, 1994.
4. Pommier Y, Tanizawa A, Kohn KW: Mechanisms of topoisomerase I inhibition by anticancer drugs. *Adv Pharmacol* 29B: 73-92, 1994.
5. Wang JC: DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* 266: 6659-6662, 1991.
6. Lyn R, Bjornsti MA, Caron PR, Wang JC: Peptide sequencing site and site directed mutagenesis identify tyrosine 723 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2559-3563, 1989.
7. Kaufmann SH: Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1400: 195-211, 1998.
8. Potmesil M: Camptothecin: from bench research to hospital wards. *Cancer Res* 54: 1431-1439, 1994.
9. Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R: Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumor cells but not in cell lines. *Eur J of Cancer* 36: 2120-2127, 2000.
10. Saijo N: Preclinical and clinical trials of topoisomerase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 922: 92-99, 2000.
11. Langer CJ: The emerging world role of irinotecan in lung cancer. *Oncology* 15: 15-21, 2001.
12. Geffen DB, Man S: New drugs for the treatment of cancer, 1990-2001. *Isr Med Assoc J* 4: 1124-31, 2002.

13. Huang CH, Treat J: New advances in lung cancer chemotherapy: topotecan and the role of topoisomerase I inhibitors. *Oncology* 61: 14-24, 2001.
14. Jonsson E, Dhar S, Jonsson B, Nygren P, Graf W, Larsson R: Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur J Cancer* 36: 2120-7, 2000.
15. Saleem A, Edwards TK, Rasheed Z, Rubin E: Mechanism of resistance to camptothecins, *Annals of the New York Acad of Sci* 922: 46-55, 2000.
16. Pommier Y, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS: Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance. *Drug Resist Updat* 2: 307-318, 1999.
17. Perego P, Capranico G, Supino R, Zunino F: Topoisomerase I gene expression and cell sensitivity to camptothecin in human cell lines of different tumor type. *Anti Cancer Drugs* 5: 645-649, 1994.
18. Li TK, Liu LF: Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 53-77, 2001.
19. Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PWJr, Stewart L, Durrieu F, Poirier GG, Alnemri ES, Champoux JJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274: 4335-4340, 1999.
20. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
21. Beidler DR, Cheng YC: Camptothecin induction of a time- and concentration-dependent decrease of topoisomerase I and its implication in camptothecin activity. *Mol Pharmacol* 47: 907-914, 1995.
22. Desai SD, Li TK, Rodrigues-Bauman A, Rubin EH, Liu LF: Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res* 61: 5926-5932, 2001.

23. Fu Q, Kim SW, Chen HX, Grill S, Cheng YC: Degradation of topoisomerase I induced by topoisomerase I inhibitors is dependent on inhibitors structure but independent of cell death. *Mol Pharmacol* 55: 677-683, 1999.
24. Kudinov AR, Bronstein IB, Gabibov AG: Two subforms of eukaryotic topoisomerase I. Purification and structure-function relationships. *FEBS Lett* 314: 267-70, 1992.
25. Sun Z, Shen K, Xu X: The effect of hydrocamptothecin and topotecan to SKOV3 and CAOV3 in vitro. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 34: 547-550, 1999.
26. Loprevite M, Favoni RE, de Cupis A, Pirani P, Merlo F, Grossi F, Ardizzoni A: Pre-clinical evaluation of new antineoplastic agents in NSCLC cell lines: evidence of histological subtype-dependent cytotoxicity. *Int J Oncol* 15: 787-92, 1999.
27. Mathijssen RHJ, Loos WJ, Verweij J, Sparrenboom A: Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Curr Cancer Drug Targets* 2: 103-123, 2002.
28. Gatto B, Capranico G, Palumbo M: Drugs acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives. *Curr Pharm Des* 5: 195-215, 1999.
29. Zhou Y, Gwardry FG, Reinhold WC, Miller LD, Smith LH, Scherf U, Liu ET, Kohn KW, Pommier Y, Weinstein JN: Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects. *Cancer Res* 62: 1688-1695, 2002.
30. Kaufmann SH, Earnshaw WC: Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experim Cell Res* 256: 42-49, 2000.
31. Wu GS, El-Deiry WS: Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clin Cancer Res* 2: 623-633, 1996.
32. Pommier Y, Gupta M, Valenti M, Nieves-Neira W: Cellular resistance to camptothecins. *Ann N Y Acad Sci* 803: 60-73, 1996.

33. Goldwasser F, Bae I, Valenti M, Torres K, Pommier Y: Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen. *Cancer Res* 55: 2116-2121, 1995.
34. Nieves-Neira W, Pommier Y: Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer* 82: 396-404, 1999.
35. Wright SC, Schellenberger U, Wang H, Wang Y, Kinder DH: Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: requirement for caspase 3-like-proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 797-803, 1998.
36. Janicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG: Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273: 15540-15545, 1998.
37. Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, Huang RP, Takayama S, Wang HG, Adamson E, Reed JC: Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 47: 129-140, 1998.
38. Dowlati A, Levitan N, Gordon NH, Hoppel CL, Gosky DM, Remick SC, Ingalls ST, Berger SJ, Berger NA: Phase II and pharmacokinetic/pharmacodynamic trial of sequential topoisomerase I and II inhibition with topotecan and etoposide in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 47: 141-148, 2001.
39. Nakashio A, Fujita N, Rokudai S, Sato S, Tsuruo T: Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res* 60: 5303-5309, 2000.
40. Liu LF, Duann P, Lin CT, D'Arpa P, Wu J: Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 803: 44-49, 1996.

41. Liu TJ, el-Naggar AK, McDonnell TJ, Steck KD, Wang M, Taylor DL, Clayman GL: Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 55: 3117-3122, 1995.
42. Staley BE, Samowitz WS, Bronstein IB, Holden JA: Expression of DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II-alpha in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 12: 356-61, 1999.
43. Creemers GJ, Gerrits CJ, Schellens JH, Planting AS, van der Burg ME, van Beurden VM, de Boer-Dennert M, Harteveld M, Loos W, Hudson I, Stoter G, Verweij J: Phase II and pharmacologic study of topotecan administered as a 21-day continuous infusion to patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 14: 2540-2545, 1996.
44. McGuire WP, Brady MF, Ozols RF: The gynecologic oncology group experience in ovarian cancer. *Ann Oncol* 10: 29-34, 1999.

Received June 16, 2003

Accepted

**Table I.** Concentrations of topotecan inhibiting the cellular growth by 50% (IC<sub>50</sub>).

Cell line	IC <sub>50</sub> (μM)
A-549	0.1
HT-29	0.6
CaOv-3	0.3
MCF-7	0.3

## **Figure Legends**

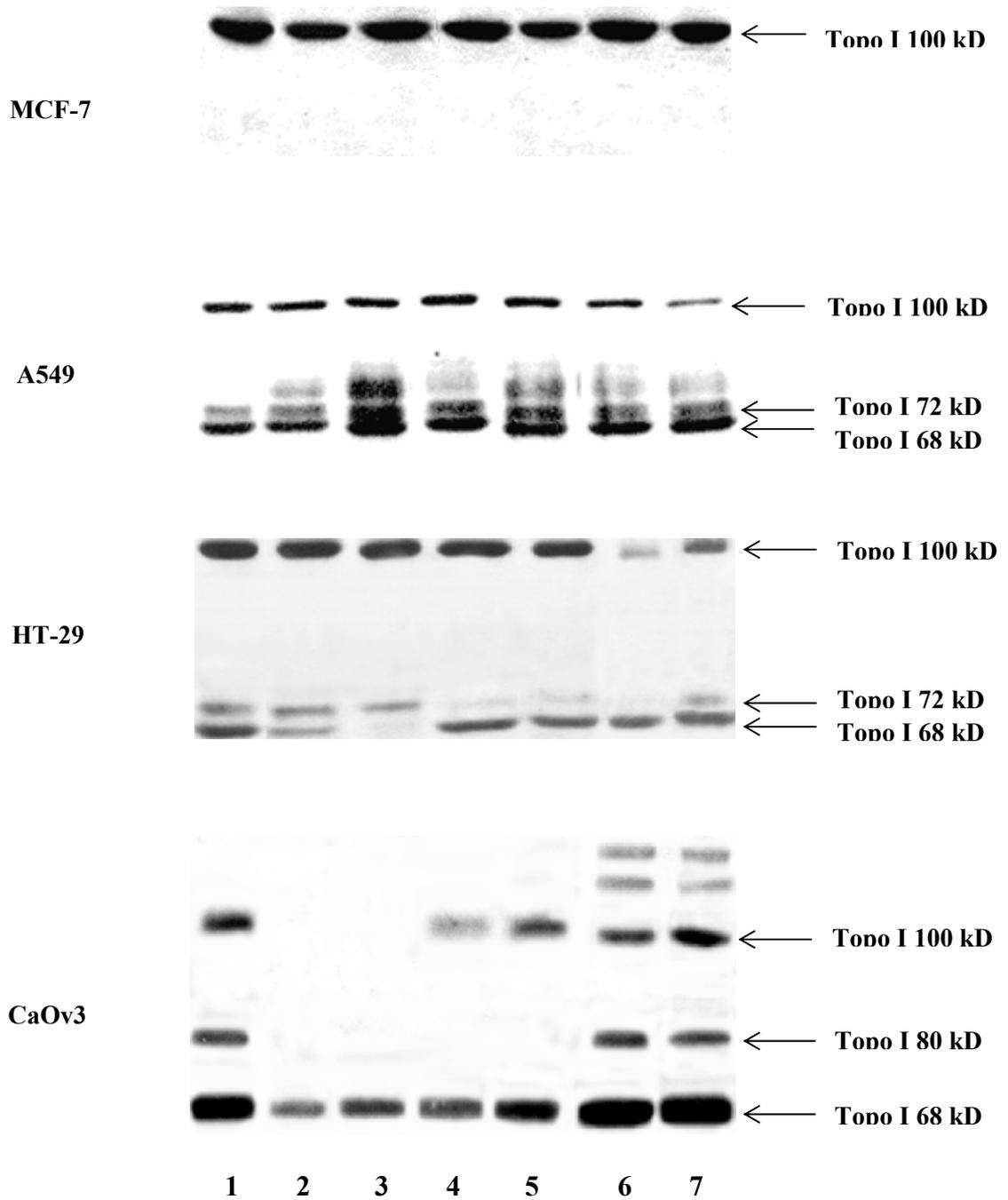
**Figure 1.** Different effects of topotecan treatment on human DNA topoisomerase I down-regulation within the nuclear extracts prepared from breast adenocarcinoma (MCF-7), lung adenocarcinoma (A-549), colorectal adenocarcinoma (HT-29) and ovarian adenocarcinoma (CaOV-3). Cells were treated with topotecan doses corresponding to 10x or 100xIC<sub>50</sub> values for one hour followed by time-course of cells incubation in the topotecan-free medium.

Lane 1: control; Lane 2: cells treatment with 100xIC<sub>50</sub> dose of topotecan; Lane 3: cells treatment with 100xIC<sub>50</sub> dose of topotecan followed by 1 h of incubation in topotecan-free medium; Lane 4: cells treatment with 100xIC<sub>50</sub> dose of topotecan followed by 6 h of incubation in topotecan-free medium; Lane 5: cells treatment with 10xIC<sub>50</sub> dose of topotecan; Lane 6: cells treatment with 10xIC<sub>50</sub> dose of topotecan followed by 1 h of incubation in topotecan-free medium; Lane 7: cells treatment with 10xIC<sub>50</sub> dose of topotecan followed by 6 h of incubation in topotecan-free medium.

**Figure 2.** Dynamic quantitative variations of different molecular forms of human DNA topoisomerase I within nuclear extracts prepared from the MCF7, A549, HT29 and CaOv3 solid tumor cell lines treated with topotecan doses corresponding to 10xIC<sub>50</sub> (Panel A) or 100xIC<sub>50</sub> (panel B).

Experimental points densitometry levels of Western blot bands of total topoisomerase I (◆), and 100 kDa (●), 80 kDa (▲), 72 kDa (■), or 68 kDa (○) molecular forms of enzyme in nuclear extracts from topotecan-treated cells normalized to the densitometry level of corresponding bands in the control nuclear extracts from the non-treated cells.

*Résultats - Discussion*



**Figure 1**

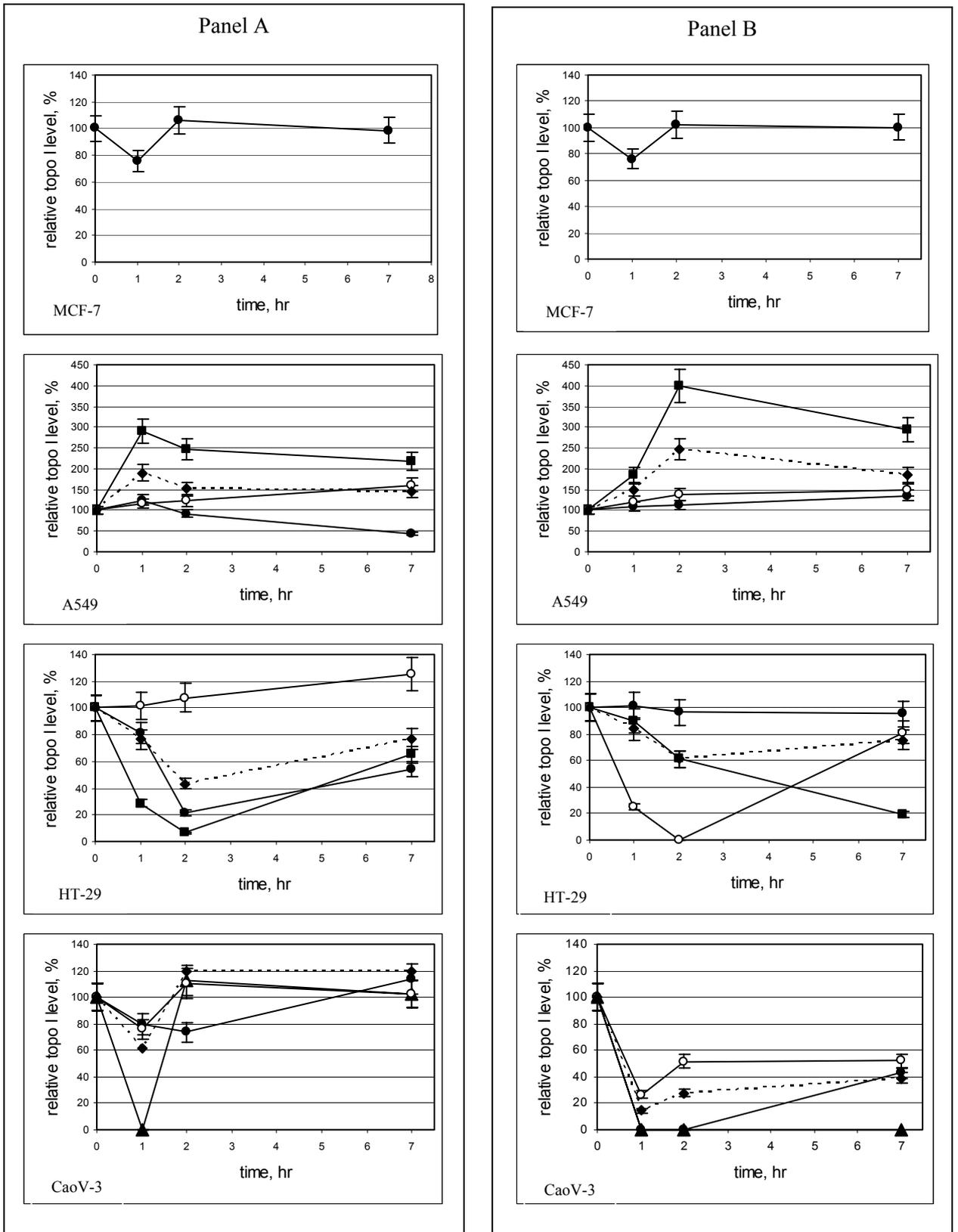


Figure 2

### **III.1. Etude de l'altération de la quantité et de la stabilité de l'ADN topoisomérase I humaine induite par le topotécan sur différentes lignées cellulaires issues de tumeurs solides.**

L'ADN topoisomérase I (topoI) d'Eucaryotes fait partie intégrante de la réplication cellulaire et de la machinerie transcriptionnelle. Cette enzyme relaxe l'ADN par une suite d'étapes catalytiques : liaison au substrat ADN, coupure simple brin lors de la formation du complexe transitoire enzyme-ADN, passage du brin d'ADN à travers la cassure et enfin religation de l'ADN.

En raison de son activité au niveau de l'ADN, topoI est la cible de plusieurs classes de médicaments antitumoraux dont les camptothécines (CPT et TPT) et ses analogues, les benzo[c]phénanthridines (FGR et ETX). L'efficacité de ces molécules en chimiothérapie est essentiellement liée à leur capacité de stabiliser de façon covalente les complexes transitoires entre l'ADN et topoI, ou à leur capacité de changer le mode de reconnaissance des sites de liaison spécifique de topoI sur l'ADN. La formation d'un complexe ternaire stable ADN-topoI-médicament crée des dommages au niveau de l'ADN qui interfèrent avec la réplication et la transcription, conduisant à la mort cellulaire par apoptose.

Afin de mieux comprendre l'action antitumorale du topotécan sur les tumeurs ovariennes et aussi mammaires, coliques et pulmonaires non à petites cellules où le topotécan a montré une plus faible efficacité en clinique, nous avons réalisé une étude comparative des réponses induites par le TPT dans les lignées de tumeurs solides A549 (carcinome pulmonaire non à petites cellules), CaOV-3 (adénocarcinome ovarien), HT29 (adénocarcinome colique) et MCF7 (adénocarcinome mammaire).

TopoI se présente sous plusieurs formes, dont les deux plus connues sont la 100 kDa (forme native) et la 68 kDa (forme tronquée de la 100 kDa). Il a été montré que ces deux formes possèdent une même sensibilité à la camptothécine [Bronstein et coll., 1999] mais aucune étude ne s'est attachée à montrer les variations de quantité de ces deux formes de topoI après traitement par un agent anti-cancéreux. C'est ce que nous

avons réalisé au sein des lignées cellulaires MCF7, HT29, A549 et CaOV-3. Suite au traitement par le topotécan, la réponse de ces quatre lignées cellulaires varie largement.

Sur la lignée MCF7, seule la forme native de 100 kDa a été détectée (figure 1, cf. article). Au bout d'une heure de traitement par le topotécan, il est observé une diminution de 20% de la forme native, suivie par une restauration de sa valeur initiale. Ceci est observé pour les deux concentrations de traitement, 10x et 100x l'IC<sub>50</sub> (figure 2). Une explication de ce manque d'efficacité pourrait résider dans une mutation de topoI-100 kDa, empêchant ainsi sa reconnaissance par le topotécan [Nieves-Neira et coll., 1999].

L'étude des variations de top1 induites par le traitement au TPT n'a pas montrée de changements significatifs sur la quantité de topoI-100 kDa, ni de formes moléculaires protéolysées apparentes. Ce résultat est corrélé par des études précédentes où aucun clivage de topoI n'avait été identifié dans des cellules MCF7 apoptotiques [Samejima et coll., 1999].

D'autre part, il a été montré qu'au moment de l'apoptose, topoI est clivée par une protéase activée par les caspases, protéines de la voie apoptotique [Wright et coll., 1998]. Une absence de caspase 3 dans cette lignée a été relevée par Janicke et coll. en 1998. Une résistance à l'induction de l'apoptose par TPT a également été notée [Zapata et coll., 1998]. De plus, la lignée MCF7 montre un haut taux de Bcl-2, prouvée pour être un inhibiteur fort de la voie apoptotique [Zapata et coll., 1998].

L'absence de « downregulation » de topoI après traitement par le TPT pourrait être expliquée par une absence de caspase 3 et/ou une surexpression de Bcl-2 dans cette lignée cellulaire.

En outre, ce manque d'efficacité observé du TPT explique probablement les résultats décevants obtenus par son utilisation sur les cancers mammaires.

Sur la lignée A549, le traitement par TPT induit des variations dans les quantités relatives des formes 100, 68 et 72 kDa de topoI.

A une concentration de  $10\times$  l' $IC_{50}$ , il est observé une augmentation de toutes les formes de topoI, avec un effet très prononcé pour la forme 72 kDa (200%). La forme 68 kDa montre une augmentation de 20% (figure 2A). La quantité de topoI-72 kDa diminue de 90% à la suite des 6h d'incubation des cellules dans du milieu frais. La forme 68 kDa quand à elle augmente de 150%. La forme 100 kDa montre une légère augmentation après 1h de traitement puis une diminution de 50% après les 6h d'incubation.

Il est à noter une augmentation significative de la quantité totale de topoI après l'heure de traitement (90% au-dessus du témoin), suivie d'une diminution et d'une stabilisation après les 6h d'incubation dans du milieu frais.

Pour la concentration  $100\times$  l' $IC_{50}$ , les dynamiques de variation de quantité de topoI total et de topoI-72 kDa sont similaires, avec une augmentation (50 et 90% respectivement) suite à l'heure de traitement. Les quantités des deux formes augmentent de nouveau, de 300% et 150% après incubation 1h en milieu frais puis diminuent pour garder une valeur supérieure au témoin. Les formes 100 et 68 kDa montrent une augmentation suite à l'heure de traitement et après 6h d'incubation en milieu frais, avec une variation plus prononcée pour la forme 68 kDa.

Enfin, pour les deux concentrations de traitement, la quantité totale de topoI a été trouvée supérieure au témoin, à l'issue de l'incubation 6h dans du milieu frais.

Ces résultats sont en accord avec les données cliniques sur les cancers du poumon non à petites cellules où il a été observé une action modérée du TPT [Dowlati et coll., 2001].

Pour la lignée HT29, après 1h de traitement à la concentration de  $10\times$  l' $IC_{50}$ , l'effet est immédiat sur topoI-72 kDa avec une diminution (70%) accompagnée par une légère variation de topoI-100 kDa (20%). La forme 68 kDa quand à elle reste inchangée. Après 1h d'incubation des cellules dans du milieu frais, une légère augmentation de topoI-68 kDa est observée, ainsi qu'une diminution des formes 100 et 72 kDa. Les trois formes montrent une augmentation de leur quantité après les 6h d'incubation.

La quantité totale de topoI montre une diminution significative suite à l'heure de traitement et après 1h d'incubation en milieu frais, suivie d'une augmentation au bout des 6h.

Pour une concentration de 100x l'IC<sub>50</sub>, topoI-68 kDa montre une diminution de 25% après l'heure de traitement et disparaît complètement au bout d'1h d'incubation en milieu frais. Après 6h, topoI-68 kDa s'avère être complètement restaurée. Dans le même temps, la quantité de 72 kDa se voit être fortement diminuée. La forme 100 kDa ne subit que peu de variations.

Comme pour la concentration 10x l'IC<sub>50</sub>, la forme totale montre une diminution de sa quantité, mais de façon moindre, suivie d'une augmentation au bout des 6h.

Les effets de « downregulation » pourraient être expliqués via la protéine p53. En effet, une surexpression de cette protéine sensibilise la cellule pour l'apoptose et il a été montré que la mutation de p53 entraîne une résistance à la chimiothérapie. La présence d'une protéine p53 mutée dans cette lignée cellulaire pourrait expliquer le manque de réponse du TPT.

La faible efficacité du TPT au niveau du cancer du colon [Creemers et coll., 1996] pourrait être expliquée notamment par le faible niveau de topoI.

Pour la lignée CaOV-3, la concentration 100x l'IC<sub>50</sub> induit une dégradation presque complète des formes 68 et 100 kDa. La forme 72 kDa n'a pas été détectée dans cette lignée cellulaire. Une forme 80 kDa est à noter au niveau du témoin. Elle disparaît complètement suite au traitement, à 10 et 100x l'IC<sub>50</sub>. Cette forme est restaurée après 6h d'incubation dans du milieu frais pour la concentration 10x l'IC<sub>50</sub>.

Pour la concentration 10x l'IC<sub>50</sub>, les quantités de topoI-68 et 80 kDa sont restaurées après 1h d'incubation en milieu frais mais diminuent au bout des 6h. Dans le même temps, la forme 100 kDa est trouvée à 20% au-dessus du témoin.

Il est à noter l'apparition de bandes de haut poids moléculaire. Elles correspondent à des complexes SUMO-topoI ou Ubiquitine-topoI, indiquant que TPT est capable dans cette lignée d'induire une « downregulation » spécifique de topoI via

la voie du protéasome 26S/ubiquitine. Ceci a été montré pour les cellules KB issues d'un carcinome épidermoïde [Kudinov et coll., 1992].

Les résultats montrent des dynamiques de restauration de la quantité de topoI plus faibles pour un traitement à 100x l'IC<sub>50</sub>. Ceci pourrait partiellement expliquer l'efficacité du TPT dans le traitement des cancers ovariens.

L'ensemble de ces résultats tend à montrer l'implication de la dose et du temps d'infusion du médicament dans les effets de dégradation, d'expression et de redistribution de topoI dans les différentes lignées issues de tumeurs solides. En outre, la caractérisation et la quantification des différentes formes de topoI apparaissent comme une voie intéressante dans l'élaboration et l'optimisation de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses.

### III.2. Stabilité comparative du complexe entre l'ADN topoisomérase I et l'ADN en présence de camptothécines et de benzo[c]phénanthridines.

La technologie de résonance plasmonique de surface pour l'analyse d'interactions biospécifiques permet la détection de biomolécules et le suivi des événements de liaison entre deux ou plusieurs molécules, en temps réel, sans utilisation de marqueurs. Les molécules ne nécessitent pas de purification préalable et il n'est nécessaire que d'une faible quantité d'échantillon. Cette technique offre l'opportunité d'obtenir de façon directe et facile la description de cinétiques de liaison et de libération.

Par utilisation de cette technique, nous avons voulu réaliser une description du mécanisme cinétique de l'ADN topoisomérase I en présence ou en absence d'inhibiteurs, les objectifs de cette étude étant de :

- ✘ caractériser *in vitro* des dérivés, stabilisant ou supprimant le complexe dit « clivable », différents du topotécan et de l'irinotécan utilisés en clinique qui forment un complexe réversible, exigeant des temps d'infusion de drogue longs.
- ✘ optimiser l'utilisation de la technologie BIAcore® pour un screening facile et rapide des drogues.
- ✘ être capable de différencier le « caractère » poison ou supprimeur de ces drogues.

La forme 68 kDa humaine recombinante a été utilisée pour cette étude. Deux familles d'inhibiteurs de topoI ont été testées : les poisons camptothécines et les benzo[c]phénanthridines qui montrent un mode d'inhibition « poison » ou « supprimeur » étroitement lié à leur structure chimique.

La caractérisation quantitative en temps réel des interactions ADN – topoI en présence ou non de ces inhibiteurs a été réalisée sur 2 oligonucléotides différents. L'un de ces oligonucléotides présente une séquence avec une forte affinité pour topoI (Olig-TopoI), de par la présence d'une thymine en position -1 du site de clivage ; l'autre possède une séquence camptothécine-dépendante (Olig-CPT), de par la présence d'une

thymine en position -1 et d'une guanine en position +1 du site de clivage. Les expériences ont été réalisées pour des concentrations de topoI allant de 800 à 50 nM. Les mesures effectuées et les valeurs d'association et de dissociation de topoI obtenues concernent un site de liaison de topoI à l'ADN. En effet, nous avons utilisé des oligonucléotides ne dépassant pas 26 paires de bases pour être sûr que le ratio stoechiométrique soit de 1 pour 1.

Par utilisation du logiciel BIAeval®, nous avons pu analyser les sensorgrammes obtenus par les mesures et déterminer avec précision les différentes valeurs de vitesses d'association et de dissociation de topoI (correspondant au  $k_a$  et au  $k_d$ ) pour chaque oligonucléotide. Les sensorgrammes ont été comparés à des sensorgrammes théoriques (étape de « fit »), obtenus suivant l'algorithme de Marquardt-Levenberg. Un modèle « analyte bivalent », impliquant deux vitesses indépendantes d'association et de dissociation, a été utilisé. En effet, l'utilisation d'un modèle plus simple impliquant une vitesse d'association et une vitesse de dissociation ne permettait pas une analyse précise des sensorgrammes. Emettant l'hypothèse que topoI pouvait former des dimères, le modèle « analyte bivalent » a permis une analyse d'une meilleure qualité. Seuls les valeurs appropriées décrivant les vitesses cinétiques de topoI pour l'ADN ont été prises en considération.

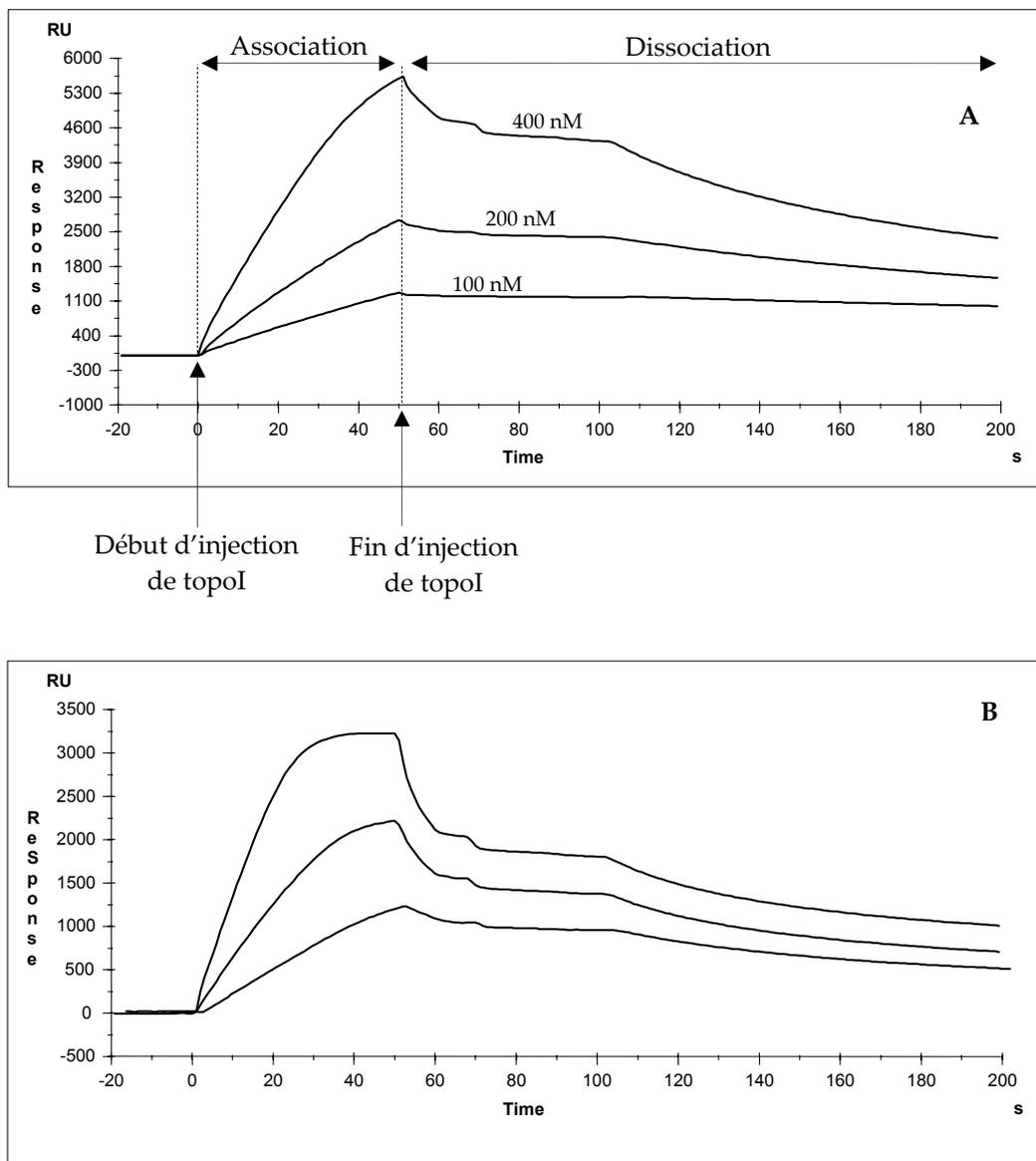
Le  $\chi^2$ , valeur statistique déterminée suite au « fitting », rend compte de l'étroitesse du « fit », et donc de sa qualité.

### III.2.1. Etude du complexe binaire

Les vitesses d'association et de dissociation de topoI ont été mesurées en absence d'inhibiteur, dans le but de se placer dans les conditions de formation du complexe binaire. La figure 23 présente des exemples de sensorgrammes obtenus où il est possible d'identifier la phase d'association et la phase de dissociation de topoI pour son substrat. De plus, il est possible de remarquer que pour chaque concentration de topoI utilisé, la saturation des sites de topoI est atteinte pour l'Olig-TopoI alors qu'elle

ne l'est pas pour l'Olig-CPT. Ceci laisse présumer une vitesse de dissociation plus faible de topoI pour l'Olig-TopoI.

La vitesse d'association de topoI à l'ADN a été trouvée comme non spécifique de l'oligonucléotide employé, avec des valeurs de  $1.43 \times 10^5$  et  $1.58 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Tableau 2), pour Olig-CPT et Olig-TopoI, respectivement. A contrario, les vitesses de dissociation s'avèrent foncièrement différentes avec un  $k_d$  de  $1.4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour l'Olig-CPT et de  $2.7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  pour l'Olig-TopoI. Ces données serviront de référence quand à l'étude de la stabilisation du complexe dit « clivable » topoI-ADN par les inhibiteurs, notamment les camptothécines.



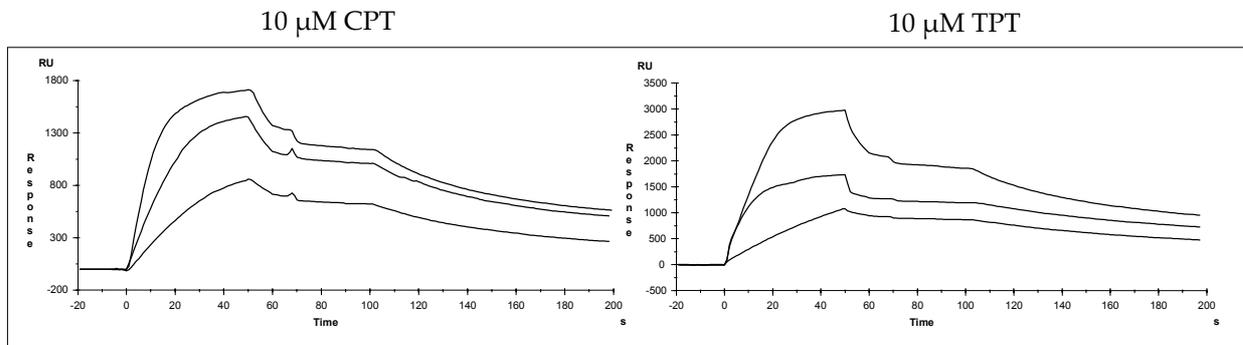
**Figure 23.** Sensorgrammes des complexes binaires pour Olig-CPT (A) et Olig-TopoI (B). Ils sont représentés pour les concentrations 400, 200 et 100 nM de topoI.

III.2.2. Etude de la stabilisation du complexe dit « clivable » par les camptothécines

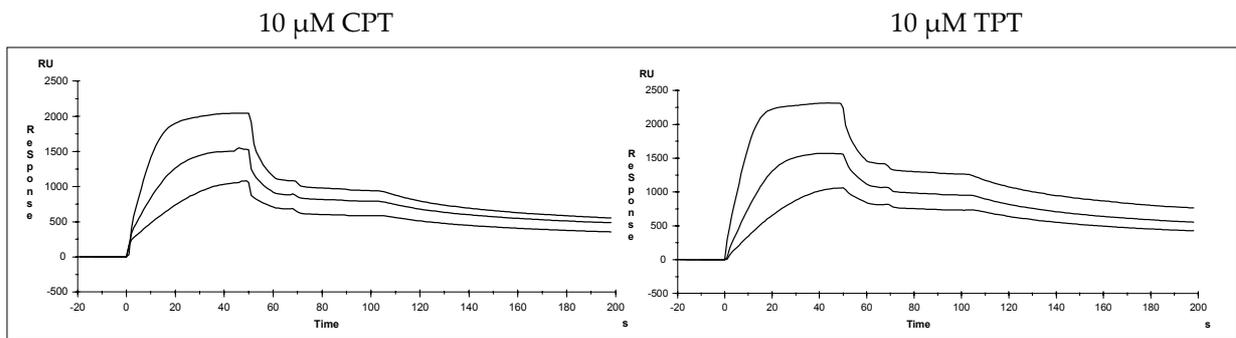
Les poisons de topoi comme CPT et TPT sont bien connus pour stabiliser le complexe dit « clivable » topoi-ADN, formant un intermédiaire nécessaire à l'induction de la mort cellulaire [D'Arpa et coll., 1990].

Pour chaque expérience, un inhibiteur (CPT ou TPT) a été co-injecté avec topoi à une concentration de 10  $\mu$ M pour CPT et à des concentrations variant de 0.05 à 10  $\mu$ M pour TPT. La figure 24 présente les sensorgrammes des mesures lors de l'ajout de 10 $\mu$ M de CPT et de 10  $\mu$ M de TPT.

Olig-CPT



Olig-topoi



**Figure 24.** Sensorgrammes du complexe ternaire ADN-topoi-inhibiteur pour des concentrations de 400, 200 et 100 nM de top1 et 10  $\mu$ M de CPT ou TPT.

Les résultats quantitatifs sont exposés dans le tableau 2.

Pour Olig-Topoi, la présence d'inhibiteur provoque une augmentation des vitesses d'association de topoi pour l'ADN. A 10  $\mu$ M, pour CPT et TPT, la vitesse de dissociation  $k_d$  s'avère identique, de l'ordre de  $1.42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ -  $1.45 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , et plus faible

de pratiquement 2 fois que pour le complexe binaire. Il est également à noter que le  $k_a$  de topoI diminue avec l'évolution progressive de la concentration en TPT, passant de  $2.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  à  $1.42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , pour des concentrations de TPT allant de 0.05 à 10  $\mu\text{M}$ . Ces résultats traduisent d'une stabilisation du complexe dit « clivable » s'avérant dépendante de la concentration en inhibiteur.

L'effet de stabilisation est plus prononcé pour l'Olig-CPT où il est observé une diminution du  $k_d$  de 20 fois en présence de TPT et de 10 fois en présence de CPT pour des concentrations de 10  $\mu\text{M}$ . Les vitesses d'association restent quand à elles très voisines de celle du complexe binaire, excepté pour les deux plus faibles concentrations de TPT où il est observé une augmentation du  $k_a$ .

Les diminutions significatives des vitesses de dissociation de topoI pour l'ADN en comparaison du complexe binaire en présence de TPT ou CPT traduisent sans conteste d'une stabilisation du complexe dit « clivable » de topoI avec l'ADN. Ceci est en accord avec le « caractère » poison de ces deux membres de la famille des camptothécines. Cette stabilisation semble être nettement plus prononcée au niveau des sites camptothécine-dépendante, avec une meilleure efficacité pour le topotécan par rapport à la camptothécine. De plus, TPT apparaît induire une augmentation des vitesses d'association de topoI pour l'ADN d'une manière dépendante de la concentration et de la séquence du site de clivage.

Ces observations constituent un modèle pour permettre d'appréhender et de déceler un mécanisme d'action « poison » chez un potentiel agent anti-tumoral.

Oligonucléotide camptothécine dépendante

A	ka (M <sup>-1</sup> , s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	Chi <sup>2</sup>
<b>Complexe binaire</b>	1.43 x 10 <sup>5</sup>	<b>1.40 x 10<sup>-1</sup></b>	298
<b>Camptothécine 10 μM</b>	1.54 x 10 <sup>5</sup>	<b>1.20 x 10<sup>-2</sup></b>	231
<b>Topotécan</b>			
<b>0.05 μM</b>	5 x 10 <sup>5</sup>	1.7 x 10 <sup>-2</sup>	213
<b>0.2 μM</b>	3.53 x 10 <sup>5</sup>	2.00 x 10 <sup>-2</sup>	193
<b>1 μM</b>	1.00 x 10 <sup>5</sup>	2.10 x 10 <sup>-2</sup>	512
<b>10 μM</b>	1.60 x 10 <sup>5</sup>	<b>6.98 x 10<sup>-3</sup></b>	170

Oligonucléotide à forte affinité pour topoI

B	ka (M <sup>-1</sup> , s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	Chi <sup>2</sup>
<b>Complexe binaire</b>	1.58 x 10 <sup>5</sup>	<b>2.70 x 10<sup>-2</sup></b>	260
<b>Camptothécine 10 μM</b>	2.40 x 10 <sup>5</sup>	<b>1.45 x 10<sup>-2</sup></b>	200
<b>Topotécan</b>			
<b>0.05 μM</b>	4.10 x 10 <sup>5</sup>	2.20 x 10 <sup>-2</sup>	115
<b>0.2 μM</b>	3.80 x 10 <sup>5</sup>	2.30 x 10 <sup>-2</sup>	98
<b>1 μM</b>	3.20 x 10 <sup>5</sup>	1.80 x 10 <sup>-2</sup>	134
<b>10 μM</b>	2.40 x 10 <sup>5</sup>	<b>1.42 x 10<sup>-2</sup></b>	144

**Tableau 2.** Vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I de l'ADN en absence ou en présence de poison. Les résultats sont montrés sur deux oligonucléotides différents : un oligonucléotide camptothécine dépendante (A) et un oligonucléotide à forte affinité pour topoI (B). ka représente la vitesse de formation du complexe topoI-ADN en M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>; kd représente la vitesse de dissociation du complexe en s<sup>-1</sup>.

III.2.3. Etude de l'effet des benzo[c]phénanthridines sur les vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I

Dans cette série d'expérience, nous nous sommes attachés à vouloir montrer le caractère suppresseur des benzo[c]phénanthridines. FGR et ETX ont été utilisés, à des concentrations variant de 0.001  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$ . Les mesures ont été réalisées sur Olig-TopoI. Le tableau 3 donne un récapitulatif des résultats.

Oligonucléotide à forte affinité pour topoI

	<b>ka (<math>\text{M}^{-1}, \text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>kd (<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>Chi<sup>2</sup></b>
<b>Fagaronine</b>			
0.001 $\mu\text{M}$	$3.45 \times 10^5$	$1.66 \times 10^{-2}$	160
0.01 $\mu\text{M}$	$4.54 \times 10^5$	$1.76 \times 10^{-2}$	90
0.1 $\mu\text{M}$	$4.65 \times 10^5$	$1.79 \times 10^{-2}$	86
1 $\mu\text{M}$	$6.35 \times 10^5$	$1.98 \times 10^{-2}$	118
10 $\mu\text{M}$	$6.75 \times 10^5$	$2.56 \times 10^{-2}$	95
100 $\mu\text{M}$	<b><math>2.9 \times 10^5</math></b>	$1.98 \times 10^{-2}$	112
<b>Ethoxidine</b>			
0.001 $\mu\text{M}$	$2.14 \times 10^5$	$1.74 \times 10^{-2}$	125
0.01 $\mu\text{M}$	$4.19 \times 10^5$	$1.82 \times 10^{-2}$	142
0.1 $\mu\text{M}$	$5.33 \times 10^5$	$1.81 \times 10^{-2}$	99
1 $\mu\text{M}$	$6.18 \times 10^5$	$3.19 \times 10^{-2}$	114
10 $\mu\text{M}$	<b><math>4.03 \times 10^5</math></b>	$1.84 \times 10^{-2}$	85

**Tableau 3.** Vitesses d'association et de dissociation de l'ADN topoisomérase I sur son substrat, un oligonucléotide à forte affinité pour topoI, en présence de fagaronine ou d'ethoxidine, à des concentrations variant de 0.001 à 100  $\mu\text{M}$ .

Les deux inhibiteurs induisent une très nette augmentation des vitesses d'association de topoI pour l'Olig-TopoI. Le  $k_a$  évolue pour des concentrations croissantes de FGR ou ETX. Jusqu'à deux valeurs de concentrations critiques : 100  $\mu\text{M}$  pour FGR et 10  $\mu\text{M}$  pour ETX. Cette chute brutale de la vitesse d'association pourrait être la traduction de l'effet supprimeur de ces deux inhibiteurs. La vitesse de dissociation reste relativement constante pour des concentrations de ETX allant de 0.001 à 0.1  $\mu\text{M}$  tandis qu'elle augmente légèrement avec des concentrations croissantes de FGR jusqu'à 1  $\mu\text{M}$ .

FGR est connu pour avoir une action de poison à faibles concentrations et de supprimeur à fortes concentrations [Wang et coll., 1993]. Cette caractéristique d'action est révélée par la chute dramatique de la vitesse d'association de topoI avec l'ADN. La même observation sur les résultats obtenus avec ETX conforte cette idée. Cette chute survenant à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pour ETX et plus tardivement pour FGR peut s'expliquer dans le fait qu'ETX est un inhibiteur de topoI plus efficace que FGR (ETX est 10 fois plus cytotoxique) [Fleury et coll., 2000]. Cependant, il n'est pas possible ici d'affirmer clairement le rôle de « poison » de FGR à faibles concentrations.

La technologie BIA a permis de caractériser de manière quantitative, par détermination des vitesses cinétiques d'association et de dissociation, les interactions biomoléculaires topoI-ADN-inhibiteur. Les grandes différences dans les valeurs de ces vitesses montrent des mécanismes d'action différents entre les différents inhibiteurs. Il est alors possible de pouvoir différencier le caractère poison ou supprimeur des inhibiteurs de topoI, en fonction de la concentration de drogue employée.

Il est alors envisageable d'utiliser une telle technique pour la mise au point de nouveaux inhibiteurs. En effet, il devient possible de passer en revue des molécules susceptibles d'inhiber topoI et de sélectionner par cette technique les plus prometteuses.

ARTICLE N°2

**Energy transfer in aqueous solutions of oppositely  
charged CdSe/ZnS core/shell quantum dots  
and in quantum dot – nanogold assemblies.**

Nanoletters 2004;4(3):451-457

# Energy Transfer in Aqueous Solutions of Oppositely Charged CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots and in Quantum Dot–Nanogold Assemblies

Richard Wargnier,<sup>†</sup> Alexandre V. Baranov,<sup>†</sup> Vladimir G. Maslov,<sup>†</sup> Vitali Stsiapura,<sup>†</sup> Mikhail Artemyev,<sup>§</sup> Michel Pluot,<sup>†</sup> Alyona Sukhanova,<sup>†</sup> and Igor Nabiev<sup>\*,†</sup>

*EA n°3306 "Interactions Cellulaires et Moléculaires en Cancérologie", Institut Fédératif de Recherche n°53 "Biomolécules", Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France, S. I. Vavilov State Optical Institute, 12 Birzhevaya Liniya, 199034 St. Petersburg, Russia, and Institute for Physico-Chemical Problems, Belarussian State University, 220080 Minsk, Belarus*

Received November 28, 2003; Revised Manuscript Received January 15, 2004

## ABSTRACT

We demonstrate that the nanoscale assemblies of water-solubilized, oppositely charged CdSe/ZnS core/shell quantum dots and of quantum dots and nanogold particles make it possible to develop FRET-based sensors with a donor quenching efficiency close to 100%. The cw and time-resolved photoluminescence analysis of nanoassemblies with different donor-to-acceptor ratios demonstrates a prevalence of 1:1 complexes. Experimental data perfectly fit the mathematical simulation based on long-range FRET and a static model of the assembling of the oppositely charged nanoparticles. These assemblies are stable in biological fluids, suggesting new applications.

The development of organometal synthesis pathways resulting in II–VI semiconductor nanocrystals or quantum dots (QDs) yields high-quality nanoparticles of a large range of desired sizes, a narrow size scattering (<5%), good crystallinity,<sup>1,2</sup> desired surface properties, and a high quantum yield (QY) of photoluminescence (PL).<sup>3–5</sup> For example, CdSe/ZnS core/shell QDs may be prepared in the form of negatively or positively charged water-soluble particles 3 to 6 nm in diameter with QYs exceeding 70%,<sup>5</sup> large absorption cross sections, and size-tunable PL spectra covering the region from blue to red. These QDs are characterized by broad excitation and narrow emission bandwidths (fwhm = 25–40 nm) and have an exceptional photochemical stability (3800-fold more photoresistant than FITC, for example).<sup>5,6</sup> ZnS-shell-protected CdSe-core QDs (in contrast to CdSe-core QDs) are very stable in biological fluids,<sup>5–8</sup> which makes them promising fluorescence labels for long-term biomolecular tracking experiments. If fully utilized, these unique properties of QDs may allow the development of FRET-based nanoscale assemblies capable of continuously monitoring biological target species in different aqueous environments.

Despite considerable efforts toward the development of

close-packed QDs solids to investigate the cooperative physical phenomena and to assess the potential of QDs as media for novel electronic, optical, and optoelectronic applications,<sup>9,10</sup> few studies on the mechanisms of FRET between QDs in aqueous solutions have been published so far. Most applications have focused on using QDs as protein- or DNA-conjugated fluorometric labels for cell imaging,<sup>5,7,11</sup> for immunoassays,<sup>6,12</sup> for optical bar coding (QDs encapsulated in polymer beads),<sup>13,14</sup> and for QD-(dye-labeled biomolecule) assays.<sup>15–17</sup>

In this letter, we describe new types of nanoscale assemblies of oppositely charged CdSe/ZnS core/shell QDs with different energies of optical transitions and of charged QDs and oppositely charged nanogold particles and demonstrate electronic energy transfer within the assemblies in aqueous solutions. Experimental data for the QD–QD system perfectly fit the mathematical simulation based on Förster's theory for long-range resonance-energy transfer and a static model of the assembling of oppositely charged nanoparticles. In QD–nanogold assemblies, long-range FRET is sufficiently effective to account for the observed quenching of donors, but the presence of additional mechanisms cannot be excluded. The observed properties of the nanoassemblies are promising for their application to the development of FRET-based nanosensors.

Negatively charged QDs 4.0 nm in diameter were prepared by treating the surface of the synthesized CdSe/ZnS QDs

\* Corresponding author. E-mail: igor.nabiev@univ-reims.fr.

† Université de Reims Champagne-Ardenne.

‡ S. I. Vavilov State Optical Institute.

§ Belarussian State University.

(Supporting Information) with a mixture of mercaptosuccinic and mercaptosulfonic acids (Sigma).<sup>6</sup> They were characterized by a bright PL with an emission maximum at 563 nm ("red" QDs, R-QD) and a QY close to 44% at room temperature. Two kinds of positively charged QDs were prepared by treating the surface of QDs with cysteamine (Sigma)<sup>5</sup>: ZnCdSe/ZnS QDs with an emission peaks at 518 nm ("green" QDs, G-QDs) and at 558 nm ("yellow" QDs, Y-QDs). SAXS data show that the mean diameters of G-QDs and Y-QDs were about 6 and 7 nm, respectively.

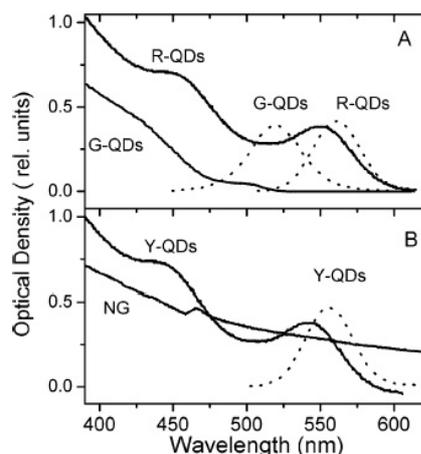
Functionalized with the surface carboxy groups, negatively charged spherical nanogold (NG) particles 1.8 nm in diameter were purchased from Nanoprobes. Each NG particle contained approximately 18 carboxylic acid groups on its surface. The stock solutions of NG and QDs and all subsequent dilutions were prepared in water.

Two types of FRET-based water-soluble nanoscale assemblies with different donor-to-acceptor stoichiometry ratios were prepared and studied using cw and time-resolved PL spectroscopy: assemblies of oppositely charged QDs (G-QDs and R-QDs) and of positively charged QDs (Y-QDs) and negatively charged NG. The concentration of QDs in aqueous solution was determined analytically from the total amount of Cd and taking into account their sizes. The assemblies were prepared in dilute aqueous solutions where the effects of the absorption of incident light, reabsorption of PL, and aggregation of nanoparticles with the same surface-charge sign were negligible. In the first set of experiments, the G-QD (donor) concentration ( $C_G$ ) was varied from  $1.5 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  ( $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) to  $9 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  ( $1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), whereas the R-QD (acceptor) concentration ( $C_R$ ) of  $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) was kept constant. Therefore, the donor-to-acceptor molar ratio ( $n = C_G/C_R$ ) was varied from 0.5:1 to 30:1. It was found that the total intensity of G-QD emission was directly proportional to  $C_G$  within the concentration range studied. Thus, the approach we used is analogous to the standard scheme of energy-transfer experiments where the quenching of the donor PL upon an increase in acceptor concentration is studied at a constant donor concentration.

According to the other experimental scheme, positively charged Y-QDs were assembled with negatively charged NG particles at donor-to-acceptor molar ratios ( $n = C_Y/C_{NG}$ ) varying from 1:1 to 12:1, with the absolute amount of NG being maintained constant ( $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  or  $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) and the amount of Y-QDs varying from  $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  ( $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) to  $3.6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-3}$  ( $6 \times 10^{-7} \text{ M}$ ). In control experiments using the standard scheme, the absolute amount of Y-QDs was maintained constant ( $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ), and the amount of NG particles was varied from  $3 \times 10^{11} \text{ cm}^{-3}$  to  $6 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ . Thus, the corresponding Y-QD-to-NG molar ratios varied from 100:1 to 1:2 in this case.

Measurements of the PL spectra of the QDs and QD-NG assemblies were accompanied by recording the control PL spectra of aqueous solutions of free nanoparticles at exactly the same concentrations as those in the mixtures.

Absorption spectra of aqueous solutions of positively charged donors (G-QDs and Y-QDs) and negatively charged

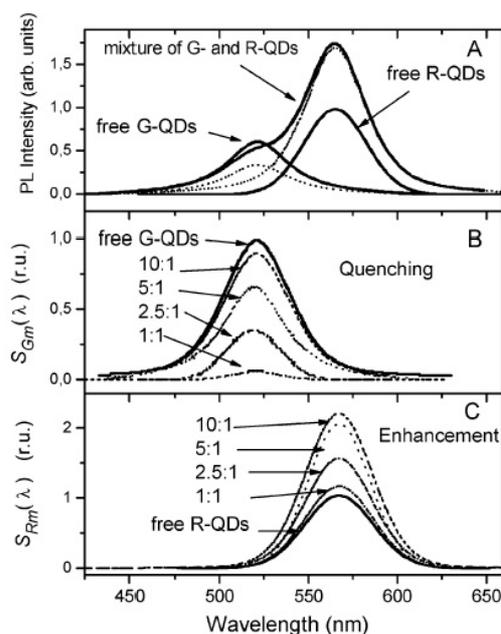


**Figure 1.** Absorption and photoluminescence spectra of nanoparticles used in FRET experiments. (A) Absorption spectra of the aqueous solutions of donor (G-QDs) and acceptor (R-QDs) quantum dots (solid lines); photoluminescence spectra of these nanoparticles (dotted lines) are shown for comparison. (B) Absorption spectra of the aqueous solutions of donor (Y-QDs) quantum dots and acceptor nanogold (NG) particles; the photoluminescence spectrum of donor Y-QDs is shown by a dotted line.

acceptors (R-QDs and NG particles) and the positions of their lowest-energy PL bands are shown in Figure 1. The small Stokes shift of the PL bands of QDs with respect to their lowest-energy absorption peaks indicates that PL bands correspond to the band-edge emissions, as expected for QDs with well-passivated surfaces.<sup>18</sup>

Figure 1 shows sufficient overlapping between the PL band of G-QDs and the high-energy side of the lowest-energy absorption bands of R-QDs as well as between the PL band of Y-QDs and the absorption band of localized plasmons of NG particles. This may result in effective Förster-type resonance-energy transfer between G-QDs and R-QDs or between Y-QDs and NG.<sup>19</sup> The Förster critical radii ( $R_0$ ) were found to be 7.3 and 7.4 nm for QD-QD and QD-NG assemblies, respectively.

The band-edge emission of the negatively charged G-QDs is effectively quenched upon the addition of the positively charged R-QDs, and the band-edge emission of the R-QDs is enhanced. As an example, Figure 2a shows the PL spectra of free G-QDs and R-QDs in an aqueous solution at  $C_G = 12 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  and  $C_R = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ , respectively, as well as the PL spectrum of their mixture solution at the same concentrations of QDs. The PL bands of free QDs are approximated well by the Voigt functions. The PL spectrum of the QD mixture is well approximated by two Voigt functions corresponding to the shapes of PL bands of free G-QDs and R-QDs in aqueous solutions. This indicates that the spectrum of the QD mixture may be regarded as a superposition of the PL spectra of free QDs (dashed lines in Figure 2a). The quenching of G-QD and the enhancement of R-QD PL emissions is shown in Figure 2 as compared with the PL of free QDs. The evolution of deconvoluted PL bands of QDs with different relative G-QD contents ( $n$ ) in the mixture solutions is shown in Figure 2b and c. Here, the

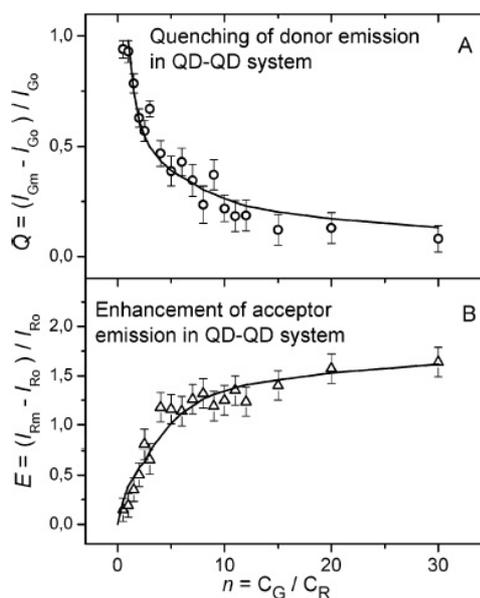


**Figure 2.** FRET effect in assemblies of oppositely charged quantum dots. (A) Photoluminescence spectra of free donor (G-QDs) and acceptor (R-QDs) quantum dots in aqueous solutions and of their mixture solution (solid lines). Concentrations of G-QDs and R-QDs in solutions were the same ( $12 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  and  $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ , respectively). Dotted lines are the results of deconvoluting the photoluminescence spectrum of the QD mixture solution with two Voigt contours corresponding to the photoluminescence spectra of free QDs in solution. (B) Quenching of the photoluminescence emission of G-QDs (donors) with R-QDs for different relative concentrations of G-QDs ( $n$ ). (C) Enhancement of the photoluminescence emission of R-QDs (acceptors) in their assemblies with G-QDs for different relative concentrations of G-QDs ( $n$ ). Photoluminescence spectra of QDs ( $S_{Gm}(\lambda)$  and  $S_{Rm}(\lambda)$  shown in panels B and C, respectively) were normalized to integrated intensities ( $I_{G_0}$  and  $I_{R_0}$ ) of the corresponding bands of solutions of free QDs recorded at the same concentrations.

spectra of G-QDs and R-QDs ( $S_{Gm}(\lambda)$  and  $S_{Rm}(\lambda)$ , respectively) are normalized to the integrated intensity of the respective PL bands ( $I_{G_0}$  and  $I_{R_0}$ ) in solutions of free QDs recorded at the same concentrations.

Hereafter, we estimate the efficiency of the quenching process by the value  $Q = (I_{G_0} - I_{Gm})/I_{G_0}$ , where  $I_{G_0}$  and  $I_{Gm}$  are the integrated intensities of the G-QD PL band in a solution of free G-QDs and in that of a mixture of G-QDs and R-QDs, respectively, recorded at the same G-QD concentrations. The  $Q$  value was calculated for different concentrations of G-QDs; its dependence on  $n$  (the number of G-QDs per R-QD) is shown in Figure 3a.  $Q$  increases monotonically with a decrease in  $n$ . It is noteworthy that the very effective quenching of G-QDs characterized by  $Q = 0.93$  was observed for assemblies with  $n$  equal to 1 and 0.5.

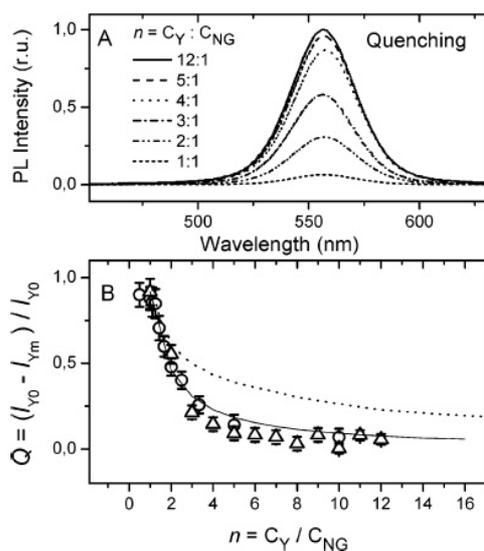
The efficiency of enhancement of the PL emission of R-QDs is calculated as  $E = (I_{Rm} - I_{R_0})/I_{R_0}$ , where  $I_{Rm}$  and  $I_{R_0}$  are integral intensities of PL of R-QDs in the mixtures with G-QDs and in a solution of free R-QDs, respectively, recorded at the same concentration. Figure 3b shows the



**Figure 3.** Dependences of FRET effects on the donor-to-acceptor molar ratios in mixtures of oppositely charged quantum dots. (A) Quenching of the photoluminescence of donor quantum dots (G-QDs) with acceptor quantum dots (R-QDs) as a function of the ratio between the molar concentrations of donors and acceptors ( $n = C_G/C_R$ ) in water solutions. Open circles are experimental data. The solid line is the result of calculation. (B) Enhancement of the photoluminescence of acceptor quantum dots (R-QDs) with donor quantum dots (G-QDs) as a function of  $n$ . Open triangles are experimental data. The solid line is the result of calculation. The concentration of R-QDs ( $C_R = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ) was maintained constant in all experiments.  $I_{G_0(R_0)}$  and  $I_{Gm(Rm)}$  are the integrated intensities of G and R quantum dots emission in solutions of free quantum dots and in their mixtures, respectively, recorded at the same concentrations.

variation in the enhancement of the PL emission of R-QDs as a function of the relative content of G-QDs ( $n$ ).  $E$  grew almost linearly as  $n$  increased to 4–5 and reached saturation at larger  $n$ . Because  $n$  is the number of G-QDs per R-QD, the saturation suggests the formation of  $G_nR$  assemblies ( $N \geq 1$ ) with the maximum value of  $N$  equal to 4–5. Only a 20% broadening of the 563-nm PL band was observed for the assemblies compared to the same band in the aqueous solution of free R-QDs. Moreover, the absorption spectra of the assemblies fit the superposition of the absorption spectra of free G- and R-QD solutions recorded at the same concentrations. This confirms the assumption that the interaction between electronic subsystems of oppositely charged QDs in the assemblies is most likely a weak dipole–dipole interaction, which does not noticeably disturb the electron structure of QDs involved in the assemblies.

The averaged PL decay times for free G-QDs and for the mixtures of G-QDs and R-QDs with molar ratios of  $n = 1:1$  and  $2:1$  appeared to be nearly the same ( $4.9 \pm 0.3$ ,  $4.4 \pm 0.3$ , and  $4.9 \pm 0.3$  ns, respectively). The PL decay curves ( $F(t)$ , not shown) fit a sum of three exponentials ( $F(t) = \sum \alpha_j \exp\{-t/\tau_j\}$ , where  $\alpha_j$  and  $\tau_j$  are the amplitude and decay time of the  $j$ th component, respectively). The mean time for the multiexponential PL decays is  $\langle \tau \rangle = \sum \alpha_j \tau_j^2 / \sum \alpha_j \tau_j$ , where



**Figure 4.** Quenching of the photoluminescence of donor quantum dots by acceptor nanogold particles. (A) Representative set of the donor quantum dots (Y-QDs) photoluminescence bands at 558 nm normalized to the integrated intensity of the corresponding band in a solution of free Y-QDs for different donor-to-acceptor ( $n$ ) ratios. The concentration of the donor ( $C_Y$ ) was maintained constant ( $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ). (B) Dependence of the efficiency of Y-QD photoluminescence quenching by nanogold particles,  $Q = (I_{Y_0} - I_{Y_m})/I_{Y_0}$ , as a function of the quantum dots-to-nanogold ratio ( $n$ ). Open triangles are  $Q$  values obtained in experiments where the concentration of the donor was maintained constant ( $C_Y = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ) and the concentration of the acceptor was varied. Open circles correspond to experiments where the concentration of the acceptor was maintained constant ( $C_{NG} = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ) and that of the donor was varied. The solid line is the result of calculation. The dotted line is the calculated dependence for donor quenching in the system of oppositely charged quantum dots  $Q(n)$  shown for comparison.

$\alpha_j \tau_j$  are the weights of the  $j$ th component in the emission. The same values of  $\langle \tau \rangle$  for a solution of free G-QDs and for their mixtures with R-QDs indicate that the emission of G-QDs was mainly accounted for by free nanocrystals, which are always present in the solution, whereas the PL of assembled G-QDs could not be analyzed because of its strong quenching. Therefore, not all G-QDs were assembled with R-QDs even for  $n = 1$ , and the actual efficiency of the quenching of the PL emission of assembled G-QDs was close to 1.0. Indeed, in the important case of a 1:1 donor-acceptor mixture, the measured intensity of PL emission for assembled G-QDs was only 7% of that for the solution of free QDs. Then, the possible contribution of the emission from G-QDs in assemblies fell within a 10% interval of experimental error, and the actual efficiency of the quenching must be higher than 0.99.

Strong quenching of the QD PL was also observed in the assemblies of positively charged Y-QDs and negatively charged NG particles. A representative set of Y-QD photoluminescence bands at 558 nm normalized to the integrated intensity of the corresponding band in a solution of free QDs for donor-to-acceptor ratios ( $n = C_Y/C_{NG}$ ) varying from 1:1 to 12:1 is shown in Figure 4a. An increase in  $n$  to 100 was

not followed by further quenching of the Y-QD PL emission. In these experiments, the concentration of Y-QDs was maintained constant ( $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ ). Figure 4b shows the efficiency of the QD quenching by NG particles,  $Q = (I_{Y_0} - I_{Y_m})/I_{Y_0}$ , as a function of  $n$ . Open triangles are values obtained in the experiment where  $C_Y = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  was constant; open circles correspond to the experiment where  $C_{NG} = 3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$  was constant. As expected, both series of experiments gave similar results. Very effective quenching of QD fluorescence (with  $Q$  being about 0.92) was observed even for a ratio between the donor (Y-QDs) and acceptor (NG) nanoparticles of 1:1. It is noteworthy that an excess of acceptor ( $n = 0.5$ ) did not result in a further increase in  $Q$ . This fact unambiguously demonstrates an absence of assemblies with more than one NG particle per Y-QD. As in the case of QD-QD assemblies, the PL emission of the donor in 1:1 mixtures was accounted for by nonassembled Y-QDs.

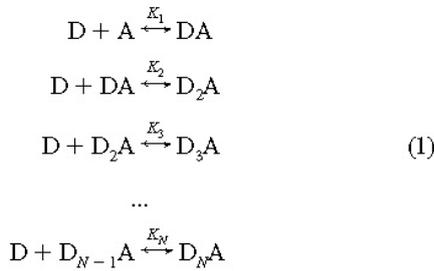
As seen from the experimental data, very effective quenching of donor QDs by both types of acceptors (QDs with lower band-edge energy or NG particles) was observed at donor-to-acceptor ratios close to 1:1 and an absolute concentration of the acceptor of about  $3 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$ . At these concentrations, the mean distance between electrostatically noninteracting donors and acceptors would be too large to produce an effective dynamic FRET, even in the case of optimal overlapping of the donor emission and acceptor absorption spectra. The quenching became possible only in the case of direct contact between the donor and acceptor in the assemblies containing two or more nanoparticles.

The enhancement of the acceptor emission and the absence of noticeable changes in the absorption spectra of donors and acceptors in the assemblies indicate that quenching and enhancement of the QD emissions were most likely to be caused by a long-range FRET between donors and the acceptor forming the assemblies. This conclusion is also confirmed by the following calculations. The distances ( $D$ ) between the donor and acceptor centers in the assemblies can be roughly estimated from the diameters of nanoparticles. They are about 6 and 4.4 nm for the QD-QD and QD-NG systems, respectively. The  $1/[1 + (R_0/D)^6]$  dependence of the PL QY is characteristic of FRET.<sup>20</sup> Using the Förster radii calculated here (7.3 and 7.4 nm for the QD-QD and QD-NG systems, respectively), we find that the quenching efficiency for QD-QD and Y-QD-NG assemblies should be about 0.91 and 0.96, respectively. These values are in reasonable agreement with the measured values. Apparently, the mechanism of PL quenching due to electron transfer from gold to the trapped holes of the QD interface described before for QDs unprotected with a ZnS shell<sup>21</sup> is implausible in the case of QDs with a well-passivated CdSe surface.

Being oppositely charged, donors and acceptors are attracted each other because of Coulomb forces. However, the composition of the assemblies is unclear because the absolute charges are unknown. Intuitively, assembly should be blocked when the donor and acceptor charges are compensating for each other, so the complexes with several donors per acceptor may be formed in the solution depending

on the values of their surface charge. The experimental data allow us to assume that energy transferred from the donors to the acceptor (quenching) as well as the excess energy emitted by the acceptor (enhancement) should be proportional to the number of donors per acceptor in the assembly. Thus, the donor emission quenching and the acceptor emission enhancement can be described in the framework of the model where the donor-to-acceptor energy transfer is determined by long-range FRET, and the observed dependences of  $Q$  and  $E$  on  $n$  result from the nanoparticle assembling. This association is certainly much slower than the reverse lifetime of the lowest-energy electron state of the donor. Let us assume that the efficiency of quenching for one G-QD is the same for all types of assemblies.

The reaction of the donor (D) and the acceptor (A) assembling can be described as follows:<sup>22</sup>



where  $K_N$  are the equilibrium constants of the corresponding reaction;  $1 \leq N \leq N_{\max}$  is the number of donors per acceptor in the corresponding assembly. The values of  $K_N$  are determined by the law of chemical equilibrium

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[DA]}{[D][A]} \\
 K_2 &= \frac{[D_2A]}{[D][DA]} \\
 &\dots \\
 K_N &= \frac{[D_NA]}{[D][D_{N-1}A]}
 \end{aligned} \quad (2)$$

where square brackets denote the concentrations of the corresponding assemblies in an aqueous solution. The above set of equations comprising eq 2 together with the obvious concentration relationships

$$[D] + [DA] + 2[D_2A] + \dots + N[D_NA] = C_{D_0} \quad (3)$$

and

$$[A] + [DA] + [D_2A] + \dots + [D_NA] = C_{A_0} \quad (4)$$

allow us to find the concentrations of assemblies  $[D_NA]$  as well as the  $[D]$  value in the assemblies for different values of  $n = C_{D_0}/C_{A_0}$ . Because the PL of donors in the mixture solutions is entirely accounted for by free donors, the

measured PL intensity  $I_{Dm}$  is proportional to  $[D]$ , whereas  $I_{D_0}$  is proportional to  $C_{D_0}$ . Equations 2–4 can be solved with respect to  $x = ([D]/C_{D_0})$  as a function of  $C_{D_0}/C_{A_0}$ . The unknown equilibrium constants  $K_N$ , which are considered to be variables, can be found from the condition of the best fit of  $(1 - x) = (I_{D_0} - I_{Dm})/I_{D_0}$  to the experimental data.

We then applied this approach to the (G-QDs)–(R-QDs) donor–acceptor system. The value of  $N_{\max}$  was found as follows. The set of equations 2–4 was solved sequentially for  $N = 1, 2, \dots, 7$ ; for each  $N$ , the data were approximated using the least-squares method, and  $\chi^2$  was calculated. We found that  $\chi^2$  decreased as  $N$  increased to 4 and remained nearly the same upon further increases of  $N$ . This indicates that the (G-QDs) <sub>$N$</sub> (R-QDs) aggregates with  $1 \leq N \leq 4$  exerted the strongest effect on the enhancement of the acceptor's PL in QDs assemblies. Therefore, the (G-QDs) <sub>$n$</sub> –(R-QDs) <sub>$n$</sub> , (G-QDs)<sub>2</sub>(R-QDs)<sub>2</sub>, (G-QDs)<sub>3</sub>(R-QDs)<sub>3</sub>, and (G-QDs)<sub>4</sub>(R-QDs)<sub>4</sub> assemblies and free G-QDs exist in the mixture solution at any  $n$ . The best fit of the experimental data on quenching by the calculated dependence  $(1 - x) = (I_{G_0} - I_{Gm})/I_{G_0}$  with  $N = 4$  is shown in Figure 3a. One can see that the model provides the correct description of experimentally observed quenching when the approximation is optimal. The values of  $K_1, K_2, K_3$ , and  $K_4$  were found to be  $3.3 \times 10^{-12}$ ,  $1.3 \times 10^{-14}$ ,  $6.6 \times 10^{-15}$ , and  $3.3 \times 10^{-15}$  cm<sup>3</sup> ( $2.0 \times 10^9$ ,  $8.0 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ , and  $2 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>), respectively, which corresponded to their ratio of 990:4:2:1. In the important case of  $n = 1$ , when complexes with  $N = 1$  prevail in the assemblies, the calculated value of 0.915 agreed well with the measured efficiency of quenching (0.93).

The enhancement of the PL emission of R-QDs,  $E = (I_{Rm} - I_{R_0})/I_{R_0}$ , can be found from the calculated dependence of  $(I_{G_0} - I_{Gm})/I_{G_0}$  on  $n$ :

$$E = c' \cdot n \cdot \frac{\epsilon_G Q Y_{Rm}}{\epsilon_R Q Y_{R_0}} \cdot Q(n) = c \cdot n \cdot Q(n) \quad (5)$$

where

$$c = c' \cdot \frac{\epsilon_G Q Y_{Rm}}{\epsilon_R Q Y_{R_0}}$$

Figure 3b (the solid line) shows that the dependence of  $E$  on  $n$  calculated from eq 5 for  $N = 4$  is in good agreement with the experimental data after the approximation with one variable parameter  $c$  of 0.51. Evidently, the observed saturation of the enhancement with  $n$  is explained by the fact that the number of assemblies with  $N > 4$  is negligible. Because the assembling of QDs in our experiments is most likely to result from Coulomb attraction, we can conclude that the mean surface charge of R-QDs is about 4 times higher than that of G-QDs. Then, the charge of the (G-QDs)<sub>4</sub>–(R-QD) assembly is expected to be neutral, and it does not attract additional positively charged G-QDs. Simple steric modeling accounting for the real sizes of donors and acceptors shows that the assemblies with ratios of (at least)

up to 6:1 may be formed, but they were not observed in the experiments.

Using  $\epsilon_G/\epsilon_R = 0.62$  (Figure 1), we can estimate the value of  $c' = 0.82 \cdot (QY_{Ro}/QY_{Rm})$  from the PL emission enhancement experiments. At the same time, quenching experiments showed that  $c'$  is close to 1. This discrepancy may be explained by the reduction in QY of the acceptor emission in the assemblies compared with that of free QDs. The mechanism of this phenomenon is unknown so far. One explanation may be appearance of a new nonradiating channel of acceptor relaxation induced by an association and/or reduction in the dipole moment of the acceptor optical transition due to the change in the effective charge environment.<sup>23</sup> The observed slight broadening of the acceptor PL emission bands for the assemblies could also be explained by these factors.

The above model of the assembling of nanoparticles with oppositely charged surfaces was also used for the analysis of the concentration dependence of the Y-QDs emission quenching in the QD-NG system. In contrast to the QD-QD system, the best fit of the experimental data was obtained for  $N = 1$  and  $K_1 = 4.8 \times 10^{-12} \text{ cm}^3$  or  $2.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  (Figure 4b). In this case, the quenching efficiency ( $Q$ ) is simply proportional to  $1/n$ . Thus, assemblies containing one QD and one gold particle are predominant in the water solution of positively charged QDs and negatively charged NG particles. This is probably due to the fact that mean values of the surface charges on QDs and NG are similar in this system. The same factor can explain the absence of assemblies with two NG particles and one QD ( $n = 0.5$ ). It is worth noting that the measured  $Q$  for the QD-NG pair is very close to that for the QD-QD pair.

A comparison between the concentration dependences of the PL quenching for the QD-QD and QD-NG systems (Figure 4b) shows that the presence of even a relatively small number of assemblies with several donors per acceptor can substantially modify the pattern of the dependence and result in an incorrect determination of the "bimolecular" association constant  $K_1$ .

The calculated  $K_1$  values for the QD-QD and QD-NG systems were found to be very close to each other ( $2 \times 10^9$  and  $2.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , respectively). Let us compare our results with those obtained in ref 21, where strong PL quenching of small (1.5–2.0 nm) CdSe QDs by oppositely charged spherical gold nanoparticles 1.2 nm in diameter in aqueous solutions was analyzed in terms of the Stern–Volmer kinetic model. Comparable contributions of both dynamic and static mechanisms to the QD PL quenching were found, with the dynamic quenching constant being  $(6–9) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  and the association constant being  $(3.3–3.6) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Conversely, our QD-NG system exhibited donor PL quenching only in donor–acceptor assemblies. The difference was most likely accounted for by the fact that the formation of donor–acceptor pairs was about 10 times more efficient in our system, which resulted in a negligible contribution of dynamic quenching. The cause of the larger value of  $K_1$  obtained in our experiments for the QD-NG system is unknown thus far. Several factors, such as the size and shape

of nanoparticles, density of surface charges, and types of molecular surfactants on the nanoparticle surface may determine this difference and are under study now.

It has been found that the quenching of the band-edge emission of positively charged QDs by negatively charged acceptor nanoparticles (both QDs and NG) in dilute aqueous solutions is caused by the formation of donor–acceptor assemblies. A practically complete quenching of the PL emission of donors is observed for both QD–QD and QD–NG assemblies consisting of one donor and one acceptor nanoparticle. Our data show that in the case of the QD–QD system the quenching is most likely to result from the long-range FRET effect, which is similar to that described for the CdSe QD solids.<sup>9,10</sup> Regarding the QD–NG system, where the observation of the acceptor emission enhancement is impossible, we cannot exclude the presence of other mechanisms of QD quenching similar to those described in ref 21. Nevertheless, our estimations show that in the QD-NG system long-range FRET is effective enough to be responsible for the observed donor emission quenching, too. We have found that the nanoparticles may form assemblies comprising several donors per acceptor, probably due to different values of the donor and acceptor surface charges. We assume that the surface charge of G-QD is about four times more than that of R-QD, whereas the values of surface charges of Y-QD and NG particles are close to each other. If so, then the concentration dependence of the quenching (enhancement) of donor (acceptor) PL emission in their mixture solution is determined by the relative concentrations of the assemblies with different stoichiometry.

**Acknowledgment.** This work has been supported in part by grants from the Région Champagne-Ardenne, France and the Leagues de la Marne and des Ardennes, France (I.N.); European Community project INTAS NANO-01/2331 (I.N., A.B., M.A., V.S.), and NATO CLG n°979330 grant (I.N.). A.S. was supported by the Federation of European Biochemical Societies long-term fellowship; A.B. was supported by the Russian Federation for Basic Research grant 02-02-17311.

**Supporting Information Available:** Experimental details. Derivation of eq 5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## References

- (1) Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545.
- (2) Rogach, A. L.; Talapin, D. V.; Shevchenko, E. V.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 653.
- (3) Talapin, D. V.; Koeppe, R.; Götzinger, S.; Kornowski, A.; Lupton, J. M.; Rogach, A. L.; Benson, O.; Feldman, J.; Weller, H. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1677.
- (4) Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 207.
- (5) Sukhanova, A.; Devy, J.; Venteo, L.; Kaplan, H.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Klinov, D.; Pluot, M.; Cohen, J. H. M.; Nabiev, I. *Anal. Biochem.* **2004**, *324*, 60.
- (6) Sukhanova, A.; Venteo, L.; Devy, J.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Pluot, M.; Nabiev, I. *Lab. Invest.* **2002**, *82*, 1259.
- (7) Akerman, M. E.; Chan, W. C.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 12617.

## Résultats - Discussion

- (8) Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science* **2002**, *298*, 1759.
- (9) Kagan, C. R.; Murray, C. B.; Nirmal, M.; Bawendi, M. G. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 1517.
- (10) Kagan, C. R.; Murray, C. B.; Bawendi, M. G. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, 8633.
- (11) Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 41.
- (12) Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Tran, P. T.; Mattoussi, H.; Charles, P. T.; Mauro, J. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 841.
- (13) Han, M. Y.; Gao, X.; Su, J. Z.; Nie, S. M. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 631.
- (14) Xu, H.; Sha, M. Y.; Wong, E. Y.; Uphoff, J.; Xu, Y.; Treadway, J. A.; Truong, A.; O'Brien, E.; Asquith, S.; Stubbins, M.; Spurr, N. K.; Lai, E. H.; Mahoney, W. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, e43.
- (15) Willard, D. M.; Carillo, L. L.; Jung, J.; Van Orden, A. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 469.
- (16) Wang, S.; Mamedova, N.; Kotov, N. A.; Chem, W.; Studer, J. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 817.
- (17) Medintz, I. L.; Clapp, A. R.; Mattoussi, H.; Goldman, E. R.; Fisher, B.; Mauro, J. M. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 630.
- (18) Baranov, A. V.; Rakovich, Yu. P.; Donegan, J. F.; Perova, T. S.; Moore, R. A.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Masumoto, Y.; Nabiev, I. *Phys. Rev. B* **2003**, *68*, 165306.
- (19) Agranovich, V. M.; Galanin, M. D. *Electronic Excitation Energy Transfer in Condensed Matter*; North-Holland: New York, 1982.
- (20) Liu, G.; Guillet, J. E. *Macromolecules* **1990**, *23*, 1388.
- (21) Nikoobaht, B.; Burda, C.; Braun, M.; Hun, M.; El-Sayed, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 591.
- (22) Marshall, A., G. *Biophysical Chemistry: Principles, Techniques, and Applications*; Wiley & Sons: New York, 1978.
- (23) Wang, L.-W. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 2360.

NL0350938

### **III.3. Transfert d'énergie au sein d'assemblages nanoscopiques en solution aqueuse quantum dot/quantum dot et quantum dot/particule Nanogold®**

Les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents ou « Quantum dots » (Qds) se sont avérés posséder des caractéristiques adéquates pour la mise au point de nouvelles sondes fluorescentes applicables en biologie et biomédicale. Ils possèdent :

- ✘ un haut rendement quantique de photoluminescence (de l'ordre de 70%)
- ✘ une exceptionnelle photostabilité photochimique
- ✘ un spectre d'émission étroit dépendant de leur diamètre, permettant ainsi de couvrir toute la gamme de couleur allant du bleu au rouge.

Les Qds CdSe/ZnS, par leur grande stabilité dans les fluides biologiques, apparaissent comme des marqueurs fluorescents prometteurs.

Nous avons décrit de nouveaux types d'assemblages nanoscopiques de Qds CdSe/ZnS de charge opposée et de particules Nanogold®. Deux types d'assemblages ont été étudiés par spectroscopie d'absorption et de fluorescence avec différents ratios stoechiométriques donneur d'énergie/accepteur d'énergie :

- ✘ Qds de charge opposée
- ✘ Qds chargés positivement et Nanogold® chargés négativement

Il a été mis en évidence un transfert d'énergie électronique efficace au sein de ces assemblages en solution aqueuse, ouvrant de belles perspectives pour le développement de nanosondes basées sur le FRET.

(Le « supporting information » de l'article figure en annexe 1).

#### **III.3.1. Assemblages de Quantum dots de charge opposée**

Dans ces expériences, des Qds chargés négativement de longueur d'onde d'émission 563 nm (R-Qds) et des Qds chargés positivement de longueur d'onde d'émission 518 nm ont été utilisés. La figure 1 montre le recouvrement partiel du spectre d'émission des G-Qds et du spectre d'émission des R-Qds. Ceci laisse présager

un transfert d'énergie efficace des G-Qds (donneur d'énergie) vers les R-Qds (accepteur d'énergie).

Les mesures ont été effectuées suivant des ratios molaires donneur/accepteur ( $n = C_G/C_R$ ) allant de 0.5:1 à 30:1, la concentration en R-Qds restant alors fixe.

La figure 2 (cf. article) montre que la bande d'émission des G-Qds est efficacement « quenchée » suite à l'addition des R-Qds (l'intensité de la bande d'émission des R-Qds s'en trouvant alors augmentée).

L'efficacité du « quenching » des G-Qds a été estimée par la valeur  $Q = (I_{G0} - I_{Gm})/I_{G0}$  où  $I_{G0}$  correspond à l'intensité de photoluminescence (PL) des G-Qds libres en solution et  $I_{Gm}$  l'intensité de PL des G-Qds en solution avec les R-Qds et ce, pour chaque concentration de G-Qds employée. La figure 3A montre ainsi que  $Q$  augmente avec la diminution de  $n$ , le nombre de G-Qds par rapport à R-Qds, pour une efficacité de « quenching » très importante ( $Q=0.93$ ) pour  $n=1$  et  $n=0.5$ .

De la même façon, l'efficacité d'augmentation de l'émission de PL des R-Qds a été calculée, tel  $E = (I_{Rm} - I_{R0})/I_{R0}$ , où  $I_{R0}$  correspond à l'intensité de PL des R-Qds libres et  $I_{Rm}$  à l'intensité de PL des R-Qds en présence des G-Qds. Ces calculs ont été réalisés pour chaque ratio molaire G-Qd/R-Qd. La figure 3B montre une augmentation de  $E$  linéaire jusqu'à une valeur  $n=4-5$  puis une saturation de l'augmentation de l'émission de PL pour les ratios plus importants. Ceci suggère la formation d'assemblages de la forme 4-5 G-Qds pour 1 R-Qd.

De plus, des mesures du temps de dégradation de la PL pour les G-Qds libres et pour les ratios 1:1 et 2:1 du mélange G-Qd/R-Qd ont donné des résultats similaires. Ceci indique que l'émission des G-Qds relevée pour ces deux ratios provient principalement des G-Qds libres, non associés aux R-Qds. De ce fait, L'efficacité du « quenching » de l'émission de PL des G-Qds assemblés est très proche de 1.0.

### III.3.2. Assemblages de Quantum dots et de Nanogold® de charge opposée

Dans ces expériences, l'effet de transfert d'énergie a été étudié sur le mélange de Qds chargés positivement et possédant une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 558 nm (Y-Qds) avec des particules Nanogold® négatives (NG).

Un important quenching de la PL des Y-Qds a été relevée. L'efficacité de « quenching »  $Q$  des Y-Qds a été calculée, pour chaque ratio molaire, selon la méthode employée précédemment, soit  $Q=(I_{Y0}-I_{Ym})/I_{Y0}$ . La figure 4B montre un « quenching » très efficace, observé pour un ratio molaire de 1:1, avec une valeur de  $Q=0.92$ .

### III.3.3. Conclusion générale

L'augmentation de l'émission de fluorescence de l'accepteur et l'absence de changements notables dans les spectres d'absorption des donneurs et des accepteurs dans les assemblages indiquent que le « quenching » et l'augmentation des émissions des Qds sont causés par un effet de FRET entre les donneurs et les accepteurs formant des assemblages.

Le « quenching » ne s'avère possible que dans les cas de contact direct entre le donneur et l'accepteur dans les assemblages contenant deux ou plus nanoparticules. Le « quenching » observé dans le système Qd-Qd est en accord avec la littérature et résulte bien d'un phénomène de FRET. Concernant le système Qd-NG, le fait de ne pas pouvoir observer d'augmentation de PL de l'accepteur ne permet d'exclure la présence possible d'autres mécanismes que le FRET sur le « quenching » des Qds.

La formation des assemblages semble être dépendante des valeurs des charges de surface des nanoparticules. Ainsi, la valeur de surface de charge pour les G-Qds apparaît pour être 4 fois plus importante que celles des R-Qds. Les valeurs de charge des Y-Qds et des Nanogold® semblent être quand à elles très proches. Les valeurs de  $Q$  et  $E$  sont alors déterminées par les concentrations relatives des assemblages avec une stoechiométrie différente.

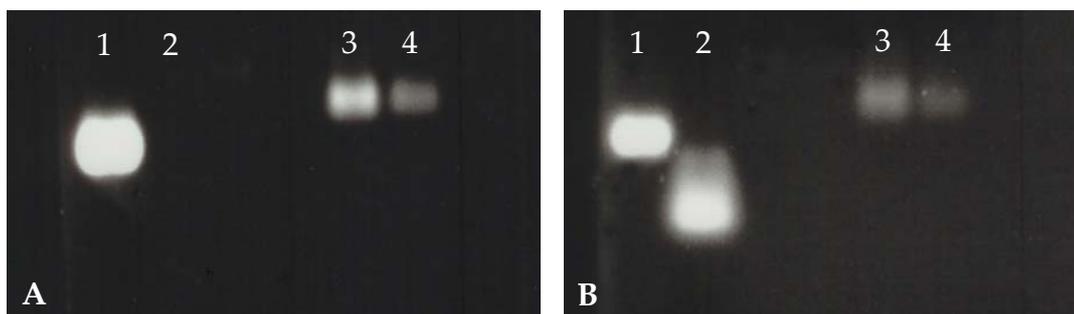
### III.4. Perspective de l'utilisation des quantum dots

Les caractéristiques exceptionnelles de fluorescence et de stabilité photochimique des Qds rendent les perspectives d'applications très nombreuses.

C'est ainsi que nous avons voulu essayer de conjuguer des Qds CdSe/ZnS à des oligonucléotides. Les Qds utilisés ont été choisis pour leur bonne stabilité en milieu aqueux et leur brillance. Ils ont été solubilisés par le mélange acide mercaptosuccinique/acide mercaptosulfonique. Leur pic d'émission de fluorescence a été mesuré à 558 nm.

La conjugaison a été réalisée avec un oligonucléotide poly d(C) de 39 bases préalablement modifié à son extrémité 5'Phosphate par ajout d'un groupement SH.

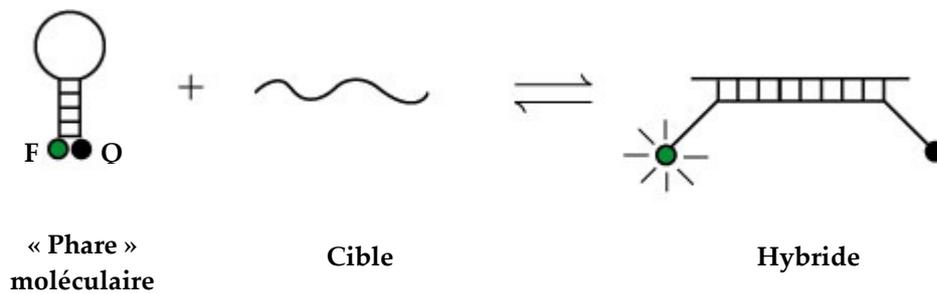
La figure 25 montre le résultat de la conjugaison, par électrophorèse.



**Figure 25.** Electrophorèse du conjugué poly d(C)-Qds. Colonne 1 : Qds seuls ; Colonne 2 : Oligonucléotide poly d(C) seul ; Colonne 3 : Conjugué poly d(C)-Qd ; Colonne 4 : Conjugué 2 fois moins concentré que le précédent. La photographie A montre l'exposition du gel d'agarose après migration sous une lampe UV. La photographie B est précédée d'une incubation du gel dans du bromure d'éthidium pour révéler la colonne 2 ne contenant que des oligonucléotides.

Nous pouvons remarquer sur le panneau A une fluorescence au niveau des colonnes 3 et 4 due aux Qds conjugués aux oligonucléotides poly d(C). Le retard de migration de ces deux colonnes par rapport au témoin Qds seuls montre bien que la conjugaison a été un succès. Le panneau B permet de visualiser la migration de l'oligonucléotide poly d(C) et conforte ainsi le résultat.

Ce résultat ouvre d'enthousiastes perspectives dans la réalisation de nouvelles sondes basées sur l'emploi des Qds. Mis en relation avec les résultats de FRET précédemment décrits, il apparaît possible de réaliser des « phares » moléculaires (figure 26) : ce sont des sondes utilisées pour la détection spécifique des acides nucléiques dans des solutions homogènes. Elles montrent leur efficacité dans des situations où il n'est pas possible ou désirable d'isoler les hybrides sonde-cible de l'excès de sonde, comme pour le suivi de la PCR en temps réel.



**Figure 26.** Principe des « phares » moléculaires. L'émission de fluorescence de la molécule fluorescente excitée (F) est « quenchée » par le quencher (Q). Quand le « phare » moléculaire s'hybride à sa cible, il y a rétablissement de la fluorescence.

Il est aussi envisageable d'utiliser des conjugués oligonucléotide-Qd en FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou encore en Southern-blot, pour aboutir à des marquages plus sensibles et plus stables que par l'emploi des fluorophores actuels. De plus, la particularité des Qds d'émettre à une longueur d'onde spécifique suivant leur diamètre, pour une même longueur d'onde d'excitation, ouvre pleinement le champ au marquage multiple, avec utilisation d'une seule source d'excitation.

## **IV. Conclusions**

### **Perspectives**

## Conclusions - Perspectives

L'ADN topoisomérase I humaine (top1) a très vite été entrevue comme une cible privilégiée pour des thérapies anticancéreuses. Le large éventail d'inhibiteurs potentiels de cette enzyme nécessite de nombreuses études dans la caractérisation de leur action antitumorale mais aussi dans la sélection de nouvelles molécules plus efficaces contre le cancer.

De plus, l'expansion des nanotechnologies ouvre de nouveaux horizons en mettant à disposition des outils performants et prometteurs dans bon nombre de domaines. Les nanocristaux semiconducteurs fluorescents CdSe/ZnS ou « quantum dots » (Qds) en font partie et ont montré d'exceptionnelles propriétés de photoluminescence qui peuvent être mises à profit pour l'amélioration du diagnostic des cancers.

Les résultats obtenus, sur différentes lignées cellulaires issues de tumeurs solides traitées par le topotécan, ont montré un phénomène de « downregulation » de top1 après traitement. Cet effet s'est révélé différent suivant le type cellulaire étudié et indépendant de l'induction de la mort cellulaire. Il peut vraisemblablement être mis en parallèle avec l'efficacité mitigée du topotécan en clinique, suivant le type de tumeurs. De plus, il est mis l'accent sur l'intérêt d'utiliser le topotécan en association avec d'autres agents antitumoraux.

La technique de résonance plasmonique de surface a permis d'approfondir les résultats, par l'étude des vitesses cinétiques d'association et de dissociation de top1 pour son substrat, en absence ou présence de topotécan, de camptothécine, ou de benzo[c]phénanthridines. Ainsi, il a pu être montré que l'efficacité d'inhibition de top1 varie suivant la séquence du site de clivage de top1. Cette approche a permis également de caractériser les interactions biomoléculaires top1-ADN, suivant le mode d'action poison ou suppresseur de l'inhibiteur utilisé lors des mesures. La technologie BIAcore® apparaît comme un outil précieux pour mesurer le potentiel d'inhibition de top1 de nouvelles molécules. A partir de là, il devient possible d'effectuer un tri rapide pour sélectionner les nouvelles molécules susceptibles de posséder une action antitumorale efficace et prometteuse.

## Conclusions - Perspectives

Il a été montré qu'il était possible d'obtenir un transfert d'énergie par le phénomène de FRET entre 2 Qds chargés positivement et négativement. L'extinction de 100% de la photoluminescence du Qd donneur d'énergie a été observée pour une augmentation de celle du Qd accepteur. Ce même phénomène a pu être mis en évidence avec un assemblage Nanogold®/Qd. Ces résultats montrent la possibilité d'utiliser les Qds en milieu aqueux. Les résultats complémentaires très encourageants de conjugaison des Qds aux oligonucléotides donnent accès à de multiples possibilités d'utilisation des Qds, pour le marquage et la détection moléculaire. En effet, il est mis à disposition une sensibilité et une photostabilité nettement plus importantes, comparé aux fluorophores organiques traditionnels utilisés à ce jour. Les Qds, dans le cadre de nos travaux, trouvent leurs applications dans la réalisation de « phares moléculaires », en FISH, en southern blot et en marquage multiple notamment.

Nombreuses sont les perspectives offertes par ces travaux pour lutter contre le cancer.

Du point de vue thérapeutique, la compréhension des mécanismes d'action, d'inhibition mais aussi d'interactions des inhibiteurs de l'ADN topoisomérase I humaine dans le cadre du complexe dit « clivable » est une étape clé pour l'amélioration et l'optimisation des stratégies thérapeutiques existantes. L'emploi de nouvelles techniques d'étude comme le BIAcore® offre de nouvelles possibilités pour aider à la conception de nouveaux agents antitumoraux plus efficaces.

Du point de vue diagnostique, les nanobiotechnologies offrent de puissants outils, comme les nanocristaux semiconducteurs fluorescents. Ils mettent en avant la possibilité de détecter à des stades précoces un cancer et, ainsi, d'appliquer une stratégie thérapeutique moins lourde et plus efficace pour enrayer la progression de la maladie.

## Conclusions - Perspectives

La précocité du diagnostic et le geste thérapeutique approprié efficace y découlant vont de paire pour augmenter les chances de survie du patient, mais aussi son confort et sa qualité de vie.

L'amélioration des connaissances générales sur la génomique et la protéomique du cancer, l'amélioration, l'optimisation et la conception de nouveaux agents antitumoraux ouvrent de nouvelles portes pour combattre les cellules cancéreuses. Les innovations technologiques (comme « les quantum dots ») offertes par l'extraordinaire expansion actuelle des nanotechnologies en Recherche permettent d'apporter de nouvelles solutions pour agir de manière efficace et rapide face au cancer.

# **V. Annexes**

## ANNEXE 1

Supporting Information for “Energy transfer in aqueous solutions of oppositely charged CdSe/ZnS core/shell quantum dots and in quantum dot - nanogold assemblies”

*Richard Wargnier,<sup>†</sup> Alexandre V. Baranov,<sup>‡</sup> Vladimir G. Maslov,<sup>‡</sup> Vitali Stsiapura,<sup>†</sup> Mikhail*

*Artemyev,<sup>§</sup> Michel Pluot,<sup>†</sup> Alyona Sukhanova,<sup>†</sup> and Igor Nabiev<sup>†,\*</sup>*

EA n°3306 “Interactions Cellulaires et Moléculaires en Cancérologie”, Institut Fédératif de Recherche n°53 “Biomolécules”, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq

Jay, 51100 Reims, France; S.I. Vavilov State Optical Institute, 12 Birzhevaya Liniya, 199034

St.-Petersburg, Russia, and Institute for Physico-Chemical Problems, Belarussian State

University, 220080 Minsk, Belarus

### Experimental Details

CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QDs) were synthesized according to the protocol adapted from Ref.1 and described in details elsewhere.<sup>2</sup> QDs have a CdSe core of a desired diameter with an epitaxially grown ZnS shell about two monolayers in thickness<sup>3</sup> and exhibit a high homogeneity (a variation of less than 5%) and a band-edge photoluminescence (PL) quantum yield (QY) of nearly 60% in a chloroform solution.

Highly luminescent alloyed ZnCdSe nanocrystals were synthesized by original method. Briefly, ZnSe nanocrystals (NCs) of ca. 8 nm in diameter were synthesized according to known procedure.<sup>4</sup> The NCs were transferred to the two-neck flask with an appropriate amount of trioctylphosphine oxide/hexadecylamine mixture. A solution of cadmium acetate in trioctylphosphine was added dropwise to the reaction mixture at 250-290°C under intensive

---

\* Corresponding author. Igor Nabiev: e-mail : igor.nabiev@univ-reims.fr .

<sup>†</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne

<sup>‡</sup> S.I. Vavilov State Optical Institute, St.-Petersburg.

<sup>§</sup> Institute for Physico-Chemical Problems

stirring. A spectral position of PL band was controlled precisely by the amount of cadmium precursor added and can be varied from 420 to 560-580 nm. Finally, ZnS cap was grown on ZnCdSe cores in the same reaction mixture at 200°C by adding dropwise an appropriate amount of a solution of diethylzinc and hexamethyldisilthiane in trioctylphosphine. The ZnCdSe/ZnS core-shell NCs were isolated by precipitating with methanol, washing twice with methanol and drying.

Absorption spectra were recorded using a Beckman Coulter DU640 spectrophotometer and cw PL spectra were recorded using a Perkin-Elmer LS50 B fluorimeter with an excitation wavelength of 392 nm in all experiments. PL decays were measured using time-correlated single-photon counting upon excitation with 3.045-eV (407 nm) pulses with typical half-widths of 70 ps generated by a PDL 800B diode laser (Picoquant, Germany) operating at 600 kHz. The overall width of the instrument response function was ~1 ns. The decay data analysis over 400 channels with a width of 58.5 ps was performed using the Marquardt nonlinear least-square method.<sup>5</sup>

The Förster critical radii ( $R_0$ ) were calculated from spectral overlapping of normalized donor emission and acceptor absorption with the use of the approach developed in Ref.7. The refractive index of QDs environment was taken to be 1.33, assuming that interstices were filled with water. The molar extinction coefficients of R-QDs and NG at wavelengths corresponding to the peaks of donor PL were  $4 \times 10^5$  and  $0.5 \times 10^5$ , respectively.

### Derivation of Equation (5)

The intensity of the emission of free R-QDs in a solution with concentration  $C_{Ro}$  is  $I_{Ro} = I_0^i \cdot \ln(10) \cdot \varepsilon_R \cdot C_{Ro} \cdot QY_R$ , where  $I_0^i$  is the intensity of the incident light at 392 nm and  $\varepsilon_R$  is the molar extinction coefficient of R-QDs at the wavelength of excitation. Otherwise, the additional intensity of the PL emission of R-QDs due to the energy transfer from G-QDs to R-

QDs,  $(I_{Rm}-I_{Ro})$ , can be expressed as  $I_0^i \cdot \ln(10) \cdot \varepsilon_G \cdot (C_{Go} - [G]) \cdot c' \cdot QY_{Rm}$ , where  $\varepsilon_G$  is the molar extinction coefficient of G-QDs at the wavelength of excitation (supposed to be the same for free and assembled QDs);  $C_{Go}$  and  $[G]$  are the total concentration and the concentration of free G-QDs in the mixture solution, respectively;  $c'$  is the probability of energy transfer from G-QDs to R-QDs within the assemblies; and  $QY_{Rm}$  is the emission quantum yield of R-QDs in the assemblies. Since  $C_{Go} - [G] = C_{Go} (1 - I_{Gm}/I_{Go})$ , we obtain

$$E = c' \cdot n \cdot \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_R} \cdot \frac{QY_{Rm}}{QY_{Ro}} \cdot Q(n) = c \cdot n \cdot Q(n),$$

$$\text{where } c = c' \cdot \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_R} \cdot \frac{QY_{Rm}}{QY_{Ro}}.$$

## References

- (1) Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Kornowski, A.; Haase, M.; Weller, H. *Nano Lett.* 2001, 1, 207.
- (2) Sukhanova, A.; Venteo, L.; Devy, J.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Pluot, M.; Nabiev, I. *Lab. Invest.* 2002, 82, 1259.
- (3) Baranov, A. V.; Rakovich, Yu. P.; Donegan, J. F.; Perova, T. S.; Moore, R. A.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Masumoto, Y.; Nabiev, I. *Phys. Rev. B* 2003, 68, 165306.
- (4) M.A. Hines, P. Guyot-Sionnest. *J. Phys. Chem. B*, 102(1998), 3655-3657.
- (5) 20. O'Connor, D.V.; Phillips, D. *Time-correlated Single Photon Counting*. - N.Y.: Acad. Press, 1984. - 283 p.
- (6) 10. Kagan, C. R.; Murray, C. B.; Bawendi, M. G. *Phys. Rev. B* 1996, 54, 8633.

## ANNEXE 2

### LISTE DES PUBLICATIONS ISSUES DES TRAVAUX DE LA THESE

#### Publications dans les Revues ou Ouvrages à Diffusion Internationale

**Wargnier R**, Baranov A, Maslov V, Stsiapura V, Artemyev M, Pluot M, Sukhanova A, and Nabiev I.

*Energy Transfer in Aqueous Solutions of Oppositely Charged Nanoassemblies of CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots and in Quantum Dot-Nanogold Systems.*

Nanoletters 2004 ; 4(3) : 451-457.

Devy J, **Wargnier R**, Pluot M, Nabiev I, and Sukhanova A.

*Topotecan-induced alterations of quantity, activity and stability of human DNA topoisomerase I within the solid tumor cell lines.*

Anticancer Res 2004 ; 24(3A) : 1745-1751.

Sukhanova A, Devy J, Venteo L, **Wargnier R**, Artemyev M, Oleinikov V, Pluot M, Nabiev I.

*Nouveaux systèmes d'immunomarquage ultrasensibles par des nanocristaux fluorescents rendus solubles et biocompatibles : perspectives en cancérologie.*

Bulletin du Cancer 2002 ; 89(5) : 476.

**Wargnier R**, Devy J, Cohen JHM, Pluot M, Duval O, Nabiev I, Sukhanova A.

*Stabilité comparative du complexe entre l'ADN topoisomérase I et l'ADN en présence de dérivés de camptothécines et de benzo[c]phénanthridines.*

Bulletin du Cancer 2002 ; 89(5) : 526.

Devy J, **Wargnier R**, Nabiev I, Jardillier JC, Sukhanova A.

*Topotecan-Induced Alterations of Quantity, Activity and Stability of Human DNA Topoisomerase I within the Solid Tumor Cell Lines.*

Anticancer Res 2001 ; 21(3A) : 1544-1545.

Sukhanova A, Devy J, **Wargnier R**, Grokhovsky S, Zhuze A, Jardillier JC, Nabiev I.

*Camptothecin and minor-groove binder netropsin hybrid molecule: synthesis, inhibition of DNA human topoisomerase I, and anticancer cytotoxicity in vitro.*

Anticancer Res 2001 ; 21(3A) : 1555-1556.

*Communications Internationales*

Sukhanova, A., **Wargnier, R.**, Pluot, M., Cohen, J.H.M., Nabiev, I. (2003) Biocompatible fluorescent semiconductor nanocrystals: immunochemical and immunohistochemical labeling of membrane proteins and cells and FRET applications. – Proc. of SFB486 Conference “Nanoscience with nanocrystals”, Munich, Germany, 6-7 October 2003, p.14.

Sukhanova, A., **Wargnier, R.**, Baranov, A., Artemyev, M., Nabiev, I. (2004) Energy Transfer in Aqueous Solutions of Oppositely Charged CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots and in Quantum Dot-Nanogold Assemblies : Biosensors “Molecular Beacons”. – Proc. of Intl. Conference « Quantum Dots – 2004 », Banff, Canada, 9-14 May 2004

## **VI. Bibliographie**

## *Bibliographie*

1. ALIVISATOS AP.  
Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots.  
**Science** 1996 ; 271 (5251) : 933-937.
2. ALSNER J, SVEJSTRUP JQ, KJELDEN E, SORENSEN BS, WESTERGAARD O.  
Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function.  
**J Biol Chem** 1992 ; 267 (18) : 12408-12411.
3. ARTHUR HR, HUI WH, NG YL.  
Structures of new benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum nitidum*.  
**Chem Ind (London)** 1958 ; 1514.
4. BAILLY C.  
Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs.  
**Crit Rev Oncol Hematol** 2003 ; 45 (1) : 91-108.
5. BAUER WR, RESSNER EC, KATES J, PATZKE JV.  
A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: partial purification and properties.  
**Proc Natl Acad Sci USA** 1977 ; 74 (5) : 1841-1845.
6. BAWENDI MG, STEIGERWALD ML, BRUS LE.  
The quantum mechanics of larger semiconductor clusters ("Quantum Dots").  
**Annu Rev Phys Chem** 1990 ; 41 : 477-496.
7. BEEN MD, CHAMPOUX JJ.  
Breakage of single-stranded DNA by eukaryotic type 1 topoisomerase occurs only at regions with the potential for base-pairing.  
**J Mol Biol** 1984 ; 180 (3) : 515-531.
8. BEERMAN TA, McHUGH MM, SIGMUND R, LOWN JW, RAO KE, BATHINI Y.  
Effects of analogs of the DNA minor groove binder Hoechst 33258 on topoisomerase II and I mediated activities.  
**Biochim Biophys Acta** 1992 ; 1131 (1) : 53-61.
9. BERGER JM.  
Structure of DNA topoisomerases.  
**Biochim Biophys Acta** 1998 ; 1400 (1-3) : 3-18.

10. BHARTI AK, OLSON MO, KUFE DW, RUBIN EH.  
Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I.  
**J Biol Chem** 1996 ; 271 (4) : 1993-1997.
11. BJORNSTI MA, BENEDETTI P, VIGLIANTI GA, WANG JC.  
Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin.  
**Cancer Res** 1989 ; 49 (22) : 6318-6323.
12. BRONSTEIN IB, WYNNE-JONES A, SUKHANOVA A, FLEURY F, IANOUL A, HOLDEN JA et al.  
Expression, purification and DNA-cleavage activity of recombinant 68-kDa human topoisomerase I – Target for antitumor drugs.  
**Anticancer Res** 1999 ; 19 (1A) : 317-327.
13. BROWN LO, HUTCHINSON JE.  
Controlled growth of gold nanoparticles during ligand exchange.  
**J Am Chem Soc** 1999 ; 121 (4) : 882-883.
14. BRUCHEZ M Jr, MORONNE M, GIN P, WEISS S, ALIVISATOS AP.  
Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels.  
**Science** 1998 ; 281 (5385) : 2013-2016.
15. BRUS L.  
Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory.  
**J Phys Chem** 1986 ; 90 (12) ; 2555-2560.
16. BUCKWALTER CA, LIN AH, TANIZAWA A, POMMIER YG, CHENG YC, KAUFMANN SH.  
RNA synthesis inhibitors alter the subnuclear distribution of DNA topoisomerase I.  
**Cancer Res** 1996 ; 56 (7) : 1674-1681.
17. CAPRANICO G, BINASCHI M.  
DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons.  
**Biochim Biophys Acta** 1998 ; 1400 (1-3) : 185-194.
18. CASERTA M, AMADEI A, DI MAURO E, CAMILLONI G.  
In vitro preferential topoisomerization of bent DNA.  
**Nucleic Acids Res** 1989 ; 17 (21) : 8463-8474.

- 19.** CELLINI N, LUZI S, MORGANTI AG, SMANIOTTO D, NIESPOLO RM, VALENT V.  
Radiation, hormonotherapy, survival and local control in prostatic carcinoma.  
**Rays 1998 ; 23 (3) : 535-542.**
- 20.** CHAMPOUX JJ.  
DNA is linked to the rat liver DNA nicking-closing enzyme by a phosphodiester bond to tyrosine.  
**J Biol Chem 1981 ; 256 (10) : 4805-4809.**
- 21.** CHAMPOUX JJ.  
DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism.  
**Annu Rev Biochem 2001 ; 70 : 369-413.**
- 22.** CHAMPOUX JJ, DULBECCO R.  
An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA--a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay).  
**Proc Natl Acad Sci USA 1972 ; 69 (1) : 143-146.**
- 23.** CHAN WC, NIE S.  
Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection.  
**Science 1998 ; 281 (5385) : 2016-2018.**
- 24.** CHEN AY, YU C, POTMESIL M, WALL ME, WANI MC, LIU LF.  
Camptothecin overcomes MDR1-mediated resistance in human KB carcinoma cells.  
**Cancer Res 1991 ; 51 (22) : 6039-6044.**
- 25.** CHRISTIANSEN K, SVEJSTRUP AB, ANDERSEN AH, WESTERGAARD O.  
Eukaryotic topoisomerase I-mediated cleavage requires bipartite DNA interaction. Cleavage of DNA substrates containing strand interruptions implicates a role for topoisomerase I in illegitimate recombination.  
**J Biol Chem 1993 ; 268 (13) : 9690-9701.**
- 26.** CHRISTIANSEN K, WESTERGAARD O.  
Characterization of intra- and intermolecular DNA ligation mediated by eukaryotic topoisomerase I. Role of bipartite DNA interaction in the ligation process.  
**J Biol Chem 1994 ; 269 (1) : 721-729.**

*Bibliographie*

27. CLIBY WA, LEWIS KA, LILLY KK, KAUFMANN SH.  
S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function.  
**J Biol Chem** 2002 ; 277 (2) : 1599-1606.
28. COMOIE L, JEANNESSON P, TRENTESAUX C, DESOIZE B, JARDILLIER JC.  
The antileukemic alkaloid fagaronine and the human K 562 leukemic cells: effects on growth and induction of erythroid differentiation.  
**Leuk Res** 1987 ; 11 (5) : 445-451.
29. COVEY JM, JAXEL C, KOHN KW, POMMIER Y.  
Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I.  
**Cancer Res** 1989 ; 49 (18) : 5016-5022.
30. CREEMERS G, GERRITS C, ECKARDT JR, SCHELLENS JH, BURRIS HA, PLANTING AS et al.  
Phase II and pharmacologic study of topotecan administered as a 21-day continuous infusion to patients with colorectal cancer.  
**J Clin Oncol** 1996 ; 14 : 2540-2545.
31. D'ARPA P, MACHLIN PS, RATRIE H 3rd, ROTHFIELD NF, CLEVELAND DW, EARNSHAW WC.  
cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment.  
**Proc Natl Acad Sci USA** 1988 ; 85 (8) : 2543-2547
32. DEAN F, KRASNOW MA, OTTER R, MATZUK MM, SPENGLER SJ, COZZARELLI NR.  
Escherichia coli type-1 topoisomerases: identification, mechanism, and role in recombination.  
**Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 1983 ; 47 (2) : 769-777.
33. DESAI SD, LIU LF, VAZQUEZ-ABAD D, D'ARPA P.  
Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin.  
**J Biol Chem** 1997 ; 272 (39) : 24159-24164.
34. DOUROS J, SUFFNESS M.  
New natural products under development at the National Cancer Institute.  
**Recent Results Cancer Res** 1981 ; 76 : 153-175.

35. DOWLATI A, LEVITAN N, GORDON NH, HOPPEL CL, GOSKY DM, REMICK SC et al.

Phase II and pharmacokinetic/pharmacodynamic trial of sequential topoisomerase I and II inhibition with topotecan and etoposide in advanced non-small-cell lung cancer.

**Cancer Chemother Pharmacol 2001 ; 47 (2) : 141-148.**

36. DUBERTRET B, SKOURIDES P, NORRIS DJ, NOIREAUX V, BRIVANLOU AH, LIBCHABER A.

In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles.

**Science 2002 ; 298 (5599) : 1759-1762.**

37. DURNFORD JM, CHAMPOUX JJ.

The DNA untwisting enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization.

**J Biol Chem 1978 ; 253 (4) : 1086-1089.**

38. EDWARDS TK, SALEEM A, SHAMAN JA, DENNIS T, GERIGK C, OLIVEROS E et al.

Role for nucleolin/Nsr1 in the cellular localization of topoisomerase I.

**J Biol Chem 2000 ; 275 (46) : 36181-36188.**

39. ERSHOV BG, SUKHOV NL, JANATA E.

Formation, absorption spectrum, and chemical reactions of nanosized colloidal cobalt in aqueous solution

**J Phys Chem B 2000 ; 104 (26) : 6138-6142.**

40. FAN Y, WEINSTEIN JN, KOHN KW, SHI LM, POMMIER Y.

Molecular modeling studies of the DNA-topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin.

**J Med Chem 1998 ; 41 (13) : 2216-2226.**

41. FANG SD, Wang LK, HECHT SM.

Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*.

**J Org Chem 1993 ; 58 (18) : 5025-5027.**

42. FERRO AM, McELWAIN MC, OLIVERA BM.

Poly(ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I: a nuclear response to DNA-strand interruptions.

**Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1984 ; 49 : 683-690.**

43. FLEURY F, SUKHANOVA A, IANOUL A, DEVY J, KUDELINA I, DUVAL O et al.  
Molecular determinants of site-specific inhibition of human DNA topoisomerase I by fagaronine and ethoxidine. Relation to DNA binding.  
**J Biol Chem** 2000 ; 275 (5) : 3501-3509.
44. GELLERT M, MIZUUCHI K, O'DEA MH, NASH HA.  
DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.  
**Proc Natl Acad Sci USA** 1976 ; 73 (11) : 3872-3876.
45. GILMOUR DS, PFLUGFELDER G, WANG JC, LIS JT.  
Topoisomerase I interacts with transcribed regions in *Drosophila* cells.  
**Cell** 1986 ; 44 (3) : 401-407.
46. GOLDWASSER F, BAE I, VALENTI M, TORRES K, POMMIER Y.  
Topoisomerase I-related parameters and camptothecin activity in the colon carcinoma cell lines from the National Cancer Institute anticancer screen.  
**Cancer Res** 1995 ; 55 (10) : 2116-2121.
47. GUO L, YANG S, YANG C, YU P, WANG J, GE W et al.  
Highly monodisperse polymer-capped ZnO nanoparticles: Preparation and optical properties.  
**Appl Phys Lett** 2000 ; 76 (20) : 2901-2903.
48. GUPTA M, FUJIMORI A, POMMIER Y.  
Eukaryotic DNA topoisomerases I.  
**Biochim Biophys Acta** 1995 ; 1262 (1) : 1-14.
49. HAYES RL, ARBIT E, ODAIMI M, PANNULLO S, SCHEFF R, KRAVCHINSKIY D et al.  
Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas.  
**Crit Rev Oncol Hematol** 2001 ; 39 (1-2) : 31-42.
50. HEILAND S, KNIPPERS R, KUNZE N.  
The promoter region of the human type-I-DNA-topoisomerase gene. Protein-binding sites and sequences involved in transcriptional regulation.  
**Eur J Biochem** 1993 ; 217 (3) : 813-822.
51. HERTZBERG RP, CARANFA MJ, HOLDEN KG, JAKAS DR, GALLAGHER G, MATTERN MR et al.  
Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity.  
**J Med Chem** 1989 ; 32 (3) : 715-720.

52. HINES MA, GUYOT-SIONNEST P.  
Bright UV-blue luminescent colloidal ZnSe Nanocrystals  
**J Phys Chem B** 1998 ; 102 (19) : 3655-3657.
53. HINES MA, GUYOT-SIONNEST P.  
Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals  
**J Phys Chem** 1996 ; 100 (2) : 468-471.
54. HONJO Y, HRYCYNA CA, YAN QW, MEDINA-PEREZ WY, ROBEY RW, VAN DE LAAR A et al.  
Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells.  
**Cancer Res** 2001 ; 61 (18) : 6635-6639.
55. HSIANG YH, HERTZBERG R, HECHT S, LIU LF.  
Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.  
**J Biol Chem** 1985 ; 260 (27) : 14873-14878.
56. HSIANG YH, LIHOU MG, LIU LF.  
Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin.  
**Cancer Res** 1989 ; 49 (18) : 5077-5082.
57. IANOUL A, FLEURY F, DUVAL O, WAIGH R, JARDILLIER JC, ALIX AJP et al.  
DNA binding by fagaronine and ethoxidine, inhibitors of human DNA topoisomerases I and II, probed by SERS and flow linear dichroism spectroscopy.  
**J Phys Chem B** 1998 ; 103 (11) : 2008-2013.
58. INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H.  
High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.  
**Gene** 1990 ; 96 (1) : 23-28.
59. JAISWAL JK, MATTOUSSI H, MAURO JM, SIMON SM.  
Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates.  
**Nat Biotechnol** 2003 ; 21 (1) : 47-51.
60. JANICKE RU, SPRENGART ML, WATI MR, PORTER AG.  
Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis.  
**J Biol Chem** 1998 ; 273 (16) : 9357-9360.

61. JANIN YL, CROISY A, RIOU JF, BISAGNI E.  
Synthesis and evaluation of new 6-amino-substituted benzo[c]phenanthridine derivatives.  
**J Med Chem** 1993 ; 36 (23) : 3686-3692.
62. JAXEL C, CAPRANICO G, KERRIGAN D, KOHN KW, POMMIER Y.  
Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin.  
**J Biol Chem** 1991 ; 266 (30) : 20418-20423.
63. JAXEL C, KOHN KW, POMMIER Y.  
Topoisomerase I interaction with SV40 DNA in the presence and absence of camptothecin.  
**Nucleic Acids Res** 1988 ; 16 (23) : 11157-11170.
64. JAXEL C, KOHN KW, WANI MC, WALL ME, POMMIER Y.  
Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity.  
**Cancer Res** 1989 ; 49 (6) : 1465-1469.
65. JUAN CC, HWANG JL, LIU AA, WHANG-PENG J, KNUTSEN T, HUEBNER K et al.  
Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2.  
**Proc Natl Acad Sci USA** 1988 ; 85 (23) : 8910-8913.
66. KASID UN, HALLIGAN B, LIU LF, DRITSCHILO A, SMULSON M.  
Poly(ADP-ribose)-mediated post-translational modification of chromatin-associated human topoisomerase I. Inhibitory effects on catalytic activity.  
**J Biol Chem** 1989 ; 264 (31) : 18687-18692.
67. KERRIGAN JE, PILCH DS.  
A structural model for the ternary cleavable complex formed between human topoisomerase I, DNA, and camptothecin.  
**Biochemistry** 2001 ; 40 (33) : 9792-9798.
68. KIKUCHI A, ASAI K.  
Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA.  
**Nature** 1984 ; 309 (5970) : 677-681.

69. KRETZSCHMAR M, MEISTERERNST M, ROEDER RG.  
Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II.  
**Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; 90 (24) : 11508-11512.**
70. KROEGER PE, ROWE TC.  
Analysis of topoisomerase I and II cleavage sites on the Drosophila actin and Hsp70 heat shock genes.  
**Biochemistry 1992 ; 31 (9) : 2492-2501.**
71. KROGH S, MORTENSEN UH, WESTERGAARD O, BONVEN BJ.  
Eukaryotic topoisomerase I-DNA interaction is stabilized by helix curvature.  
**Nucleic Acids Res 1991 ; 19 (6) : 1235-41.**
72. KUDINOV AR, BRONSTEIN IB, GABIBOV AG.  
Two subforms of eukaryotic topoisomerase I. Purification and structure-function relationships.  
**FEBS Lett 1992; 314(2) : 267-270.**
73. KUNZE N, KLEIN M, RICHTER A, KNIPPERS R.  
Structural characterization of the human DNA topoisomerase I gene promoter.  
**Eur J Biochem 1990 ; 194 (2) : 323-330.**
74. KUNZE N, YANG GC, DOLBERG M, SUNDARP R, KNIPPERS R, RICHTER A.  
Structure of the human type I DNA topoisomerase gene.  
**J Biol Chem 1991 ; 266 (15) : 9610-9616.**
75. KUNZE N, YANG GC, JIANG ZY, HAMEISTER H, ADOLPH S, WIEDORN KH et al.  
Localization of the active type I DNA topoisomerase gene on human chromosome 20q11.2-13.1, and two pseudogenes on chromosomes 1q23-24 and 22q11.2-13.1.  
**Hum Genet 1989 ; 84 (1) : 6-10.**
76. LARSEN AK, GRONDARD L, COUPRIE J, DESOIZE B, COMOIE L, JARDILLIER JC et al.  
The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerases I and II.  
**Biochem Pharmacol 1993 ; 46 (8) : 1403-1412.**
77. LAVERGNE O, DEMARQUAY D, KASPRZYK PG, BIGG DC.  
Homocamptothecins: E-ring modified CPT analogues.  
**Ann NY Acad Sci 2000 ; 922 : 100-111.**

78. LESUEUR-GINOT L, DEMARQUAY D, KISS R, KASPRZYK PG, DASSONNEVILLE L, BAILLY C et al.  
Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties.  
**Cancer Res 1999 ; 59 (12) : 2939-2943.**
79. LIU LF.  
DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs.  
**Annu Rev Biochem 1989 ; 58 : 351-375.**
80. LIU LF.  
HeLa topoisomerase I.  
**Methods Enzymol 1983 ; 100 : 133-137**
81. LIU LF, WANG JC.  
Supercoiling of the DNA template during transcription.  
**Proc Natl Acad Sci USA 1987 ; 84 (20) : 7024-7027.**
82. LIU TJ, el-NAGGAR AK, McDONNELL TJ, STECK KD, WANG M, TAYLOR DL et al.  
Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck.  
**Cancer Res 1995 ; 55 (14) : 3117-3122.**
83. LYNN RM, BJORNSTI MA, CARON PR, WANG JC.  
Peptide sequencing and site-directed mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase I.  
**Proc Natl Acad Sci USA ; 86 (10) : 3559-3563.**
84. MADDEN KR, CHAMPOUX JJ.  
Overexpression of human topoisomerase I in baby hamster kidney cells: hypersensitivity of clonal isolates to camptothecin.  
**Cancer Res 1992 ; 52 (3) : 525-532.**
85. MADELAINE I, FAURE P.  
Les topoisomérasés : nouvelles cibles pharmacologiques d'agents anticancéreux.  
**J Pharm Clin 1993 ; 12 : 169-175.**
86. MAKHEY D, LI D, ZHAO B, SIM SP, LI TK, LIU A et al.  
Substituted benzo[i]phenanthridines as mammalian topoisomerase-targeting agents.  
**Bioorg Med Chem 2003 ; 11 (8) : 1809-1820.**

## *Bibliographie*

87. MARKS DC, BELOV L, DAVEY MW, DAVEY RA, KIDMAN AD.  
The MTT cell viability assay for cytotoxicity testing in multidrug-resistant human leukemic cells.  
**Leuk Res 1992 ; 16 (12) : 1165-1173.**
88. MEIJER M, KARIMI-BUSHERI F, HUANG TY, WEINFELD M, YOUNG D.  
Pnk1, a DNA kinase/phosphatase required for normal response to DNA damage by gamma-radiation or camptothecin in *Schizosaccharomyces pombe*.  
**J Biol Chem 2002 ; 277 (6) : 4050-4055.**
89. MERINO A, MADDEN KR, LANE WS, CHAMPOUX JJ, REINBERG D.  
DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription.  
**Nature 1993 ; 365 (6443) : 227-232.**
90. MESSMER WM, TIN-WA M, FONG HH, BEVELLE C, FARNSWORTH NR, ABRAHAM DJ et al.  
Fagaronine, a new tumor inhibitor isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae).  
**J Pharm Sci 1972 ; 61 (11) : 1858-1859**
91. MO YY, YU Y, SHEN Z, BECK WT.  
Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein.  
**J Biol Chem 2002 ; 277 (4) : 2958-2964.**
92. MORTENSEN UH, STEVNSNER T, KROGH S, OLESEN K, WESTERGAARD O, BONVEN BJ.  
Distamycin inhibition of topoisomerase I-DNA interaction: a mechanistic analysis.  
**Nucleic Acids Res 1990 ; 18 (8) : 1983-1989.**
93. MULLER S, HOEGE C, PYROWOLAKIS G, JENTSCH S.  
SUMO, ubiquitin's mysterious cousin.  
**Nat Rev Mol Cell Biol 2001 ; 2 (3) : 202-210.**
94. MURRAY CB, NORRIS DJ, BAWENDI MG.  
Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites  
**J Am Chem Soc 1993 ; 115 (19) : 8706-8715.**

95. NIEVES-NEIRA W, POMMIER Y.  
Apoptotic response to camptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: multifactorial relationships with topoisomerase I, protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways.  
**Int J Cancer** 1999; 82 (3) : 396-404.
96. PARAK WJ, BOUDREAU R, LE GROS M, GERION D, ZANCHET D, MICHEEL CM et al.  
Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks.  
**Adv Mater** 2002 ; 14 (12) : 882-885.
97. PARAK WJ, GERION D, PELLEGRINO T, ZANCHET D, MICHEEL C, WILLIAMS SC et al.  
Biological applications of colloidal nanocrystals.  
**Nanotechnology** 2003 ; 14 : R15-R27.
98. PARAK WJ, GERION D, ZANCHET D, WOERZ AS, PELLEGRINO T, MICHEEL C et al.  
Conjugation of DNA to silanized colloidal semiconductor nanocrystalline quantum dots.  
**Chem Mater** 2002 ; 14 (5) : 2113-2119.
99. PATHAK S, CHOI SK, ARNHEIM N, THOMPSON ME.  
Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for in situ hybridization.  
**J Am Chem Soc** 2001 ; 123 (17) : 4103-4104.
100. PELLEGRINO T, MANNA L, KUDERA S, LIEDL T, KOKTYSH D, ROGACH AL et al.  
Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals.  
**Nanoletters** 2004 ; 4 (4) : 703-707.
101. PENG ZA, PENG X.  
Formation of high-quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursor.  
**J Am Chem Soc** 2001 ; 123 (1) : 183-184.
102. PICHIERRI P, FRANCHITTO A, PIERGENTILI R, COLUSSI C, PALITTI F.  
Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair.  
**Carcinogenesis** 2001 ; 22 (11) : 1781-1787.

**103.** PINET C, FELGERES A, COLAU JC.

Ovarian cyts in women over 50 years of age. A retrospective study from 1979 to 1989 at Foch.

**J Chir (Paris) 1990 ; 127 (11) : 528-532.**

**104.** POMMIER Y.

Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors.

**Biochimie 1998 ; 80 (3) : 255-270.**

**105.** POMMIER Y, JENKINS J, KOHLHAGEN G, LETEURTRE F.

DNA recombinase activity of eukaryotic DNA topoisomerase I; effects of camptothecin and other inhibitors.

**Mutat Res 1995 ; 337 (2) : 135-145.**

**106.** POMMIER Y, KERRIGAN D, HARTMAN KD, GLAZER RI.

Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C.

**J Biol Chem 1990 ; 265 (16) : 9418-9422.**

**107.** POMMIER Y, POURQUIER P, FAN Y, STRUMBERG D.

Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme.

**Biochim Biophys Acta 1998 ; 1400 (1-3) : 83-105.**

**108.** PRADO S, MICHEL S, TILLEQUIN F, KOCH M, PFEIFFER B, PIERRE A et al.

Synthesis and cytotoxic activity of benzo[c][1,7] and [1,8]phenanthrolines analogues of nitidine and fagaronine.

**Bioorg Med Chem 2004 ; 12 (14) : 3943-3953.**

**109.** PULLEYBLANK DE, MORGAN AR.

Partial purification of "omega" protein from calf thymus.

**Biochemistry 1975 ; 14 (23) : 5205-5209.**

**110.** QUARONI L, CHUMANOV G.

Preparation of polymer-coated functionalized silver nanoparticles.

**J Am Chem Soc 1999 ; 121 (45) : 10642-10643.**

**111.** RASHEED ZA, RUBIN EH.

Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs.

**Oncogene 2003 ; 22 (47) : 7296-7304.**

- 112.** REDINBO MR, STEWART L, KUHN P, CHAMPOUX JJ, HOL WG.  
Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA.  
**Science 1998 ; 279 (5356) : 1504-1513.**
- 113.** REID RJ, KAUF EA, BJORNSTI MA.  
Camptothecin sensitivity is mediated by the pleiotropic drug resistance network in yeast.  
**J Biol Chem 1997 ; 272 (18) : 12091-12099.**
- 114.** ROCA J.  
The mechanisms of DNA topoisomerases.  
**Trends Biochem Sci 1995 ; 20 (4) : 156-160.**
- 115.** ROCKENBERGER J, SCHER EC, ALIVISATOS AP.  
A new nonhydrolytic single-precursor approach to surfactant-capped nanocrystals of transition metal oxides.  
**J Am Chem Soc 1999 ; 121 (49) : 11595-11596.**
- 116.** ROTHENBERG M.  
Topoisomerase I inhibitors: review and update.  
**Ann Oncol 1997 ; 8 : 837-855.**
- 117.** ROUESSE J.  
Hormone therapy in breast cancer.  
**Chirurgie 1994-1995 ; 120 (6-7) : 330-337.**
- 118.** SAGAN LA.  
Human radiation effect : an overview.  
**Health Phys 1971 ; 21 (6) : 827-833.**
- 119.** SAMEJIMA K, SVINGEN PA, BASI GS, KOTTKE T, MESNER PWJr, STEWART L et al.  
Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis.  
**J Biol Chem 1999; 274 (7) : 4335-4340.**
- 120.** SAMUELS DS, SHIMIZU Y, SHIMIZU N.  
Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I.  
**FEBS Lett 1989 ; 259 (1) : 57-60.**

**121. SHAFFER R, TRAKTMAN P.**

Vaccinia virus encapsidates a novel topoisomerase with the properties of a eucaryotic type I enzyme.

**J Biol Chem 1987 ; 262 (19) : 9309-9315.**

**122. SHUMAN S.**

Two classes of DNA end-joining reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase I.

**J Biol Chem 1992 ; 267 (24) : 16755-16758.**

**123. SHUMAN S, MOSS B.**

Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase.

**Proc Natl Acad Sci USA 1987 ; 84 (21) : 7478-7482.**

**124. SIESAREV AI, STETTER KO, LAKE JA, GELLERT M, KRAH R, KOZYAVKIN SA.**

DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote.

**Nature 1993 ; 364 (6439) : 735-737**

**125. SKAFF H, EMRICK T.**

The use of 4-substituted pyridines to afford amphiphilic, pegylated cadmium selenide nanoparticles.

**Chem Commun (Camb) 2003 ; (1) : 52-53.**

**126. SLESAREV AI, LAKE JA, STETTER KO, GELLERT M, KOZYAVKIN SA.**

Purification and characterization of DNA topoisomerase V. An enzyme from the hyperthermophilic prokaryote *Methanopyrus kandleri* that resembles eukaryotic topoisomerase I.

**J Biol Chem 1994 ; 269 (5) : 3295-3303.**

**127. SORENSEN BS, JENSEN PB, SEHESTED M, JENSEN PS, KJELDEN E, NIELSEN OF et al.**

Antagonistic effect of aclarubicin on camptothecin induced cytotoxicity: role of topoisomerase I.

**Biochem Pharmacol 1994 ; 47 (11) : 2105-10.**

**128. SRIVENUGOPAL KS, LOCKSHON D, MORRIS DR.**

*Escherichia coli* DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme.

**Biochemistry 1984 ; 23 (9) : 1899-1906.**

**129. STEWART L, IRETON GC, CHAMPOUX JJ.**

Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation.

**J Mol Biol 1997 ; 269 (3) : 355-372.**

- 130.** STEWART L, IRETON GC, CHAMPOUX JJ.  
The domain organization of human topoisomerase I.  
**J Biol Chem** 1996 ; 271 (13) : 7602-7608.
- 131.** STIVERS JT, JAGADEESH GJ, NAWROT B, STEC WJ, SHUMAN S.  
Stereochemical outcome and kinetic effects of Rp- and Sp-phosphorothioate substitutions at the cleavage site of vaccinia type I DNA topoisomerase.  
**Biochemistry** 2000 ; 39 (18) : 5561-5572.
- 132.** SUIT HD.  
Effects of radiation on tumors in animals.  
**Proc Can Cancer Conf** 1967 ; 7 : 389-404.
- 133.** SUKHANOVA A, VENTEO L, DEVY J, ARTEMYEV M, OLEINIKOV V, PLUOT M et al.  
Highly stable fluorescent nanocrystals as a novel class of labels for immunohistochemical analysis of paraffin-embedded tissue sections.  
**Lab Invest** 2002 ; 82 (9) : 1259-1261.
- 134.** SVEJSTRUP JQ, CHRISTIANSEN K, ANDERSEN AH, LUND K, WESTERGAARD O.  
Minimal DNA duplex requirements for topoisomerase I-mediated cleavage in vitro.  
**J Biol Chem** 1990 ; 265 (21) : 12529-12535.
- 135.** TALAPIN DV, HAUBOLD S, ROGACH AL, KORNOWSKI A, HAASE M, WELLER H.  
A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals.  
**J Phys Chem B** 2001 ; 105 (12) : 2260-2263.
- 136.** TAMURA H, KOHCHI C, YAMADA R, IKEDA T, KOIWAI O, PATTERSON E et al.  
Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites.  
**Nucleic Acids Res** 1991 ; 19 (1) : 69-75.
- 137.** TARIN D, PRICE JE, KETTLIWELL MGW, SOUTER RG, VASS ACR, CROSSLEY B.  
Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts.  
**Cancer Res** 1984 ; 44 (8) : 3584-3592.

- 138.** TILLY H, GAULARD P, LEPAGE E, DUMONTET C, DIEBOLD J, PLANTIER I et al.  
Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical presentation, immunophenotype, and outcome.  
**Blood** 1997 ; 90 (9) : 3727-3734.
- 139.** TORRES CA, BAEZ A.  
Effects of the antitumor drugs 3-nitrobenzothiazolo[3,2-alpha]quinolinium and fagaronine on nucleic acid and protein synthesis.  
**Biochem Pharmacol** 1986 ; 35 (4) : 679-685.
- 140.** TRENTLER TJ, DENLER TE, BERTONE JF, AGRAWAL A, COLVIN VL.  
Synthesis of TiO<sub>2</sub> nanocrystals by nonhydrolytic solution-based reactions.  
**J Am Chem Soc** 1999 ; 121 (7) : 1613-1614.
- 141.** TSURUTANI J, NITTA T, HIRASHIMA T, KOMIYA T, UEJIMA H, TADA H et al.  
Point mutations in the topoisomerase I gene in patients with non-small cell lung cancer treated with irinotecan.  
**Lung Cancer** 2002 ; 35 (3) : 299-304.
- 142.** WALL ME, WANI MC, COOKE CE, PALMER KH, McPHAIL AT, SIM GA.  
The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*.  
**J Am Chem Soc** 1966 ; 88 (16) : 3888-3890.
- 143.** WAN S, CAPASSO H, WALWORTH NC.  
The topoisomerase I poison camptothecin generates a Chk1-dependent DNA damage checkpoint signal in fission yeast.  
**Yeast** 1999 ; 15 (10A) : 821-828.
- 144.** WANG JC.  
DNA topoisomerases.  
**Annu Rev Biochem** 1996 ; 65 : 635-692.
- 145.** WANG JC.  
Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega.  
**J Mol Biol** 1971 ; 55 (3) : 523-533.
- 146.** WANG JC, LYNCH AS.  
Transcription and DNA supercoiling.  
**Curr Opin Genet Dev** 1993 ; 3 (5) : 764-768.

- 147.** WANG LK, JOHNSON RK, HECHT SM.  
Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine.  
**Chem Res Toxicol 1993 ; 6 (6) : 813-818.**
- 148.** WASSERMANN K, MARKOVITS J, JAXEL C, CAPRANICO G, KOHN KW, POMMIER Y.  
Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II.  
**Mol Pharmacol 1990 ; 38 (1) : 38-45.**
- 149.** WRIGHT SC, SCHELLENBERGER U, WANG H, WANG Y, KINDER DH.  
Chemotherapeutic drug activation of the AP24 protease in apoptosis: requirement for caspase 3-like-proteases.  
**Biochem Biophys Res Commun 1998 ; 245 (3) : 797-803.**
- 150.** WU X, LIU H, LIU J, HALEY KN, TREADWAY JA, LARSON JP et al.  
Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots.  
**Nat Biotechnol 2003 ; 21 (1) : 41-46.**
- 151.** XU H, SHA MY, WONG EY, UPHOFF J, XU Y, TREADWAY JA et al.  
Multiplexed SNP genotyping using the Qbead system: a quantum dot-encoded microsphere-based assay.  
**Nucleic Acids Res 2003 ; 31 (8) : e43.**
- 152.** YANG GC, KUNZE N, BAUMGARTNER B, JIANG ZY, SAPP M, KNIPPERS R et al.  
Molecular structures of two human DNA topoisomerase I retrosequences.  
**Gene 1990 ; 91 (2) : 247-253.**
- 153.** YEH YC, LIU HF, ELLIS CA, LU AL.  
Mammalian topoisomerase I has base mismatch nicking activity.  
**J Biol Chem 1994 ; 269 (22) : 15498-15504.**
- 154.** ZAPATA JM, KRAJEWSKA M, KRAJEWSKI S, HUANG RP, TAKAYAMA S, WANG HG et al.  
Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors.  
**Breast Cancer Res Treat 1998; 47 (2) : 129-140.**

**WARGNIER Richard**

**DOSAGE DE L'ADN TOPOISOMERASE I DANS LES LIGNEES CELLULAIRES ISSUES DE TUMEURS SOLIDES ET APPROCHE NANOTECHNOLOGIQUE DU DOSAGE SIMULTANE DE LA PROTEINE ET DE SON GENE**

Th. Univ. REIMS : 2004, N°

**RESUME**

L'ADN topoisomérase I humaine (top1) est une enzyme jouant un rôle essentiel au cours des mécanismes de changement de topologie et de conformation de l'ADN, tels la réplication et la transcription. De par sa capacité à éliminer les super-tours de l'ADN et ainsi d'éviter l'apparition de cassures dans la double-hélice d'ADN, top1 s'est avérée être une cible de choix en cancérologie. Les agents anti-cancéreux de cette enzyme agissent suivant deux mécanismes : soit par stabilisation du complexe top1 - ADN par empoisonnement, soit par suppression des sites de reconnaissance de top1 au niveau de l'ADN. Les chercheurs en cancérologie s'évertuent à optimiser les traitements existants, mais aussi à déceler et mettre au point de nouvelles thérapeutiques par le biais de nouveaux agents anti-cancéreux.

Notre travail a consisté, dans une première partie, à étudier *in vitro* les effets du topotécan, poison dérivé de la camptothécine et d'ores et déjà utilisé en clinique, sur la « downregulation » de top1 pour les lignées cellulaires issues de tumeurs solides suivantes : A549, CaOV-3, HT29 et MCF7. Les résultats ont montré une variation quand aux réponses induites par le topotécan, en termes d'altération, de quantité et de stabilité de top1. De manière plus générale, le topotécan a montré une efficacité différente suivant la nature du cancer et la dose de médicament employée.

Dans une deuxième partie, une étude complémentaire, par la technique de résonance plasmonique de surface, a permis d'étudier les vitesses d'association et de dissociation de top1 pour son substrat, en absence ou présence de topotécan, mais aussi d'étudier l'impact de la séquence d'ADN sur l'efficacité de stabilisation du complexe clivable ou de suppression de reconnaissance de cette séquence par top1. Il a ainsi été possible de faire une distinction entre les agents poisons et supprimeurs et d'appréhender leur potentiel d'inhibition de l'activité de top1 suivant les doses employées.

La troisième partie de ces travaux a porté sur l'identification des perspectives d'application des approches nanotechnologiques en cancérologie. Aujourd'hui, les nanotechnologies ne cessent de croître en intérêt et de montrer l'apport qu'elles représentent dans bien des domaines scientifiques. En cancérologie, l'élaboration de nano-outils ouvre des perspectives quand à l'amélioration des diagnostics et des thérapeutiques. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à mettre au point de nouveaux systèmes de marquage à l'aide de nanocristaux semi-conducteurs, les quantum dots (Qds) dont les propriétés de fluorescence dépassent largement celles des fluorophores organiques traditionnels.

Nous avons ainsi réussi, dans un premier temps, à optimiser les Qds dans le but de les rendre compatibles à une utilisation en analyse biologique. Puis, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir un phénomène de FRET entre 2 Qds et/ou 1 Qd et une particule Nanogold®, rendant pleinement envisageable l'élaboration de phares moléculaires, pour un maximum de brillance.

Nos essais de conjugaison des Qds à des oligonucléotides ont également renforcé les perspectives de réalisation d'hybridation *in situ* et de phares moléculaires.

L'ensemble de ces résultats offre de réelles perspectives, non seulement d'amélioration et d'optimisation des traitements du cancer, mais ouvre également la voie vers de séduisantes solutions pour une détection plus précoce et plus sensible des cancers.

**SPECIALITE : Biomolécules et Dynamique Cellulaire**

**MOTS-CLES : ADN topoisomérase I humaine, inhibiteurs anti-cancéreux, nanotechnologies, Quantum dots.**

<b>Dr. FLEURY Fabrice</b> , Université de Nantes (France)	Examineur
<b>Pr. NABIEV Igor</b> , Université de Reims (France)	Directeur de Thèse
<b>Pr. PLENAT François</b> , Université de Nancy (France)	Rapporteur
<b>Pr. PLUOT Michel</b> , Université de Reims (France)	Président
<b>Pr. VOLKOV Yuri</b> , Trinity College de Dublin (Irlande)	Rapporteur

**ADRESSE DE L'AUTEUR :** Librecy 08460 SIGNY-L'ABBAYE